

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Centro de Investigação em Ciências da Saúde

Desenho e desenvolvimento de sistemas inovadores de transporte de ADN plasmídico

Fábio André Franco Gomes

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

Orientador: Prof. Doutora Diana Rita Barata Costa
Coorientador: Prof. Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

21 de setembro de 2020

Folha em branco

Dedicatória

Aos meus pais, que abdicaram de alguns dos seus sonhos para que pudesse realizar o meu mestrado.

Ao meu irmão e amigos, pela compreensão da minha ausência durante todo o tempo que estive ausente a estudar, que mesmo necessitando da minha ajuda sempre me apoiaram e incentivaram ao prosseguimento dos estudos.

Folha em branco

Agradecimentos

Chegado ao fim de mais uma etapa da minha formação académica, não posso deixar de agradecer a algumas pessoas que me auxiliaram na elaboração desta dissertação.

Agradeço em primeiro lugar à minha orientadora, Professora Doutora Diana Costa e à coorientadora Professora Doutora Ângela Sousa por toda a ajuda, apoio e disponibilidade dispensada durante todo o trabalho laboratorial e escrita da dissertação.

A todos os elementos pertencentes ao grupo de investigação em Biofármacos e Biomateriais devo o meu agradecimento, com especial consideração aos alunos de doutoramento Raquel Neves e Rúben Faria pelas orientações facultadas na realização de todo o trabalho laboratorial.

Tenho que agradecer também à Universidade da Beira Interior e ao Centro de investigação em Ciências da Saúde, pela disponibilização de todos os equipamentos e material necessário à realização do trabalho laboratorial, sem os mesmos não seria possível a realização desta dissertação. Ao diretor de curso de Bioengenharia, Professor Doutor Bruno Ribeiro, que me auxiliou na escolha do tema de tese.

Na sequência um agradecimento especial às técnicas, Doutora Ana Gomes e Doutoradas Ana Borges e Catarina Ferreira por toda a disponibilidade na explicação de funcionamento dos microscópios eletrónico de varrimento e confocal respetivamente.

Por fim agradecer aos meus pais e irmão, amigos e namorada, por todo o apoio e motivação que me deram ao longo de todo o meu percurso académico.

Muito obrigado a todos.

Folha em branco

Prefácio

Cada vez mais têm sido estudados sistemas de entrega de biofármacos como estratégia de tratamento para diversas doenças. Os sistemas de transporte de ADN plasmídico (pADN) têm sido considerados vetores promissores em âmbito terapêutico já que possibilitam a entrega de material genético a células alvo, contribuindo para progressos no campo da terapia génica.

Neste trabalho foram desenvolvidos sistemas de transporte de pADN direcionados a organelos celulares específicos, nomeadamente ao núcleo e à mitocôndria, a fim de serem usados em aplicações de terapia génica nuclear e mitocondrial.

Para tal, será feita a complexação de pADN com polímeros a fim de formular nanopartículas, com propriedades de tamanho, carga superficial e morfologia adequadas aos processos de captação e internalização celular. Deste modo, o seu potencial efeito terapêutico poderá ser investigado. Será feita a otimização das propriedades destes vetores a fim de melhorar a sua performance de transfeção celular *in vitro*, com vista à expressão de proteínas.

Folha em branco

Resumo

Ao longo dos últimos anos, algumas terapias, como a quimioterapia, braquiterapia, imunoterapia ou radioterapia, tornaram-se o tratamento convencional para certas doenças devido à sua eficácia, no entanto, mostraram ser muito invasivas, citotóxicas e pouco seletivas. Mesmo com a exposição conjunta e continuada destes tratamentos, os mesmos não demonstram eficácia suficiente para curar tais doenças, sendo usados de forma paliativa.

Com o desenvolvimento da Ciência dos materiais e rápido progresso da nanotecnologia, a utilização de materiais nanométricos na entrega de genes por aplicações de terapia gênica mudaram o atual paradigma da terapêutica, uma vez que esta terapia possibilita a inserção de material genético em células e tecidos alvo de um indivíduo, de forma mais direcionada e menos citotóxica.

Neste sentido, o desenvolvimento de vetores de entrega de material genético seguros, seletivos, biocompatíveis e fáceis de produzir surge como uma estratégia adequada para fins terapêuticos. Entre os vetores virais e sintéticos, estes últimos, nomeadamente os de base polimérica, apresentam características promissoras para serem explorados com vista à sua aplicação em contexto clínico.

O núcleo e a mitocôndria das células eucarióticas animais possuem genoma próprio e o funcionamento de ambos os organelos está interligado. Diversas doenças humanas estão associadas a mutações que ocorrem num ou em ambos os organelos.

A terapia gênica nuclear tem sido amplamente investigada nas últimas décadas e evoluiu consideravelmente com vários ensaios clínicos em curso. Contrariamente, a terapia gênica mitocondrial é uma área, até ao momento, pouco estudada com apenas alguns resultados publicados internacionalmente. Estes trabalhos têm demonstrado o potencial efeito terapêutico da criação de vetores adequados à entrega de ADN mitocondrial a mitocôndrias.

Assim, neste trabalho foram desenvolvidos sistemas de transporte de ADN plasmídico (pADN), com capacidade de direcionamento a organelos celulares específicos, tendo como objetivo final restaurar o normal funcionamento celular. Para tal, fez-se a complexação de pADN com o polímero polietilenamina (PEI) e PEI associado ao agente espaçador poli (etileno glicol) (PEG) e modificado com o composto trifenilfosfônio (TPP) que possui afinidade mitocondrial (PEI-PEG-TPP) a fim de formular nanopartículas

biocompatíveis, com propriedades de tamanho, carga superficial e morfologia adequadas aos processos de captação e internalização celular.

Deste modo, pretendeu-se desenvolver vetores com capacidade de direcionamento ao núcleo e mitocôndria das células, respetivamente. O seu potencial efeito terapêutico foi investigado, foi feita a otimização das propriedades destes vetores a fim de melhorar a sua performance de transfeção celular *in vitro* e assim promover avanços significativos no desenvolvimento de sistemas de entrega direcionada de pADN com efeito terapêutico. Também foi avaliada a citotoxicidade dos sistemas.

Os resultados demonstram uma variação nas características das nanopartículas formuladas, quer ao nível do tamanho, carga à superfície ou citotoxicidade induzida, consoante o sistema formulado. Foi possível a formulação de poliplexos biocompatíveis, com boa capacidade de incorporação de pADN e entrega eficaz às células.

Palavras-chave

ADN plasmídico; polietilenimina; polímeros catiónicos; sistemas de entrega; terapia génica; transfeção celular.

Folha em branco

Abstract

Throughout the last years, some therapies, such as chemotherapy, brachytherapy, immunotherapy or radiotherapy, have become the conventional treatment for certain diseases due to its effectiveness. However, the exposure to these treatments has shown to be invasive, cytotoxic and not very selective. Even the combined and continuous exposure of these therapies, show to be ineffective enough to cure.

With the development of material sciences and the fast progress in nanotechnology, the use of nanometric materials in gene delivery by gene therapy applications has changed the current paradigm of therapy, since it allows the insertion of genetic material in targeted cells and tissues, in a more targeted and less cytotoxic way.

In this regard, the development of safe, selective, biocompatible and easy to produce delivery vectors based on genetic material appears as a suitable strategy for therapeutic purposes. Among the viral and synthetic vectors, the latter, namely the polymeric-based ones, present promising features to their application in a clinical context.

The nucleus and mitochondria of animal eukaryotic cells have their own genome, and their functioning is connected between them. Several human diseases are associated with mutations occurring in one or both of these organelles.

Nuclear genetic therapy has been widely studied on the last decades and has evolved significantly with multiple ongoing clinical trials. On the other hand, mitochondrial genetic therapy has been less studied. The few studies that have been published show the potential therapeutic effect of the creation of appropriate vectors for mitochondrial DNA delivery to the mitochondria.

Thus, in this work, plasmid DNA (pDNA) transport systems were developed and directed to specific cellular organelles in order to restore normal cellular functioning. To do so, pDNA was complexed with the polyethyleneamine polymer (PEI) and modified PEI associated with the polyethylene glycol (PEG) spacer and triphenylphosphonium compound (TPP) with mitochondrial affinity (PEI-PEG-TPP), in order to formulate biocompatible nanoparticles, with the suitable properties concerning size, surface charge and morphology required to the uptake and cellular internalization.

In this way, the aim was to develop vectors targeting the nucleus and mitochondria, respectively. Their potential therapeutic effect was investigated and the properties of these vectors were optimized in order to improve their *in vitro* cell transfection rate and

thus promote the development of targeted delivery systems with therapeutic effect. The cytotoxicity of the systems was also evaluated.

Depending on the formulated system, the results have shown a variation in the characteristics of the formulated nanoparticles, either in terms of size, surface charge or induced cytotoxicity. It was possible to achieve biocompatible polyplexes, with good pDNA incorporation and effective delivery to cells.

Keywords

Cationic polymers; cell transfection; delivery systems; gene therapy; plasmid DNA; polyethylenimine.

Folha em branco

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Terapia génica	1
1.1.1. Terapia combinada.....	2
1.2. Características dos agentes terapêuticos.....	2
1.2.1. Membrana plasmática	3
1.3. ADN plasmídico	3
1.3.1. Proteína p53	4
1.4. Vetores de transporte	4
1.4.1. Propriedades dos vetores.....	5
1.5. Vetores virais vs. vetores não virais.....	5
1.5.1. Vetores orgânicos	7
1.5.2. Formação e características dos poliplexos	10
1.6. Etapas na transfeção celular	11
1.6.1. Internalização do poliplexo	11
1.6.2. Fuga da via endolisossomal.....	12
1.6.3. Descondensação do vetor	13
1.6.4. Internalização de pADN no núcleo	14
1.7. Polímero PEI	15
1.7.1. Polímero PEG	17
1.8. Mitocôndria.....	18
1.8.1. Funções mitocondriais.....	18
1.8.2. Estrutura e características	18
1.8.3. Doenças mitocondriais	20
1.8.4. Composto PEI-PEG-TPP	20
2. Objetivo	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Materiais.....	25
3.2. Métodos	25
Produção de pADN e formulação de nanopartículas.....	25
3.2.1. Crescimento bacteriano e condições de cultura	25
3.2.2. Lise celular	26
3.2.3. Purificação com coluna de troca aniónica	26
3.2.4. Eletroforese em gel de agarose.....	26
3.2.5. Formulação dos poliplexos	26

3.2.6.	Determinação da taxa de encapsulação de pADN	27
3.2.7.	Presença de PEI e PEI-PEG-TPP nos poliplexos	27
3.2.8.	Morfologia dos poliplexos	28
3.2.9.	Medição de carga de superfície dos poliplexos	28
3.2.10.	Cultura de células HeLa.....	28
3.2.11.	Avaliação de citotoxicidade	29
3.2.12.	Marcação do plasmídeo, núcleo e mitocôndria.....	30
3.2.13.	Plaqueamento e visualização no confocal	30
4.	Resultados e discussão.....	31
4.1.	Formulação de nanopartículas baseadas em pADN.....	31
4.2.	Análise espectral dos compostos	32
4.3.	Morfologia, tamanho e carga superficial das nanopartículas	33
4.3.1.	Morfologia dos poliplexos	34
4.3.2.	Tamanho dos poliplexos	35
4.3.3.	Carga de superfície dos poliplexos	35
4.4.	Análise citotóxica das nanopartículas	36
4.5.	Estudos <i>in vitro</i> em células cancerígenas	38
5.	Conclusão.....	41
6.	Perspetivas futuras	43
7.	Referências Bibliográficas.....	45
	Anexos.....	55

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura do poliplexo (A) e interação vetor/material genético na sua formulação (B), adaptado de [22, 34].	9
Figura 2 – Ilustração esquemática dos 3 tipos de associação vetor- material genético: encapsulação (A), complexação (B) e carga à superfície (C), adaptado de [36].	10
Figura 3 - Representação do fenómeno “esponja de protões”, adaptado de [46].	13
Figura 4 - Esquema representativo da formulação e entrada de poliplexos na célula por endocitose direcionados ao núcleo, adaptado de [43].	14
Figura 5 - Estrutura química do monómero do polímero PEI ramificado [57].	15
Figura 6 - Estrutura química do monómero do polímero PEG [20].	18
Figura 7 - Representação estrutural do composto trifenilfosfónio (TPP), adaptado de [78].	21
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da amostra de pADN inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados a rácio N/P=2 (B) e rácio N/P=5 (C) para os sistemas PEI/pADN (1) e PEI-PEG-TPP/pADN (2).	32
Figura 9 - Imagens SEM das nanopartículas formuladas pelos polímeros PEI (A, B) e PEI-PEG-TPP (C, D) a rácio N/P=2 (A, C) e 5 (B, D).	34
Figura 10 - Percentagens de viabilidade celular das células HeLa após 24h e 48 h de transfeção com os sistemas PEI/pADN (A) e PEI-PEG-TPP/pADN (B) a rácio N/P=2 e 5.	37
Figura 11 – Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência relativas à transfeção das células HeLa com o sistema PEI e PEI-PEG-TPP a rácio N/P=2 (A,C) e 5 (B,D) respetivamente.	39

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Vetores virais mais utilizados em protocolos de terapia gênica.	6
Tabela 2 - Percentagens de encapsulação do pADN pelos polímeros PEI e PEI-PEG-TPP, para sistemas formulados a rácios N/P=2 e 5.....	31
Tabela 3 – Tamanho (nm) dos poliplexos formulados pelos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP/pADN a rácio N/P=2 e 5.	35
Tabela 4 - Potenciais zeta (mV) dos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP/pADN a rácio N/P=2 e 5.....	36

Folha em branco

Lista de Anexos

Anexo 1 - Vetores orgânicos usados na entrega de material genético.	55
Anexo 2 - Espectro de ATR-FTIR (Transmitância (%) vs Comp. Onda (cm^{-1})) do pADN (A), PEI (B), sistema PEI/pADN a rácio N/P=2 (C) e a rácio N/P=5 (D).....	56
Anexo 3 - Espectro de ATR-FTIR (Transmitância (%) vs Comp. Onda (cm^{-1})) do pADN (A), PEI-PEG-TPP (B), sistema PEI-PEG-TPP/pADN a rácio N/P=2 (C) e a rácio N/P=5 (D).	57

Folha em branco

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPA	<i>l-3,4-dihydroxyphenylalanine</i>
DOPC	<i>1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i>
DOPE	<i>2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine</i>
DOTAP	<i>1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Espetroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
MTT	Tetrazólio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma reduzida)
nADN	Ácido desoxirribonucleico nuclear
NADP ⁺	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (forma reduzida)
p53	Proteína p53
pADN	Plasmídeo de ácido desoxirribonucleico

PAMAM	Poliamidoamina
PBS	Solução tampão fosfato salina
PEI	Polietilenimina
PEG	Poli (etileno glicol)
TPP	Trifenilfosfônio
PGLA	Poli-lactato-co-glicolato
PLA	Ácido poliláctico
PLL	<i>Poly(L-lysine)</i>
PDL	PD-L1
PMMH	<i>Thiophosphoryl-phenoxyethyl(methylhydrazono)</i>
PPI	Polipropilenoimina
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
TE	Taxa de encapsulação

Folha em branco

1. Introdução

Desde a proposta de modelo da estrutura em dupla hélice do ADN por Watson e Crick em 1953 até ao sequenciamento do genoma humano concluído em 2003 que a medicina moderna tem vindo a evoluir. Nos dias de hoje, conhecem-se muitos dos genes envolvidos na patogénese, que estão na origem a muitas doenças humanas adquiridas ou até mesmo hereditárias [1].

Todo o conhecimento, quer ao nível básico de estrutura da célula como de funções e processos metabólicos dos organelos na célula permitiu entender de que forma as células morrem num estado de doença [2].

Com a descoberta da tecnologia de ADN recombinante, tornou-se possível manipular qualquer gene a fim de serem usados com potencial fim terapêutico, por intermédio de técnicas de engenharia genética e biotecnologia, que permitem introduzir genes no organismo através de duas estratégias: vacinas de ADN para desencadear uma resposta imunológica, e a terapia génica para corrigir ou substituir algum defeito genético [3].

Ambas as estratégias têm por objetivo eliminar as causas das doenças, ao invés das terapias convencionais que atuam ao nível dos sintomas [4, 5].

1.1. Terapia génica

A terapia génica tem-se mostrado cada vez mais promissora no tratamento de doenças, uma vez que permite transferir material genético a células específicas de um paciente, aumentando a expressão de um ou mais genes de interesse, manipular genes defeituosos ou em baixa expressão, a fim de curar ou desacelerar o estado de uma doença [6].

Nesta terapia são introduzidos ácidos nucleicos às células que se vão intercalar com os pares de bases do seu genoma a fim de reparar, substituir ou adicionar genes, que, por sua vez expressam proteínas de interesse com efeito terapêutico.

Numa primeira fase, para se poder aplicar esta terapia é necessário amplificar o gene terapêutico no vetor de ADN, após identificar o gene mutado ou em falta. De

seguida, o gene terapêutico deve ser clonado no vetor de ADN e por fim, tirando proveito de uma célula hospedeira adequada, o vetor de ADN final deve ser amplificado [7].

Para se conseguir transfetar uma célula eucariótica é necessário encapsular o agente terapêutico num veículo de transporte, formando um sistema de entrega. O veículo vai permitir a entrega direcionada do gene terapêutico às células alvo, e por esta razão, é fundamental a escolha de vetores com propriedades adequadas [8].

Nas últimas décadas têm vindo a ser desenvolvidos sistemas de entrega cada vez mais seletivos, que sejam biocompatíveis, fáceis de produzir e otimizar e que demonstrem eficácia na internalização celular [3].

A principal vantagem da utilização da terapia génica deve-se ao facto, de permitir um tratamento menos invasivo, na medida em que é mais seletivo, originando menos efeitos secundários [9]. Pode ser dirigida tanto a células somáticas, afetando apenas o indivíduo alvo, tal como às células germinativas, apresentando potencial interesse na erradicação das doenças hereditárias [10].

1.1.1. Terapia combinada

A combinação apropriada de material genético e fármacos pode maximizar o efeito combinado dos dois agentes e assim melhorar o resultado terapêutico. Esta estratégia de co-entrega permite ação terapêutica destes dois agentes e permite, desta forma, reduzir a dose e concentração do fármaco utilizado, diminuindo a resistência das células aos fármacos [11].

Assim, os transportadores utilizados neste tipo de entrega têm de ter capacidade de entregar eficazmente o material genético e os fármacos às células alvo de forma controlada e precisa [12].

1.2. Características dos agentes terapêuticos

Durante a entrega de material genético surgem diversos obstáculos, entre os quais a barreira hematoencefálica, que por exemplo, continua a ser bastante difícil de atravessar, devido à sua constituição, com múltiplas junções estreitas com propriedades físicas e químicas que restringem o fluxo de solutos no sangue para dentro e fora do cérebro, limitando bastante a entrega de genes nesta região [13].

Assim, para que os agentes terapêuticos consigam alcançar as células ou tecidos alvo têm que apresentar estabilidade em fluidos biológicos, ser capazes de escapar ao sistema imunitário e a enzimas celulares, como as nucleases, assim como escapar à via endocítica ou superar diversas barreiras biológicas celulares, como a membrana plasmática e até nuclear.

1.2.1. Membrana plasmática

A membrana plasmática é uma estrutura que faz parte das células eucarióticas, constituída por compostos como glicoproteínas, glicerolfosfatos e proteoglicanos sulfatados, que lhe conferem uma carga superficial negativa e propriedades lipofílicas.

A carga da membrana é uma barreira que interdita a passagem de qualquer organismo (vírus e bactérias) ou substâncias externas à célula com carga negativa. Estudos evidenciam a existência de repulsões eletrostáticas entre a superfície celular e o genoma externo à célula, comprometendo precisamente a captação celular [14].

Por este motivo têm-se vindo a formular sistemas de entrega de material genético com propriedades de biocompatibilidade e carga que permitem melhorar a captação celular.

1.3. ADN plasmídico

O ADN plasmídico (pADN) é uma pequena molécula constituída por ADN de cadeia dupla circular que tem a capacidade de se replicar dentro da célula hospedeira. Esta molécula tem sido amplamente estudada pelas características bastante promissoras que apresenta como agente terapêutico.

Recorrendo a técnicas de engenharia genética é possível alterar ou inserir sequências transgénicas num pADN, que codificam para proteínas de interesse, como é o caso da proteína supressora de tumor p53. O facto de apresentar um risco baixo de mutagénese insercional, ser de fácil construção e produção, e ter elevada capacidade de armazenamento tornam a utilização do pADN vantajosa relativamente aos vírus ou sistemas de entrega de siARN's, que dada a sua natureza aniónica, são suscetíveis à degradação enzimática e remoção nos rins ou fígado [15].

Esta molécula é também de fácil obtenção sendo a sua produção possível, em larga escala, a partir de bactérias como a *Escherichia coli* (*E.coli*).

1.3.1. Proteína p53

A proteína p53, para além de outras funções, tem um papel fulcral na manutenção da integridade do genoma, estando envolvida em diversas vias metabólicas de reparação do ADN, regulação do ciclo celular e indução de apoptose. Esta proteína em particular é reconhecida pelo seu efeito supressor tumoral importante na regulação de alguns mecanismos celulares [16].

Para que uma célula se divida é necessário que alguns dos seus reguladores, como as ciclinas por associação a uma família de enzimas chamadas quinases ativem diversas proteínas alvo efetoras dentro da célula, que desencadeiam e controlam não só a interfase como a mitose da célula. A atividade destas ciclinas é influenciada por estímulos internos e externos à célula, tais como os fatores de crescimento que levam ao aumento da sua atividade, promovendo a divisão celular, ou ao invés danos no ADN, que diminuem ou bloqueiam completamente a atividade das ciclinas, interrompendo o ciclo celular.

É nesta fase que a expressão dos níveis da proteína p53 tem um papel fulcral, desencadeando a produção de proteínas inibidoras de quinases, bloqueando a sua função e ativando enzimas que reparam o ADN. Por fim, se a célula não conseguir reparar o ADN, a proteína p53 ativa a morte celular programada, funcionando como uma proteína indutora de apoptose, a fim de impedir a divisão celular e posterior passagem do ADN danificado à próxima geração [17]

Desta forma, baixos níveis de expressão de proteínas como a p53 em situações de falha de reparação de ADN danificado levam à proliferação celular descontrolada, dando origem a tumores. Assim, torna-se relevante a inserção de genes que codifiquem para essa proteína no núcleo das células tumorais [18].

1.4. Vetores de transporte

A entrega do plasmídeo a organelos celulares, como o núcleo ou a mitocôndria, apresenta algumas limitações, nomeadamente a dificuldade em atravessar a membrana celular devido à sua carga negativa e a necessidade de um veículo que direcione a entrega.

Existem diversos tipos de veículos: os de base orgânica, nos quais os polímeros são os mais utilizados e os de base inorgânica (nanotubos de carbono, cerâmicas, entre outros). Estes veículos devem ter carga positiva, de modo a facilitar o encapsulamento do plasmídeo (que apresenta carga negativa) e, deste modo, a formação de sistemas de entrega de pADN.

1.4.1. Propriedades dos vetores

Os vetores de transporte devem ser concebidos para serem capazes de transportar o material genético independentemente do seu tamanho e promover a libertação do material genético em locais específicos, de maneira a conseguir entregar o agente terapêutico de forma seletiva.

Devem promover elevada atividade biológica a baixas doses de administração, bem como possuir baixa toxicidade celular e capacidade de proteger os agentes terapêuticos da degradação química e enzimática dentro da célula. Também é importante serem de produção fácil e económica e estáveis em condições fisiológicas, que dê tempo suficiente para a sua total distribuição.

Para que possam ser facilmente internalizados pelas células, os sistemas de entrega devem possuir tamanho e carga superficial adequada. Dada a sua natureza, os vetores podem ser de dois tipos: virais e não virais.

1.5. Vetores virais vs. vetores não virais

Os vetores virais, tal como o nome indica são vírus, que têm a capacidade de invadir as células e intercalar o seu material genético nas mesmas, com a finalidade principal de auto-replicar o seu genoma. Recorrendo a técnicas de engenharia genética, é possível, nos dias de hoje substituir parte do seu genoma, responsável pela patogenicidade, por um gene terapêutico de interesse [19].

São variados os vetores virais existentes, entre os quais, o retrovírus, grupo do qual fazem parte os lentivírus, adenovírus, entre outros. A utilização destes vetores como veículos de transporte tem mostrado elevada capacidade transducional e de expressão genética, contudo a recorrente utilização faz com que sejam pouco seguros por serem invasivos e induzirem um efeito tóxico nas células/tecidos, por interações inespecíficas com células indesejáveis [20].

Outras implicações que limitam a utilização destes vetores são a baixa capacidade de transdução de moléculas de elevado tamanho, a inflamação provocada nos tecidos, o ganho de resistência das células, levando à imunogenicidade das mesmas e a indução de mutações tumorigénicas (Tabela 1). Por fim, são de custo elevado e difícil produção [21].

Tabela 1 - Vetores virais mais utilizados em protocolos de terapia génica.

Tipos	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus [22, 23]	Alto grau de eficiência e estabilidade transducional	Local de ligação de genes não aleatório com preferência a intrões e regiões de início da transcrição; Ativação acidental de oncogenes endógenos.
Adenovírus [24]	Alta eficiência de transdução expressão génica; Capacidade de transporte de material genético superior ao retrovírus.	Capacidade de armazenamento insuficiente para acomodar genes de grande dimensão; Níveis transitórios de expressão génica, com rápida diminuição; Podem desencadear resposta imune e inflamatória grave.

Já os vetores não virais, apesar de apresentarem menor eficiência na transfeção celular, têm a capacidade de condensar material genético quer de pequenas como de grandes dimensões, possuem boas características de armazenamento, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, não são infecciosos e são facilmente captados pelas células.

São uma boa alternativa quando se pretende administrar repetitivamente um tratamento pelo facto de provocarem pouca resistência às células. Para além de tudo isto, são de fácil e económica produção e facilmente manipulados [25].

Estes vetores podem ser físicos, que aplicam uma força física na membrana celular capaz de neutralizar as cargas, permitindo a entrega intracelular do material genético ou químicos, por intermédio de péptidos, lípidos, polímeros ou substâncias inorgânicas [26].

De entre os sistemas de vetores que utilizam métodos físicos para destabilizar a membrana celular e fazer a entrega de material genético distinguem-se o ADN balístico (bombardeamento de genes) e a microinjeção. Estes sistemas de entrega recorrem também a estímulos externos a fim de aumentar a sua eficiência de transfeção, através da exposição das células a campos elétricos (eletroporação), ultrasons (sonoporação), pressão hidrodinâmica (hidroporação) ou lasers (fotoporação) [27].

Todos estes métodos são bastante invasivos e como alternativa têm vindo a ser estudados outros tipos de vetores que utilizam métodos químicos de entrega, por

intermédio de nanopartículas, que têm revelado enorme potencial ao nível dos sistemas de entrega de diversas moléculas terapêuticas, entre as quais material genético [28].

Desta forma, as nanopartículas podem ser de natureza inorgânica, em que o agente transportador se baseia em ouro, sílica, fosfato de cálcio e magnéticas ou natureza orgânica, podendo ser de base polimérica (polímeros naturais, sintéticos ou catiónicos, dendrímeros) ou lipídica (lipossomas, lípidos catiónicos, e sintéticos e nanopartículas poliméricas [25].

As nanopartículas inorgânicas apesar de apresentarem uma eficiência razoável na transfeção em geral, podendo esta ser aumentada com estímulos magnéticos externos, possuem uma elevada estabilidade estrutural, grande capacidade de carga e possibilidade de modificação da superfície com diferentes moléculas. Contudo também apresentam alguns inconvenientes como a baixa biocompatibilidade, acumulação no organismo e agregação de partículas nas células.

As nanopartículas de ouro, apesar de demonstrarem elevada eficiência na transfeção por absorção fototérmica e promoverem a libertação controlada do material genético, com a exposição continuada acumulam-se nas células, dado à sua elevada estabilidade química. Já as de sílica são de baixa toxicidade e de fácil funcionalização, contudo a transfeção não se demonstra tão eficiente, devido à interação entre proteínas plasmáticas [29].

Por fim, as nanopartículas magnéticas, tais como fulerenos e nanotubos de carbono, pontos quânticos, óxido de ferro ou prata mostram-se as mais promissoras para aplicações terapêuticas dado à transfeção ser bastante eficiente, pelo tamanho reduzido de partículas e a possibilidade de revestimento de superfície para facilitar a ligação ao material genético. Contudo ainda se desconhece-se ao pormenor a sua biossegurança e função a longo prazo [7].

1.5.1. Vetores orgânicos

Todas estas desvantagens tornam os vetores de natureza inorgânica pouco seguros quando comparados com os orgânicos, representados no Anexo 1.

Como se pode constatar, todos os vetores têm as suas vantagens e inconvenientes. No entanto, de entre os referidos, os que demonstram ser mais promissores são os polímeros e copolímeros, por apresentarem uma biodegradação rápida no organismo,

minimizando os efeitos tóxicos e de acumulação, baixa imunogenicidade e facilidade de produção [30].

Além disso, principalmente dos polímeros catiónicos, a facilidade com que se pode substituir ou adicionar grupos funcionais a fim de modificar a sua estrutura geométrica, comprimento ou peso molecular, faz com que sejam os mais promissores a serem usados em protocolos de terapia génica [25, 31]. Na Tabela 2 estão representados alguns dos vetores.

Tabela 2 – Tipos de polímeros utilizados como vetores.

Polímeros	Exemplos	Características
Naturais [26]	Proteínas, péptidos e polissacáridos (Quitosano)	Capacidade de circulação na corrente sanguínea durante longos períodos de tempo sem degradarem
Sintéticos (Poli ésteres) [27, 28]	PEI, PLL	Catiónicos (carga positiva), robustos, estáveis e de síntese relativamente fácil
	Dendrímeros (PPI, PDL, PAMAN, PMMH) ...	Propriedades anfipáticas permitem a entrega de material genético no interior ou à superfície do núcleo das células Baixa taxa de transfeção derivado à competição de interação celular entre a superfície da célula ou outros ligandos, como o ácido fólico
Copolímeros [26, 29]	Micelas	Propriedades anfipáticas permitem alterar a fluidez da membrana celular e escapar aos fagócitos Vetor mais eficaz no transporte de agentes terapêuticos com propriedades hidrofóbicas
	PLA e PLGA	Propriedades hidrofóbicas, biodegradáveis e biocompatíveis
	Poli (etileno glicol) (PEG)	Inerte de baixa densidade

Entre os demais, os que apresentam melhores propriedades são os sintéticos (catiônicos) e os copolímeros, em particular os polímeros PEI e PEG.

As cargas positivas à superfície de qualquer polímero sintético a pH neutro deve-se à elevada quantidade de átomos de azoto na sua constituição. Esta característica confere facilidade na complexação de material genético (ADN ou ARN) por estes vetores, uma vez que os grupos fosfato dos ácidos nucleicos apresentam carga negativa, levando à encapsulação do material genético no vetor após a neutralização de cargas [32].

Esta diferença de cargas, faz com que as interações criadas entre os grupos N-P sejam fortes, de alta energia, dado ao reduzido comprimento de ligação, promovendo a nanoformulação dos poliplexos.

Os poliplexos são definidos como partículas coloidais, de forma esférica e de tamanho variável, superior a 30 nm, com boas propriedades para a transfeção celular (Figura 1) [33].

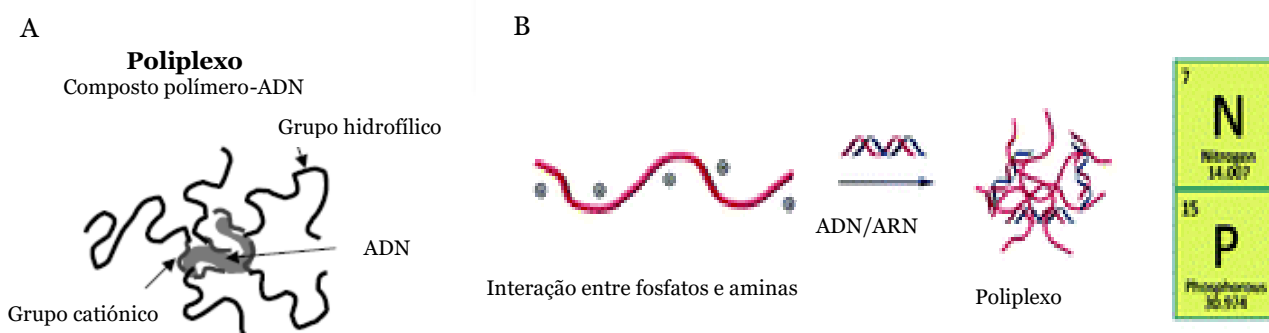


Figura 1 – Estrutura do poliplexo (A) e interação vetor/material genético na sua formulação (B), adaptado de [22, 34].

Estes vetores apresentam carga positiva distribuída em toda a superfície que lhes confere eficiência na transfeção. Ainda assim, por vezes estes sistemas têm dificuldade em ultrapassar algumas barreiras dentro e fora das células e provocam alguma citotoxicidade devido à sua carga positiva ou elevado peso molecular, alterando a morfologia das células, ou causando danos na membrana celular e reduzindo a atividade metabólica [34].

1.5.2. Formação e características dos poliplexos

A incorporação do material genético no vetor pode ocorrer por interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou conjugação química. O material genético pode ficar encapsulado no vetor, ficando “dentro” do vetor completamente protegido das condições envolventes, complexado, por adsorção química, ou aderido à superfície pela carga do vetor, por intermédio de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (Figura 2) [35, 36].

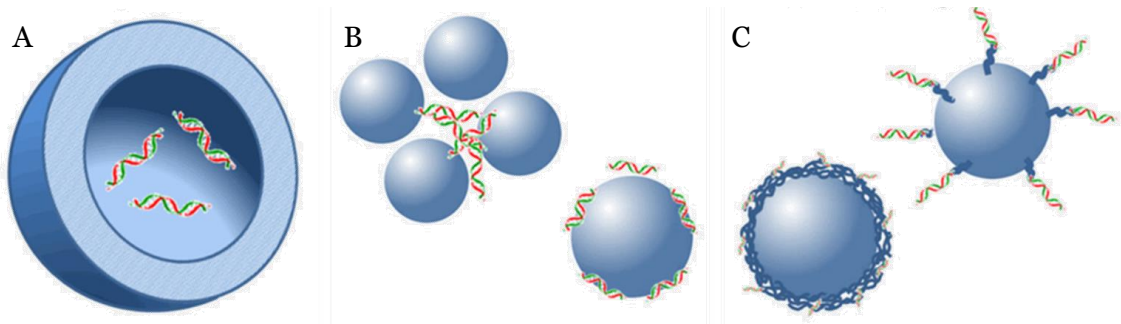


Figura 2 – Ilustração esquemática dos 3 tipos de associação vetor- material genético: encapsulação (A), complexação (B) e carga à superfície (C), adaptado de [36].

Os poliplexos, no geral são formados por interações eletrostáticas causadas pelas diferenças de cargas entre o vetor e o material genético [37]. A síntese destes compostos é simples na medida em que consiste apenas na mistura de uma solução de polímero com o material genético [38].

A alteração da composição química dos polímeros, e assim da sua estrutura, por introdução de grupos funcionais que conferem mais afinidade a alvos específicos, pode aumentar a eficácia de transfeção dos poliplexos e reduzir a sua toxicidade. Por esta razão são formulados e estudados uma grande variedade de derivados de polímeros [39].

O peso molecular e o tamanho dos polímeros utilizados, tem bastante influência na eficiência de transfeção. Nanopartículas que apresentem tamanhos abaixo de 400 nm oferecem menor perigo de coagulação sanguínea e agregação após administração intravenosa. Contudo, há que ter em conta as células alvo, uma vez que nanotransportadores com tamanhos de 50 a 100 nm correm o risco de se acumular no fígado e superiores a 200 nm no baço. Por outro lado, os capilares pulmonares, podem reter partículas de 2–5000 nm, enquanto que nanopartículas com diâmetro inferior a 5 nm, ficam retidas nos rins [40].

Desta forma, nanopartículas com tamanho entre 100 a 200 nm apresentam as melhores características para protocolos de terapia génica.

O rácio N/P, que é a relação entre a concentração molar de cargas positivas e negativas do polímero e material genético respetivamente, também tem bastante influência na eficiência da transfeção. Assim, a eficácia dos poliplexos depende da relação entre a eficiência de transfeção e a citotoxicidade induzida [41].

1.6. Etapas na transfeção celular

Após a formulação do poliplexos e entrega às células, surgem diversas barreiras intra e extracelulares a considerar, até que estes alcancem o alvo específico onde ocorrerá a transcrição e tradução do gene na proteína de interesse.

Primeiramente têm que ser estáveis em condições fisiológicas ao longo de todo o percurso até chegar às células. Têm de interagir com a membrana celular através da carga superficial ou por conjugação com moléculas constituintes.

Após atravessar a membrana tem que ter capacidade de escapar da via endolisossomal, conseguir desagregar o material genético do vetor para translocação nuclear [42].

1.6.1. Internalização do poliplexo

Para que estes poliplexos consigam atravessar a membrana celular têm que ter um tamanho preferencial de 10 a 500 nm. Os ligandos específicos do sistema de entrega promovem diferentes tipos de captação por afinidade preferencial a recetores na superfície da célula.

Desta forma, os polímeros catiónicos podem ser facilmente complexados com várias moléculas como proteínas, aptâmeros, entre outras, que se associam a recetores específicos expressos na membrana celular, constituído um sistema de *targeting* ativo.

Por outro lado, parâmetros como o pH, temperatura ou carga superficial também podem influenciar a entrada do poliplexo na célula, tratando-se neste caso de um sistema de *targeting* passivo que podemos usar a nosso favor com a utilização de compostos responsivos a estes parâmetros, facilitando a internalização celular [43].

A captação de material genético pelas células pode ocorrer por duas vias: fagocítica ou não fagocítica. A endocitose e a pinocitose são dois processos de captação das vias não fagocíticas.

A entrada da maioria dos poliplexos na célula ocorre por endocitose, que pode ser mediada por clatrilinas na captação de poliplexos com tamanho entre 60 a 80 nm ou por clatrilinas, quando apresentam um tamanho em torno de 100 nm. Os poliplexos de tamanho superior são captados por pinocitose [44].

Por este motivo é de extrema importância não só a otimização da carga de superfície como também do tamanho dos poliplexos usados em terapia génica.

1.6.2. Fuga da via endolisossomal

Durante o processo de captação celular, os poliplexos são internalizados por vesículas endossomais intracelulares e transportados pelo citoplasma ao longo da via endocítica, formando os endossomas. O transporte endossómico pode traduzir uma desvantagem para uma transfeção eficiente, uma vez que se poliplexos permanecerem por muito tempo nos endossomas serão provavelmente fundidos e degradados pelos lisossomas, que são vesículas com um pH em torno dos 5, com elevada concentração de enzimas, capazes de degradar o material genético, comprometendo assim a sua entrega [30, 45].

Alguns poliplexos têm a capacidade de fuga endolisossomal [46], devido a algumas características intrínsecas, tais como carga positiva e capacidade tampão, associada ao facto de conterem diversos grupos de aminas, com comportamento responsivo a diferentes valores de pH [47].

Estes apresentam alguns grupos de aminas desprotonadas a pH fisiológico extracelular e a valores de pH mais baixos, como o dos lisossomas. Têm a capacidade de absorver iões hidrogénio (H^+) presentes no interior dos lisossomas, o que leva à entrada de iões hidrogénio e conjuntamente cloreto (Cl^-) para dentro do mesmo por difusão passiva, pelos canais iónicos ATPases e de Cl^- respetivamente, presentes na membrana tanto dos endossomas como lisossomas [48].

Com o decorrer do processo, a integridade da membrana endossomal fica comprometida, uma vez que ocorrem repulsões entre os grupos amina protonados dos poliplexos, promovendo a expansão dos mesmos e é também gerado um gradiente osmótico para o interior da vesícula, levando ao seu inchaço pela entrada de água [49]. Consequentemente a membrana endossomal fica desestabilizada e ocorre a rutura do endossoma e o poliplexo é libertado no citoplasma (Figura 3) [30]. Este fenómeno de fuga endolisossomal é designado “esponja de protões” e é o mais recentemente aceite [50].

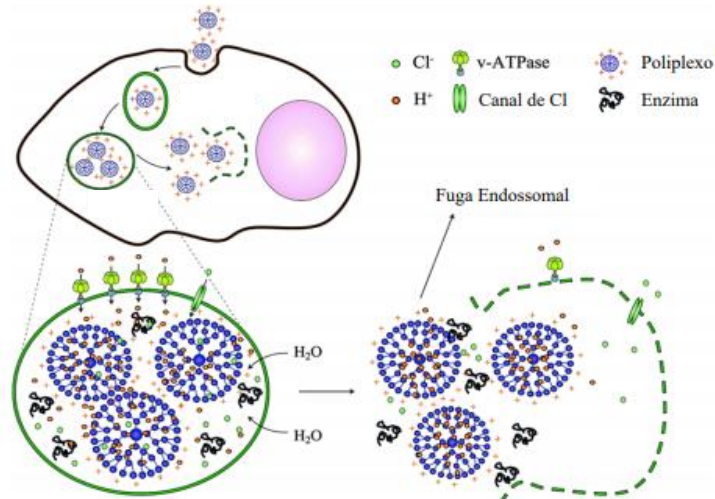


Figura 3 - Representação do fenômeno “esponja de prótons”, adaptado de [46].

Poliplexos conjugados com agentes químicos, como bases fracas, com propriedades tamponamento do pH nas vesículas endossomais podem promover fuga endossomal mais tardia, com maior potencial aplicação na entrega direcionada a alvos específicos.

1.6.3. Descondensação do vetor

Após a libertação dos poliplexos dos endossomas, estes podem interagir de forma não específica com microtúbulos ou proteínas motoras, devido à sua natureza catiónica, que são capazes de os conduzir ao longo do citoplasma. De seguida ocorre a libertação do pADN ao vetor de transporte, tanto mais rápida quanto menor a força de interação química entre ambos [51].

Posteriormente, o pADN continua a migrar no citoplasma em direção ao alvo específico que tem mais afinidade. Se for dirigido ao núcleo, onde será transcrito em mRNA e consequentemente, traduzido na proteína de interesse, surgem algumas barreiras biológicas nesta fase à passagem pela membrana nuclear, devido à presença de nucleases citosólicas capazes de degradar o pADN.

Por este motivo, o vetor utilizado no sistema de entrega deve estabelecer interações fortes com o pADN a fim de o proteger da degradação dessas mesmas nucleases, e conferir estabilidade ao pADN em condições fisiológicas para que não interaja com componentes do sangue a longo prazo e melhore o seu transporte ao longo da célula até à membrana nuclear [52].

Desta forma, a eficácia de transfeção também depende da estabilidade do políplexo no citoplasma da célula, promovida pelo elevado peso molecular e da capacidade de libertação do material genético [42].

1.6.4. Internalização de pADN no núcleo

Para a célula poder sintetizar a proteína de interesse, o pADN tem de ser internalizado pelo núcleo, onde é transcrito em mARN e consequentemente convertido no antígeno proteico.

Para atravessarem a membrana nuclear, os vetores não virais dependem da rutura da mesma aquando da divisão celular, ao invés dos virais que utilizam mecanismos de importação nuclear. Contudo, caso não ocorra divisão celular, a importação do pADN pode ocorrer por intermédio diversos processos, dependendo do seu tamanho.

Plasmídeos com tamanho inferior até 10 nm passam diretamente através dos poros da membrana, por interação inespecífica do material genético a proteínas expressas na membrana enquanto que os de tamanho superior (até 25 nm) são transportados através de proteínas denominadas carioferinas (Figura 4) [43].

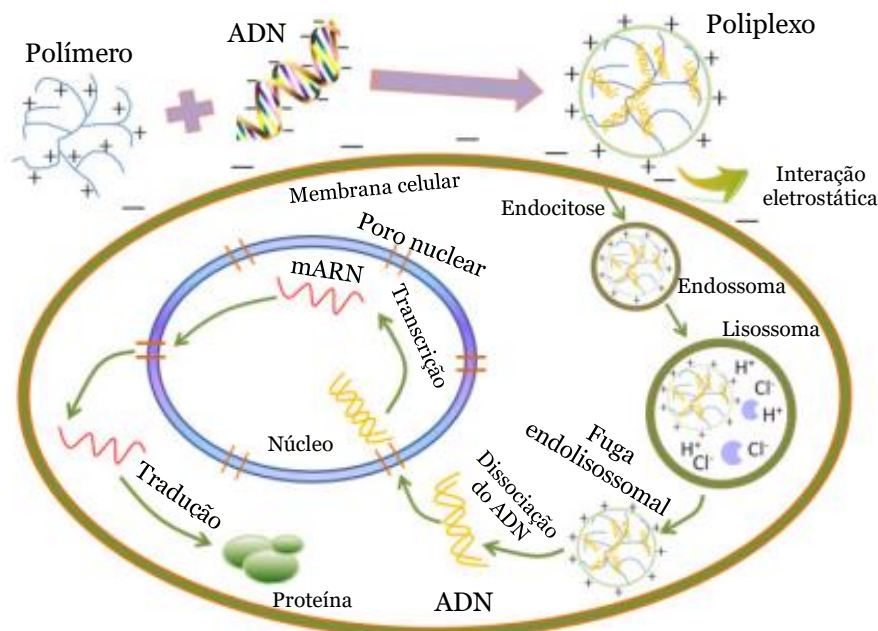


Figura 4 - Esquema representativo da formulação e entrada de políplexos na célula por endocitose direcionados ao núcleo, adaptado de [43].

Em suma, para que os políplexos garantam uma eficiente transfeção celular e baixa citotoxicidade têm que conseguir encapsular eficazmente o material genético, apresentar estabilidade em condições fisiológicas, ter capacidade de degradação na circulação sanguínea, promover a entrada nas células-alvo, ter capacidade de fuga endolisossomal e eficiência na entrega do material genético ao alvo [53].

1.7. Polímero PEI

O polímero catiónico PEI tem-se mostrado um veículo de sistema de transporte bastante eficaz entre os vários polímeros catiónicos em diversos estudos, dado às suas elevadas taxas de transfeção na entrega de ácidos nucleicos a diversas linhas celulares.

Este polímero apresenta vários grupos amina na sua constituição, que fazem com que seja fácil a sua interação com moléculas carregadas negativamente e possibilitam também a sua modificação química, bem como a formulação de complexos PEI/ADN. Além disso, não necessita de condições específicas de armazenamento, sendo estável em solução por vários anos [54].

Pode apresentar diversos pesos moleculares e ter uma estrutura linear ou ramificada, sendo esta a de maior interesse ao nível da terapia génica, nomeadamente a de 25 kDa (Figura 5) [55], devido ao facto de promover um melhor encapsulamento do ADN e portanto dar origem políplexos de menor tamanho [56].

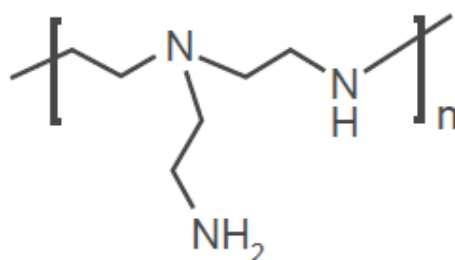


Figura 5 - Estrutura química do monómero do polímero PEI ramificado [57].

Este polímero é composto por 25% de aminas primárias, 50% de aminas secundárias e 25% terciárias, em que a valores de pH de 5 e 7 apenas 20 a 40% das aminas são protonáveis, respetivamente.

A elevada densidade de grupos amina protonados a diversos valores de pKa, conferem-lhe características de tamponamento intrínsecas em resposta aos diferentes

valores de pH do meio, o que facilita a ligação celular e a endocitose a pH fisiológico e faz com que seja mais eficaz que o PEI linear, em que todos os grupos amina são protonáveis [14, 57].

Durante o processo de captação celular, a carga positiva do polímero permite a fuga endolisossomal pelo processo descrito na alínea 1.6.2., devido ao seu grau de ionização responsivo ao pH [56].

Apesar dos poliplexos formados pelo polímero PEI serem consideravelmente maiores que os lipoplexos por exemplo, ou formados por outros polímeros devido à sua elevada carga, a elevada capacidade de condensação de ADN por parte do PEI 25kDa permite formar poliplexos mais pequenos (em torno dos 200 nm) que o PEI ramificado de baixo peso molecular, de estrutura linear ou quaisquer outros polímeros de peso molecular inferior, o que facilita a passagem dos mesmos ao longo da membrana celular no processo de captação celular [58, 59].

Quanto ao processo de transfeção, este polímero atua na membrana celular como os outros polímeros catiónicos, por interações eletrostáticas entre o seu grupo amina, carregado positivamente, e o grupo fosfato de ADN, carregado negativamente, neutralizando assim a carga à superfície, despolarizando a membrana [61]. O processo de endocitose dos poliplexos, formados pelo polímero PEI pode ser mediado por clatrolinas ou clatrininas, enquanto que o processo de endocitose dos lipoplexos é mediado apenas por clatrininas [62].

A utilização do polímero, na forma ramificada, embora apresente maior eficácia na transfeção que o PEI linear, pela carga superior e elevada interação ADN/polímero, dificulta a descondensação e libertação correta do ADN do poliplexo. Também induz citotoxicidade aguda *in vivo* a concentrações mais elevadas, devido à destabilização da membrana celular dos glóbulos vermelhos, conduzindo à ativação de processos de autofagia, apoptose ou até necrose [53, 63].

Para além disso, os poliplexos formulados tem tendência a agregar em condições fisiológicas, estabelecem algumas interações inespecíficas e apresentam baixa biodegradabilidade, por conterem muitas ligações C-C e C-N, podendo levar à rutura da membrana da célula e conseqüente morte celular [59].

A formulação dos poliplexos também constitui um passo limitante na eficiência de transfeção. Poliplexos formulados a valores de rácio N/P superiores, ou seja, com maior densidade de carga positiva e carga superficial associada, embora apresentem maior eficácia na transfeção, têm maior dificuldade de desempacotamento dos lisossomas, induzindo maior citotoxicidade [64].

Todas estas desvantagens associadas à forte interação entre o PEI e o ADN comprometem a eficiência da transfecção *in vivo*, limitando ainda o seu uso em aplicações clínicas, sendo portanto de extrema importância a otimização das suas propriedades [65].

Por todas estas razões, este polímero deve ser modificado, seja por diminuição da sua carga, massa molecular ou por conjugação com outros copolímeros, como o PEG [20].

1.7.1. Polímero PEG

Uma maneira de diminuir consideravelmente a toxicidade do PEI é reduzir a carga à superfície por associação ao polímero PEG, promovendo desta forma a libertação do poliplexo no citoplasma celular após a fuga endossômica, pela diminuição a força de interação ADN/PEI [20].

O polímero PEG é inerte, promove a estabilidade coloidal, reduz a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, aumenta a biodisponibilidade dos poliplexos na corrente sanguínea e confere capacidade de fuga ao sistema imunitário (Figura 6).

Apresenta propriedades hidrofílicas, e portanto aumenta a solubilidade dos complexos polímero/ADN em água [20]. O PEG tem a capacidade de gerar uma camada de hidratação à volta dos poliplexos, o que limita a interação dos mesmos com proteínas sanguíneas ou outros poliplexos, sendo por isso considerado furtivo.

Desta forma, o tempo de circulação dos poliplexos na corrente sanguínea é prolongando, diminui a agregação dos poliplexos, favorece a biocompatibilidade e a transfeção de genes, contudo a interação do polímero com a bicamada lipídica das células é mais reduzida, o que pode limitar a sua internalização pelas células [66, 44].

Outra desvantagem que o PEG apresenta está relacionada com o elevado peso molecular e densidade das suas cadeias, que dificulta a complexação e libertação do pADN nas células [67].

Por fim pode ser usado como agente espaçador, permitindo conjugar ligandos de outros polímeros ou compostos a grupos funcionais da sua constituição, conferindo maior direcionamento dos poliplexos a alvos específicos [20].

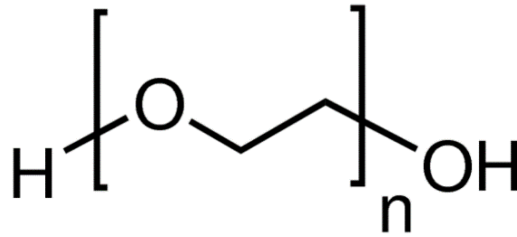


Figura 6 - Estrutura química do monómero do polímero PEG [20].

1.8. Mitocôndria

A mitocôndria é um organelo intracelular que evoluiu de uma relação entre microrganismos aeróbios e células eucarióticas primordiais. Encontra-se no citoplasma e tem como principal função a fosforilação oxidativa, em que utiliza o oxigênio da célula para produzir energia útil, na forma de ATP, indispensável nas mais diversas funções metabólicas e processos de manutenção/reparação celular [68].

1.8.1. Funções mitocondriais

A mitocôndria desempenha um papel importante na regulação do equilíbrio osmótico da célula, controlo genético, regula a homeostase de ferro e cálcio, é responsável pelo catabolismo de carboidratos, alguns aminoácidos e gordura e regula e sinaliza as células à apoptose, através do transporte iónico. Apesar de gerar espécies reativas de oxigênio no processo de fosforilação oxidativa, também intervém na regulação das mesmas [3, 68].

O incorreto funcionamento da mitocôndria está na origem de diversas doenças degenerativas e distúrbios humanos, começando por prejudicar órgãos com altos requisitos energéticos, como músculos, coração, sistemas renais e endócrinos [69, 70].

1.8.2. Estrutura e características

A mitocôndria é constituída por uma dupla membrana, formada por membrana interna, externa, espaço intermembranar e matriz mitocondrial. É na membrana interna que estão presentes as proteínas e enzimas necessárias à realização das principais funções metabólicas da mitocôndria, como a obtenção de energia através da cadeia transportadora de eletrões e a troca de iões.

Possui cristas, que são pequenas vilosidades que permitem aumentar a sua superfície, bem como elevado potencial de membrana, cerca de 150 a 180 mV, a fim de manter o seu potencial de oxidação-redução, com a homeostase dos íons cálcio na célula, que se mantém por possuir capacidade de bombardeamento de prótons através da sua membrana interna [72].

1.8.2.1. Genoma mitocondrial

Para além do núcleo, a mitocôndria possui o seu próprio genoma, o ADN mitocondrial (mtADN). Este genoma está presente na matriz mitocondrial, é de cadeia dupla circular fechada e tem cerca de 16,6 kpb. Replica-se independentemente do restante ADN genómico da célula e está presente em grandes quantidades de cópias.

Contém 37 genes, dos quais 22 genes que codificam o tARN, 13 genes que codificam subunidades do sistema de fosforilação oxidativa e por fim 2 genes que codificam o rARN. É constituído por duas cadeias de diferentes constituição e densidade, a cadeia leve (interior) e a cadeia pesada (exterior), constituídas maioritariamente por citocinas e guaninas respetivamente.

A replicação de novas cadeias de mtADN inicia-se a partir da origem de replicação da cadeia pesada até à origem de replicação da cadeia leve, onde é sintetizada uma nova cadeia em sentido contrário até ambas as cadeias estarem replicadas [73].

1.8.2.2. Mecanismos de auto-reparação

A mitocôndria também apresenta alguns mecanismos autónomos de reparação de mtADN com mutações, que permitem remover ou substituir bases lesadas por excisão de bases (REB).

Este mecanismo REB tem também capacidade de reparar alguns danos graves causados por quebra espontânea de cadeias de bases, como a depurinação, em que ocorre a perda de uma base púrica ou despirimidinação (perda de uma base pirimídica) [74]. Pode ocorrer por via curta, em que é reparado apenas um nucleótido ou por via longa, reparando no mínimo dois nucleótidos. A ineficiente reparação de todos estes erros e danos pode dar origem a diversas doenças mitocondriais [75].

1.8.3. Doenças mitocondriais

As doenças mitocondriais humanas devem-se a mutações herdadas pela mãe ou então mutações espontâneas que ocorrem no nADN ou mtADN. Alguns fatores como a falta de proteínas reguladoras de genes (histonas), de mecanismos de reparação do ADN, a exposição do genoma mitocondrial a radicais livres gerados na cadeia transportadora de elétrons ou a radiação ultravioleta [76], infecções virais, não possuir intrões, as inúmeras cópias de mtADN na mitocôndria e mecanismos de autorreplicação tornam-na mais suscetível a mutações no seu ADN relativamente ao ADN nuclear [77].

A inadequada produção de energia na mitocôndria, por mutações no mtADN, pode ainda condicionar o correto funcionamento de alguns tecidos que exigem uma grande quantidade de ATP como o cérebro, músculo, coração, rins, fígado e sistemas endócrinos, originando inúmeras doenças como Neuropatia ótica Hereditária de Leber, Encefalomiopatia mitocondrial, Epilepsia mioclônica, Síndrome de Leigh, entre outras [78].

1.8.4. Composto PEI-PEG-TPP

O polímero PEI 25 kDa quando complexado com o TPP, adquire afinidade pela mitocôndria e desta forma é possível a entrega de forma direcionada do pADN à mitocôndria. Para que o PEI consiga estabelecer ligação a este derivado TPP, é necessário um agente espaçador, como o polímero PEG, que derivado às suas propriedades hidrofílicas evita a interação com componentes do sangue ou outras nanopartículas. Desta forma o efeito destes poliplexos na corrente sanguínea não é comprometido [79].

Apesar deste polímero tornar o composto mais biocompatível e com a capacidade de escapar ao sistema imunitário, a sua utilização em grandes quantidades está também associada a uma diminuição na internalização dos poliplexos e dificulta o desempacotamento dos mesmos, impedindo a correta libertação do ADN ao alvo específico [80].

O TPP é um composto lipídico catiónico com afinidade à mitocôndria, que tal como outros péptidos (guanidina, rodamina, F16) é amplamente utilizado em sistemas de direcionamento de terapia génica. Este é o mais promissor devido à sua elevada carga positiva que faz com que se acumule e penetre facilmente a membrana mitocondrial, que tem um potencial altamente negativo, nomeadamente no interior (até -180 mV).

É constituído por um átomo de fosforo de carga positiva cercado por 3 grupos fenil que lhe conferem propriedades hidrofóbicas (Figura 7) [81].

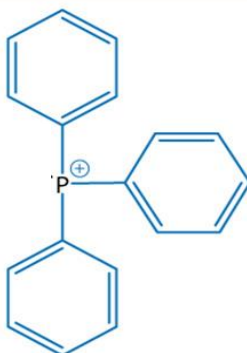


Figura 7 - Representação estrutural do composto trifenílfosfónio (TPP), adaptado de [78].

Este composto, é captado e internalizado por transporte ativo que ocorre através de bombas de prótons existentes quer na membrana plasmática quer mitocondrial. Durante o transporte é gerada uma variação de potencial que facilita a captação de novos compostos que é tanto mais elevada quanto maior a sua carga à superfície.

Durante a internalização do TPP é originada uma diferença de potencial entre -30 e 60 mV na membrana citoplasmática e de até -180 mV na membrana mitocondrial, o que facilita ainda mais a sua acumulação. Por todas estas razões, o uso do composto PEI-PEG-TPP 25 kDa é bastante promissor para fins de terapia génica mitocondrial [81].

2. Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo o desenho e formulação de dois sistemas de transporte de pADN para implementação de protocolos de terapia génica.

Com o objetivo de explorar abordagens de terapia génica nuclear e mitocondrial, foram concebidos dois vetores baseados em pADN com capacidade de entrega de material genético ao núcleo e mitocôndria, respetivamente.

As propriedades dos sistemas de entrega formulados como morfologia, tamanho, carga superficial, capacidade de encapsulação de pADN e biocompatibilidade foram estudadas por meio de diversas técnicas e otimizadas a fim de promover a transfeção celular.

Foram realizados estudos de transfeção *in vitro* em células de tumor cervical (HeLa) a dois rácios de razão de cargas dos grupos amina e cargas dos grupos fosfato (N/P) a fim de testar a eficiência de captação e internalização celular, para assegurar a expressão génica e conseqüente produção da proteína de interesse.

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver formulações de entrega de pADN com propriedades adequadas para uma elevada expressão génica no núcleo e mitocôndria, contribuindo deste modo para a implementação da terapia génica nuclear ou mitocondrial em contexto terapêutico de doenças como cancro ou patologias mitocondriais.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Na realização deste trabalho foram usados o meio LB-agar e Terrific Broth, obtido da *Panreac*, o EDTA, os suplementos triptona e extrato de levedura adquiridos à empresa Bioakar Diagnostics, glicerol, solução de sais (K_2HPO_4) e o antibiótico ampicilina, o DNA plasmídico pcDNA3-FLAG-p53, obtido na Addgene, o kit *NZY Maxi Prep Kit* e o reagente Greensafe adquirido na NZYTech o polímero polietilenimina ramificado (25 kDa), o polímero de polietilenimina modificado com trifetilfosfónio (TPP), o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), as sondas fluorescentes marcadoras do plasmídeo isotiocianato de fluoresceína (FITC), do núcleo 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) e mitocôndria (MitoTracker) adquiridos da empresa Sigma Aldrich e água desionizada ultrapura, recorrendo à purificação com o sistema Mili-Q da Milipore.

3.2. Métodos

Produção de pADN e formulação de nanopartículas

3.2.1. Crescimento bacteriano e condições de cultura

Foi usada a bactéria *E.coli* como hospedeira para amplificação do plasmídeo pcDNA3-FLAG-p53. Para tal, este hospedeiro previamente transformado com o pADN inoculou-se inicialmente em meio sólido em placas de LB-agar (25g/L) com ampicilina (30 µg/mL) a 37°C, deixando a crescer durante a noite.

A ampicilina não afeta o crescimento e replicação destas células uma vez que o plasmídeo contem o gene de resistência ao antibiótico. De seguida inocularam-se em 2 erlenmeyers de 250 mL, com 62,5 mL de meio Terrific Broth, contendo 20 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0.017 M KH_2PO_4 , 0.072 M K_2HPO_4 , suplementado com ampicilina a 100 µg/mL, para a pré fermentação a 37°C num agitador orbital Agitorb 200 da Aralab (Albarraque, Portugal), a 250 rpm. Atingida a $DO_{600nm}=2,6$, medida com o Ultrospec 3000 UV-Visible Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) dividiu-se o meio por 6 novos erlenmeyers de 500 mL com 125 mL do mesmo meio e iniciou-se a fermentação. O crescimento bacteriano foi

interrompido no final da fase log, depois de se atingir uma $DO_{600\text{ nm}} \approx 7$. As bactérias foram recolhidas por centrifugação e armazenadas a -20°C .

3.2.2. Lise celular

Usou-se um kit da empresa NZYTech de pré-purificação para promover a lise do plasmídeo seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.2.3. Purificação com coluna de troca aniónica

Para proceder à purificação da amostra, ajustaram-se as condições de sal e pH para promover a ligação do plasmídeo à coluna de bancada. Depois injetou-se na coluna uma solução de concentração média de sal começando por eluir impurezas como ARN, proteínas e outros contaminantes de baixo peso molecular. Por último adicionou-se uma solução com maior teor de sal para eluir o pADN.

Concentrou-se a solução eluída através da adição de isopropanol e desta forma recuperou-se o plasmídeo, maioritariamente na sua forma superenrolada, para utilização na formulação das nanopartículas.

3.2.4. Eletroforese em gel de agarose

Fez-se a avaliação do conteúdo de ácidos nucleicos presente nos sobrenadantes da amostra pré-purificada de pADN por eletroforese, utilizando um gel de agarose (Hoefer, Holliston, MA, USA) corado com $0,6\ \mu\text{L}$ de GreenSafe.

A eletroforese foi realizada a 120 Volts durante 40 min em tampão TAE (40 mM base Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, $\text{pH}=8$) e o gel revelado recorrendo à luz ultravioleta (UV) (312 nm), com utilização do sistema Uvitec Cambridge Fire-Reader UV (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK).

3.2.5. Formulação dos poliplexos

Para a formulação dos poliplexos preparou-se uma solução stock a diferentes rácios tanto de polímero PEI como PEI-PEG-TPP considerando a massa inicial e

dissolveram-se tanto o pADN como os polímeros em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5) para formação das respectivas nanopartículas.

Adicionaram-se 100 µL dos polímeros gota a gota, com agitação constante no vortex, durante 1 min (40 segundos gota a gota + 20 segundos de vortex) a 400 µL de solução de pADN com concentração 20 µg/mL, medida a 260 nm no equipamento nanodrop. o

Este procedimento foi realizado em triplicado para dois rácios N/P diferentes: 2 e 5. Após a formulação, deixou-se estabilizar a solução 30 min à temperatura ambiente.

De seguida centrifugou-se a 10000 G, durante 20 min, a 4º, guardou-se o pellet precipitado e recolheu-se o sobrenadante para análise da eficiência de encapsulação de pADN quer pelo cálculo de concentração no nanodrop, quer por eletroforese em gel de agarose.

3.2.6. Determinação da taxa de encapsulação de pADN

Para determinar a eficiência de encapsulação de pADN, após a complexação procedeu-se a uma centrifugação das amostras, a 10,000 rpm por 20 min, para recolha do respetivo pellet, contendo as nanopartículas. A quantidade de pADN não complexada foi determinada espectrofotometricamente por medição da absorvência do sobrenadante a 260 nm usando o Nanodrop. A taxa de encapsulação (TE) de pADN foi determinada através da equação:

$$\%TE(pDNA) = \frac{pADN \text{ adicionado} - pADN \text{ no sobrenadante}}{pADN \text{ adicionado}} \times 100$$

Caracterização físico-química dos políplexos

3.2.7. Presença de PEI e PEI-PEG-TPP nos políplexos

Com o objetivo de averiguar a formação dos complexos baseados em pADN, procedeu-se à análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Adquiriu-se o espetro de absorção em 120 scans com uma largura espectral entre os 4000 e os 525 cm⁻¹ e uma resolução espectral de 32 cm⁻¹ das amostras de pADN,

polímero e nanopartículas, utilizando o espectrofotômetro Nicolet iS10 FTIR (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), operado no modo ATR (Smart iTR diamond ATR).

3.2.8. Morfologia dos políplexos

As nanopartículas foram lavadas com 500 µL de água Milli Q e centrifugadas a 10000 rpm, durante 12 min por 4 vezes a fim de eliminar resíduos da amostra.

Para análise da morfologia dos complexos desenvolvidos foi utilizada a microscopia eletrônica de varrimento (SEM). Para realização das experiências, ressuspendeu-se o pellet contendo as nanopartículas em 40 µL de tungstênio 2% e diluiu-se 1µL desse volume em 19µL de água Milli Q. Foram retirados 10 µL desta solução diluída e colocados numa lamela redonda a secar “*overnight*” à temperatura ambiente.

Após este procedimento, a amostra foi revestida com ouro usando o aparelho Emitech K550 sputter coater (London, England) e analisou-se a morfologia das nanopartículas por SEM (Hitachi S-2700, Tokyo, Japan).

3.2.9. Medição de carga de superfície dos políplexos

Fez-se a medição dos tamanhos e potenciais zeta das nanopartículas através da técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) no aparelho Zetasizer Nano Zs, a 25°C. Centrifugaram-se os sistemas formulados, nas mesmas condições das lavagens e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o pellet em 600 µL de água Milli Q e adquiriram-se os valores médios de 3 medições de carga superficial das nanopartículas (ζ) através do *software* Malvern Zetasizer.

3.2.10. Cultura de células HeLa

Realizou-se o cultivo das células HeLa em meio DMEM suplementado com 10% de FBS soro fetal bovino inativado pelo calor e 1% de estreptomicina e mantiveram-se as células numa incubadora à temperatura de 37°C e uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

Viabilidade celular

3.2.11. Avaliação de citotoxicidade

Avaliou-se o perfil citotóxico das nanopartículas formuladas nas células HeLa, através do ensaio de MTT. Este ensaio consiste na metabolização do reagente MTT por parte das células viáveis, originando um produto de coloração roxa, o que não acontece caso as células estejam mortas. Desta forma a intensidade da coloração roxa em solução é o parâmetro utilizado para quantificação de viabilidade de células testadas.

A incubação dos vários sistemas formulados nas células HeLa foi realizada durante 24h e 48h em placas separadas para quatro sistemas: controlo negativo, onde se fez o crescimento as células em meio sem sofrerem transfeção, positivo, onde se adicionou etanol para morte das células e as nanopartículas formadas a rácios 2 e 5.

No primeiro dia de preparação foram plaqueadas 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços e realizados quintuplicados para cada sistema. No dia seguinte, pelo menos 12h antes de transfetar as células com as nanopartículas, mudou-se de meio das células de completo para simples, a fim de facilitar a captação celular das nanopartículas. Seguidamente, as células foram transfetadas adicionando 0,3 µg de nanopartículas os vários sistemas testados, a cada poço.

Parou-se a transfeção após 6h com a troca de meio simples para completo. Ao fim de 24h de incubação, adicionou-se aos poços das placas respetivas 10 µL de MTT e levaram-se a incubar 2h na estufa isoladas com papel de alumínio para evitar o contacto com a luz. De seguida retirou-se o meio e adicionou-se 100 µL de DMSO a cada poço.

Por fim levaram-se as placas ao agitador orbital com folha de alumínio durante 30 min e procedeu-se à leitura de absorvência de cada poço a 570 nm, utilizando o espetrofotómetro XMark microplate. Para o estudo de viabilidade celular às 48h repetiu-se no dia seguinte o procedimento descrito.

Avaliação de transfeção celular por microscopia de fluorescência confocal

A capacidade de transfeção dos sistemas foi verificada por intermédio de técnicas de microscopia de fluorescência confocal. Para se conseguir visualizar a internalização do pADN na célula, foram usadas sondas fluorescentes apropriadas para marcação do vetor, e dos organelos celulares tais como o núcleo e a mitocôndria.

3.2.12. Marcação do plasmídeo, núcleo e mitocôndria

Marcou-se 8 μL de plasmídeo através da adição de 75 μL de tampão e 2 μL de FITC.

As amostras foram colocadas em constante agitação durante 4h à temperatura ambiente e protegidas da luz. Adicionou-se 1 volume de 3 M NaCl (85 μL) e 2,5 volumes de etanol 100% (212,5 μL) e incubaram-se as amostras a -20°C durante a noite.

Após dois dias, as amostras foram centrifugadas a 4°C , durante 30 min a 12 000 G, descartou-se o sobrenadante lavou-se o pellet com etanol 75 % e repetiu-se o procedimento até não ser perceptível a coloração laranja.

Para marcação do núcleo e mitocôndria adicionou-se 200 μL de DAPI e MitoTracker, respetivamente, a cada poço de células.

3.2.13. Plaqueamento e visualização no confocal

Foram plaqueadas 1×10^5 células por poço em placas de 12 poços, adicionando 8 μg de pADN, encapsulado nos sistemas testados, a cada poço.

Passadas 2h de transfeção, levou-se a placa ao microscópio confocal de varredura a laser LSM710 (Carl Zeiss, Alemanha), para analisar a eficiência de transfeção dos vetores formulados a vários rácios N/P, através do programa ZEN.

4. Resultados e discussão

De acordo com o objetivo deste projeto de desenvolvimento de vetores inovadores para transporte de pADN para aplicação terapêutica, foi considerado o polímero PEI (25 kDa) devido, essencialmente, às suas propriedades catiónicas que permitem uma forte interação com o pADN promovendo a sua condensação [82].

Esta estratégia foi utilizada para encapsular o pADN em partículas nanométricas de morfologia e carga superficial adequadas à captação e internalização celular. Assim, nesta secção apresentam-se os resultados de formação e caracterização dos dois sistemas baseados em pADN e é feita a análise da capacidade de transfeção celular dos vetores.

4.1. Formulação de nanopartículas baseadas em pADN

Após a formulação dos poliplexos a rácio N/P=2 e 5, que pela literatura apresentam a melhor relação transfeção eficiente/citotoxicidade induzida [83], foi medida a quantidade de pADN não incorporado, presente nos sobrenadantes resultantes da centrifugação dos sistemas.

Foram realizadas medições em triplicado, através da leitura das absorvências a 260 nm pelo espectrofotómetro UV e feita a média dos valores, para reduzir possíveis erros de medição. As percentagens de encapsulação dos polímeros PEI e PEI-PEG-TPP, calculadas por aplicação direta da equação descrita na alínea 3.2.6 estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Percentagens de encapsulação do pADN pelos polímeros PEI e PEI-PEG-TPP, para sistemas formulados a rácios N/P=2 e 5.

		Polímero	
		PEI	PEI-PEG-TPP
Rácio N/P	2	94,17 ± 0,83	92,50 ± 2,89
	5	95,83 ± 0,83	95,83 ± 0,42

Por análise dos valores obtidos, constata-se que tanto o polímero PEI quanto o PEI-PEG-TPP são capazes de encapsular eficazmente o pADN, apresentando maiores percentagens de encapsulação a rácio N/P=5. Um rácio mais elevado promove a interação do pADN com os polímeros e desta forma uma compactação mais eficiente do pADN [84].

A maior capacidade de encapsulamento de pADN pelo PEI de estrutura ramificada comparada ao PEI na estrutura linear já teria sido relatada em estudos anteriores. Também está descrito que a capacidade de encapsulamento do PEI é tanto maior quanto o seu peso molecular [85].

Estes resultados são validados pelas imagens de eletroforese realizada em gel de agarose (Figura 8), onde não se revelaram bandas características do pADN no gel nos poços que foram injetados com o sobrenadante da formulação PEI/pADN e PEI-PEG-TPP/pADN em ambos os rácios N/P, o que significa que praticamente não existe pADN livre e que o mesmo foi encapsulado em nanopartículas, a ambos os rácios.

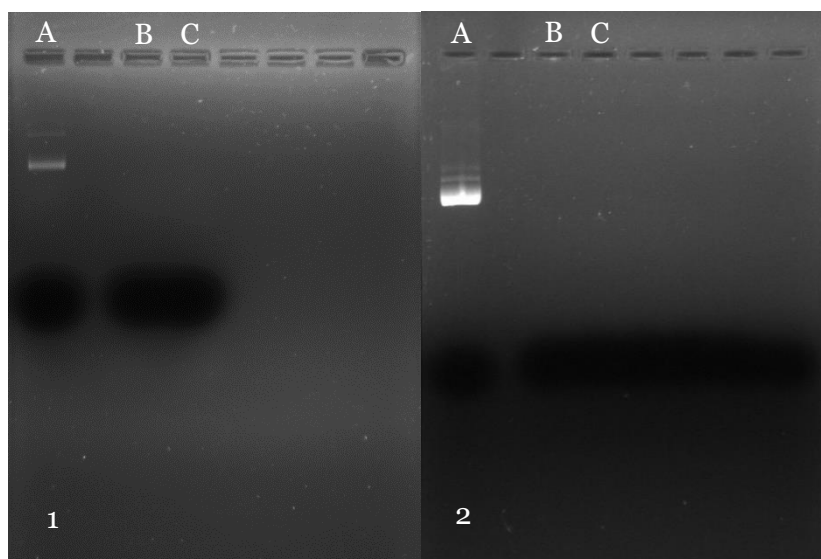


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da amostra de pADN inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados a rácio N/P=2 (B) e rácio N/P=5 (C) para os sistemas PEI/pADN (1) e PEI-PEG-TPP/pADN (2).

4.2. Análise espectral dos compostos

Para avaliar a incorporação do plasmídeo em ambos os sistemas das nanoformulações a rácios N/P=2 e 5 realizou-se uma experiência FTIR.

No Anexo 2 e Anexo 3, são apresentados os espectros que mostram os picos característicos do plasmídeo pADN (espectro A), do polímero PEI e composto PEI-PEG-

TPP (espectro B) e dos sistemas formados a rácio N/P=2 e 5 (espectros C e D), respetivamente, a fim de confirmar a encapsulação do pADN.

Na análise aos espectros C e D procura-se encontrar bandas de absorção características quer do polímero PEI e composto PEI-PEG-TPP como do pADN, a fim de confirmar a sua internalização.

Numa primeira análise a ambos os espectros (C e D) do Anexo 2 e Anexo 3 confirma-se a conservação da integridade do pADN nos compostos formados, pela revelação das bandas de 966 cm^{-1} a 968 cm^{-1} [86]. Pode também constatar-se que o polímero PEI está complexado em ambos os sistemas e rácios, uma vez que surgem bandas de 1492 a 1545 cm^{-1} características de ligações N-H resultantes da interação do polímero PEI com bases nitrogenadas do pADN [86, 60].

O espectro C do Anexo 2 apresenta uma banda a 3290 cm^{-1} característico dos movimentos “stretching” nos grupos N-H do polímero, representativo da existência de grupos amina nos poliplexos formulados a rácio N/P=2 [20].

Quanto às bandas reveladas nos espectros do Anexo 3, sugerem a formação do copolímero PEI-PEG. As bandas que aparecem a 1708 cm^{-1} (C) e 1707 cm^{-1} (D) são representativas da existência de estiramentos no grupo carbonil (C=O) de ligações amida PEI-PEG, e de que o ADN se encontra na conformação B [88].

Já as bandas a 1076 cm^{-1} (C) e 1078 cm^{-1} (D) são indicativas de ligações CH₂-O-CH₂ características do polímero PEG e da vibração simétrica do fosfato associado à ribose do pADN e as bandas a 2964 cm^{-1} (C) e 2954 cm^{-1} (D) são características do polímero PEI [88, 79].

Ainda no espectro do composto PEI-PEG-TPP do Anexo 3, é revelada uma banda a 3252 cm^{-1} (B) representativa da modificação da estrutura do polímero PEG pela predominância de grupos N-H, que se pode relacionar com a interação entre o PEI e o PEG [90].

4.3. Morfologia, tamanho e carga superficial das nanopartículas

A morfologia dos poliplexos formados foi analisada através de SEM a fim de verificar se apresentam forma viável para captação e internalização celular. As

propriedades físico-químicas (tamanho e carga superficial) dos sistemas desenvolvidos foram também reveladas por DLS.

4.3.1. Morfologia dos políplexos

As imagens representadas na Figura 9 foram selecionadas a partir das formulações com os polímeros PEI e PEI-PEG-TPP, preparadas a rácios N/P=2 e 5, respetivamente.

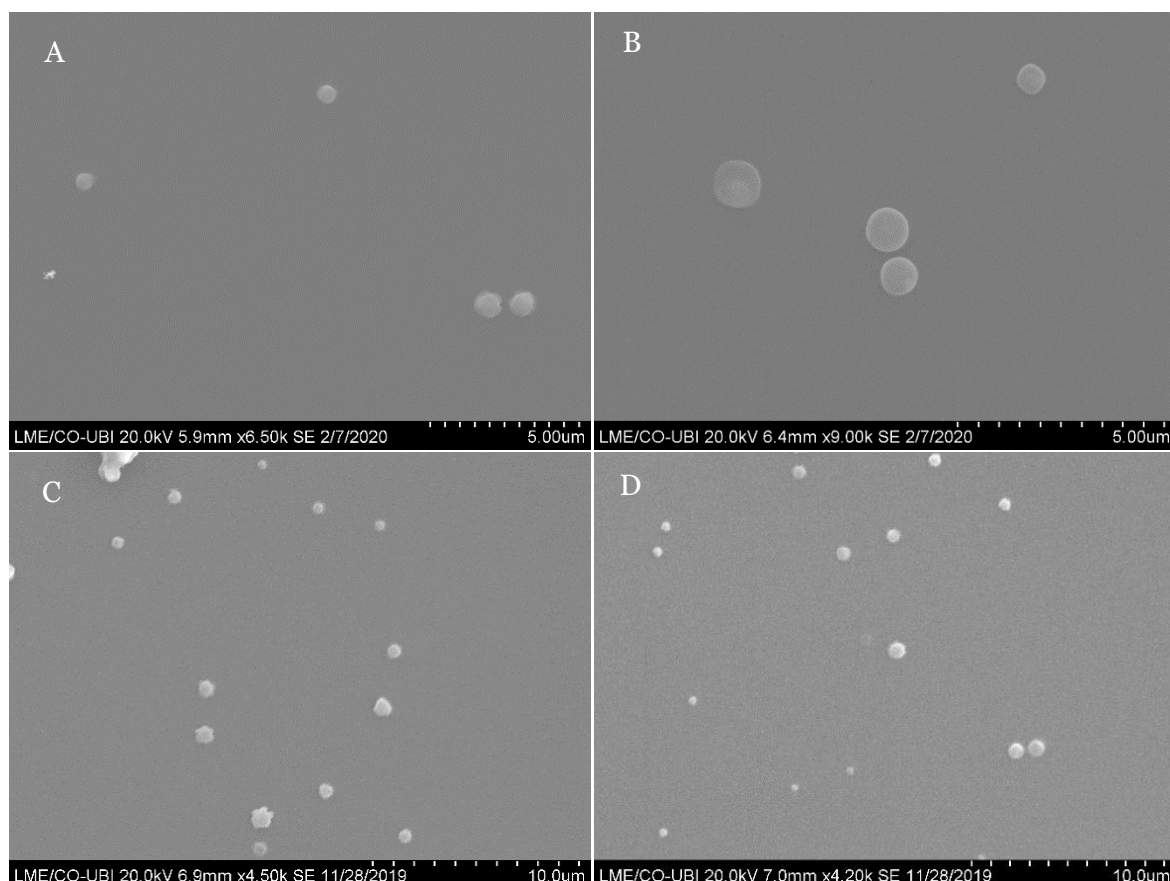


Figura 9 - Imagens SEM das nanopartículas formuladas pelos polímeros PEI (A, B) e PEI-PEG-TPP (C, D) a rácio N/P=2 (A, C) e 5 (B, D).

Pelas imagens SEM constata-se a formação de nanopartículas à escala nanométrica com morfologia definida, forma aproximadamente esférica ou oval. Na literatura encontra-se documentado que esta morfologia favorece a captação e internalização celular.

Aparentemente, os políplexos formados apresentam tamanhos até 500 nm, sendo os formulados pelo sistema PEI/pADN ligeiramente maiores que pelo sistema PEI-PEG-TPP/pADN. Verifica-se também uma diminuição de tamanhos dos políplexos

formulados a rácio N/P=5 relativamente aos formulados a rácio N/P=2. Este resultado segue a tendência revelada em estudos anteriores usando o polímero PEI [91].

4.3.2. Tamanho dos políplexos

Os valores dos tamanhos dos políplexos medidos por DLS através do Malvern ZetaSizer Nano ZS de ambos os sistemas de entrega encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Tamanho (nm) dos políplexos formulados pelos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP/pADN a rácio N/P=2 e 5.

		Sistemas de entrega	
		PEI/pADN	PEI-PEG-TPP/pADN
Rácio N/P	2	769 ± 51,5	459 ± 2,5
	5	488 ± 8,5	301 ± 52,5

Numa primeira análise, à exceção dos políplexos formulados pelo sistema PEI/pADN a rácio N/P=2, os políplexos formulados apresentam tamanhos satisfatórios para a passagem ao longo da membrana celular (<500 nm) [40].

Por análise dos valores, os políplexos formulados pelo sistema PEI/pADN apresentam tamanho superior aos PEI-PEG-TPP/pADN. Esta diferença deve-se possivelmente ao facto do PEG, ter aumentado as propriedades hidrofílicas do composto promovendo a condensação do pADN, refletindo-se numa diminuição da agregação e tamanho final dos políplexos, tal como já foi reportado em estudos anteriores [14, 20].

Em ambos os sistemas verifica-se a diminuição dos tamanhos dos políplexos a rácio N/P=5, sendo essa diferença mais notória no sistema PEI/pADN, pelo facto de haver maior quantidade de aminas primárias, aumentando a densidade de cargas do polímero e assim as interações com o pADN [56].

4.3.3. Carga de superfície dos políplexos

A carga de superfície dos políplexos condiciona a afinidade do sistema à membrana da célula, e, portanto, influencia diretamente o sucesso do processo de transfeção celular.

Para que os políplexos sejam mais facilmente internalizados pela célula é desejável que a sua carga seja positiva a fim de neutralizar a carga da membrana celular, que apresenta carga negativa [88].

As medições de carga superficial dos políplexos resultante das formulação dos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP/pADN a rácios N/P=2 e 5 estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Potenciais zeta (mV) dos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP/pADN a rácio N/P=2 e 5.

		Sistemas de entrega	
		PEI/pADN	PEI-PEG-TPP/pADN
Rácio N/P	2	+22,10 ± 0,90	+11,08 ± 3,69
	5	+38,03 ± 0,46	+21,67 ± 0,95

Ambos os sistemas apresentaram valores positivos de carga à superfície em ambos os rácios. Ainda assim, constatou-se um incremento da carga à superfície em ambos os sistemas formulados a rácio N/P=5, que se deve possivelmente à maior concentração de cargas positivas de amins primárias, provenientes do polímero PEI relativamente às cargas negativas dos grupos fosfato do plasmídeo, o que vai de encontro a estudos anteriores que relacionam a concentração do polímero PEI, proveniente do seu peso e estrutura com o incremento de carga superficial dos políplexos formulados [84].

Verifica-se também uma maior carga à superfície a ambos os rácios nos sistemas constituídos pelo polímero PEI, que pelo composto PEI-PEG-TPP, devido ao efeito de redução de carga no composto causado pelo polímero PEG, como já foi reportado em estudos anteriores [20].

4.4. **Análise citotóxica das nanopartículas**

De forma a conhecer a biocompatibilidade das nanopartículas formuladas avaliou-se o perfil citotóxico das mesmas em células HeLa, através do ensaio colorimétrico de MTT. Este ensaio permite quantificar células viáveis, que acumulam cristais de formazano pela redução dos sais de tetrazólio, revelando cor roxa [92].

Para realização do ensaio foram incubados vários sistemas formulados nas células HeLa durante 48h e calculada a percentagem da viabilidade celular. Os resultados são apresentados na Figura 10. Verifica-se que ambos os sistemas não apresentam citotoxicidade para as células. Observa-se, ainda, uma diminuição da biocompatibilidade das nanopartículas com o aumento do rácio N/P. Como mencionado na literatura, um aumento das cargas positivas do polímero PEI induz um aumento de citotoxicidade [93]. No geral, há também um ligeiro aumento de citotoxicidade com aumento do período de incubação, das 24h para as 48h.

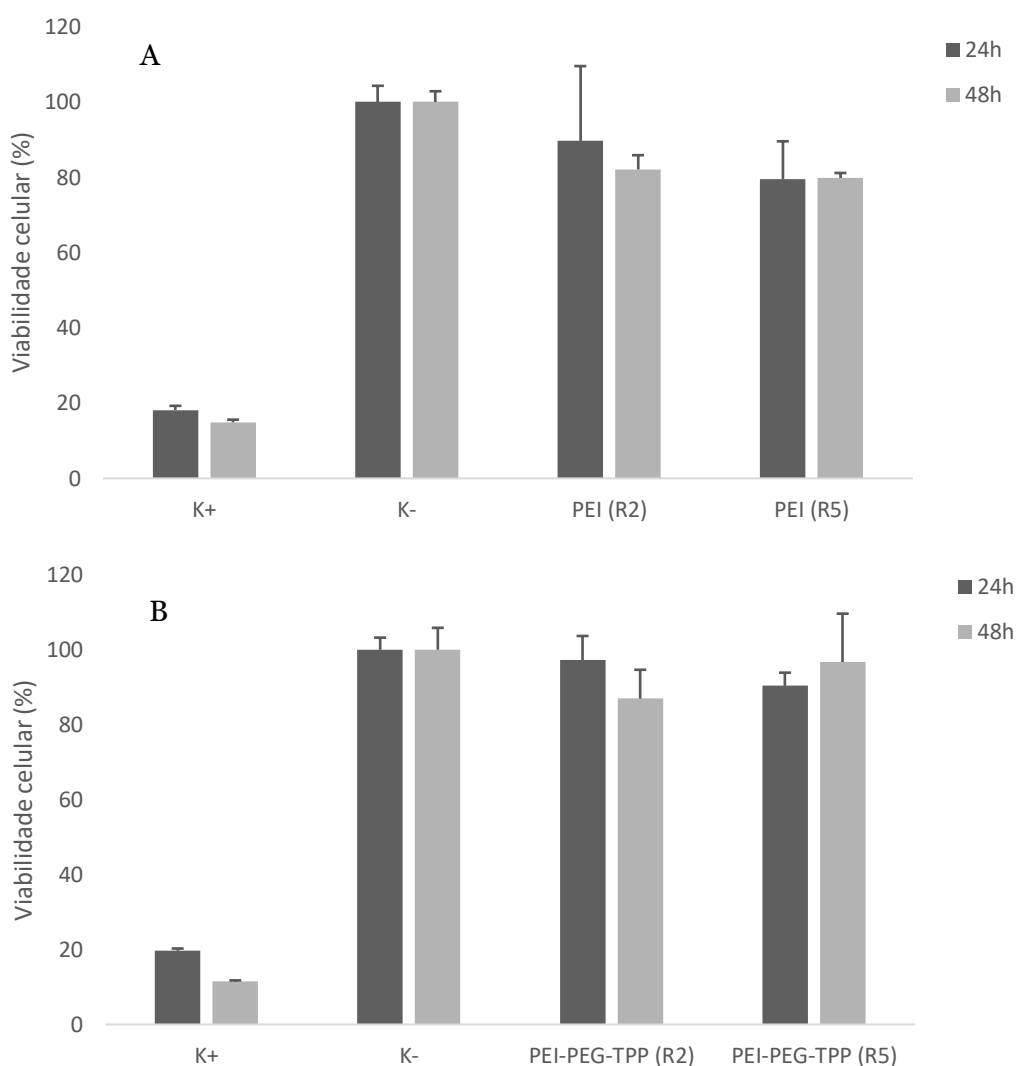


Figura 10 - Percentagens de viabilidade celular das células HeLa após 24h e 48 h de transfeção com os sistemas PEI/pADN (A) e PEI-PEG-TPP/pADN (B) a rácio N/P=2 e 5.

Numa análise mais pormenorizada ao gráfico A, pode-se inferir que se registou às 48h de exposição uma perda de viabilidade das células HeLa, cerca de 82%, aquando a interação com os poliplexos formulados com o polímero PEI a rácio N/P=2 e que os

poliplexos formulados a rácio N/P=5 induziram maior perda de viabilidade celular, por volta dos 79%, que se manteve logo desde as 24h [56].

Já no gráfico B os poliplexos formulados pelo composto PEI-PEG-TPP levaram a uma ligeira perda de viabilidade a rácios N/P=2 e 5, relativamente ao controlo negativo tanto nas placas de 24h quanto de 48h. Contudo às 24h, verifica-se uma maior perda de viabilidade nas amostras de rácio N/P=5, cerca de 90% comparativamente às de rácio N/P=2 (97%), possivelmente devido à sua carga superficial mais elevada [56].

Relativamente às 48h verifica-se o oposto, uma vez que as percentagens de viabilidade celular indicam valores de 86% e 96%, das formulações a rácio N/P=2 e 5, respetivamente. Este resultado não vai de encontro ao esperado e pode dever-se à insuficiente internalização dos poliplexos e deficiente desempacotamento dos mesmos nas células, permitindo a proliferação celular [80]. Também se verifica que os resultados obtidos correspondentes ao rácio N/P=5 apresentam um elevado desvio padrão, possivelmente devido a erros na pipetagem.

De modo geral, os poliplexos formulados pelo composto PEI-PEG-TPP induziram menor perda de viabilidade que o polímero PEI, tal como já tinha sido constatado em estudos que reportaram maior citotoxicidade induzida pelos poliplexos formulados com o polímero PEI, dado à sua carga superficial superior [20].

Desta forma, apesar do sistema PEI/pADN a valores de rácio N/P=5 ter demonstrado alguma citotoxicidade, levando à perda de viabilidade celular (< 80%), não se considera significativa. Ainda assim a utilização do polímero PEI de maior peso molecular ou a rácios superiores de formulação pode limitar a sua utilização em protocolos de terapia génica [94].

4.5. Estudos *in vitro* em células cancerígenas

A fim de avaliar a captação e internalização do composto PEI-PEG-TPP nas células HeLa, foram realizados ensaios de imunocitoquímica utilizando microscopia confocal de fluorescência.

Este estudo está apresentado na Figura 11, que evidencia a captação e internalização dos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP nas células HeLa. Contudo, apenas os vetores formulados a rácios N/P=5 dos sistemas PEI/pADN e PEI-PEG-TPP ultrapassaram a membrana celular e entraram no núcleo e mitocôndria das células,

respetivamente, de forma eficaz. O alcance destes sistemas ao núcleo permite a transcrição do gene de interesse em ARN mensageiro e tradução deste na proteína p53.

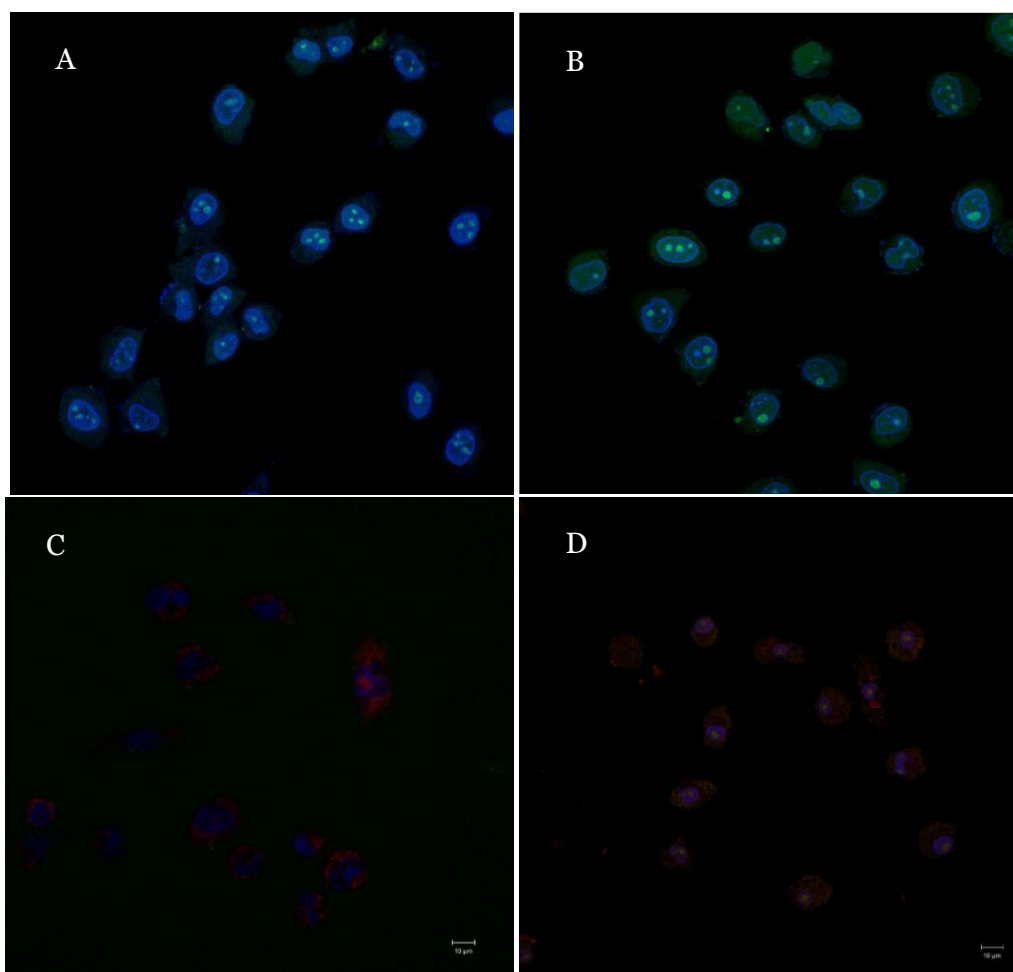


Figura 11 – Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência relativas à transfeção das células HeLa com o sistema PEI e PEI-PEG-TPP a rácio N/P=2 (A,C) e 5 (B,D) respetivamente.

A passagem eficiente destes vetores ao longo da membrana pode dever-se principalmente às cargas positivas que interagem com as cargas negativas da membrana celular, tal como aos tamanhos e morfologia adequada que facilitam este processo.

Pode afirmar-se que os sistemas formulados a rácio N/P=5 apresentam uma maior capacidade de transfeção em relação aos sistemas de rácio N/P=2 e que o políplexo PEI/pADN foi internalizado e direcionado para o núcleo das células (marcado a azul) enquanto que o composto PEI-PEG-TPP alcançou principalmente a mitocôndria (marcada a vermelho), devido à grande afinidade do composto TPP pela mitocôndria.

A maior afinidade do composto PEI-PEG-TPP à mitocôndria pode dever-se também ao PEG, uma vez que já foram relatados estudos indicativos de que copolímeros

de PEI-PEG não conseguem alcançar o núcleo, ficando por exemplo retidos no citoplasma de células tumorais HepG2 [95].

Neste estudo constatou-se que políplexos formulados pelo polímero PEI e PEI-PEG-TPP a um rácio N/P=5 apresentam melhores características, tanto de capacidade de condensação do material genético, como de tamanho e carga superficial mais adequada para entrega do pADN.

5. Conclusão

Esta dissertação centrou-se no desenvolvimento de sistemas poliméricos eficazes e seguros para entrega de ADN plasmídico contendo o gene supressor de tumor p53 a dois organelos celulares: núcleo e mitocôndria.

Para isso, formularam-se poliplexos à escala nanométrica, resultantes da complexação dos polímeros PEI e PEI-PEG-TPP com pADN a rácios N/P=2 e 5.

Os resultados obtidos demonstraram que tanto os poliplexos formulados pelo sistema PEI/pADN como o sistema PEI-PEG-TPP/pADN são biocompatíveis e capazes de encapsular o pADN, protegendo-o da degradação por enzimas celulares, uma vez que ambos os poliplexos revelaram elevadas taxas de encapsulação, geometria esférica e carga superficial positiva aos diferentes rácios.

Contudo os poliplexos formulados a rácio N/P=5 apresentaram maiores valores de carga superficial, tamanhos de diâmetro inferiores (438 e 301 nm), o que os torna mais adequados para potencial aplicação em sistemas de entrega de administração de genes, como alternativa às terapias convencionais.

A versatilidade dos sistemas de pADN desenvolvidos permite o direcionamento ao núcleo ou à mitocôndria das células, neste último caso perante a incorporação de um composto com afinidade mitocondrial. Este facto é deveras relevante pois possibilita o desenho de protocolos de terapia génica nuclear e mitocondrial, oferecendo resposta terapêutica a uma enorme variedade de doenças, tais como, cancro, diabetes, doenças metabólicas ou neurológicas.

6. Perspetivas futuras

A fim de validar o potencial dos sistemas formulados e tendo em conta a perda de efeito citotóxico associado ao composto PEI-PEG-TPP a rácio N/P=5 ao longo das 48h, torna-se importante o estudo posterior do efeito citotóxico de poliplexos formulados a rácios N/P superiores por vários períodos de tempo.

Também é interessante quantificar a expressão do gene supressor de tumor p53, por meio de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), e a expressão da proteína por western blot ou usando um kit Elisa de quantificação apropriado.

No que respeita aos sistemas de pADN com afinidade mitocondrial, torna-se relevante analisar, por via espectral, a sua presença em mitocôndrias isoladas de células.

É importante também conjugar ligandos específicos à superfície dos poliplexos no sentido de promover uma maior especificidade de direcionamento a um determinado organelo celular, melhorando deste modo a biodisponibilidade e biocompatibilidade do sistema desenvolvido.

7. Referências Bibliográficas

- [1] E. S. Lander *et al.*, “Initial sequencing and analysis of the human genome,” *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860–921, 2001, doi: 10.1038/35057062.
- [2] N. Sugimoto, “Chapter Eight - Noncanonical Structures and Their Thermodynamics of DNA and RNA Under Molecular Crowding: Beyond the Watson–Crick Double Helix,” in *New Models of the Cell Nucleus: Crowding, Entropic Forces, Phase Separation, and Fractals*, vol. 307, R. Hancock and K. W. B. T.-I. R. of C. and M. B. Jeon, Eds. Academic Press, 2014, pp. 205–273.
- [3] R. Linden, “Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be,” *Estud. Avançados*, vol. 24, no. 70, pp. 31–69, 2010.
- [4] A. Mountain, “Gene therapy: the first decade,” *Trends Biotechnol.*, vol. 18, no. 3, pp. 119–128, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01416-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01416-X).
- [5] M. De oliveira Diniz and L. C. Souza Ferreira, “Biotechnology applied to the development of vaccines,” *Estud. Avançados*, vol. 24, no. 70, pp. 19–30, 2010.
- [6] G. Shim, D. Kim, G. T. Park, H. Jin, S. K. Suh, and Y. K. Oh, “Therapeutic gene editing: Delivery and regulatory perspectives,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 38, no. 6, pp. 738–753, 2017, doi: 10.1038/aps.2017.2.
- [7] M. Ramamoorth and A. Narvekar, “Non viral vectors in gene therapy - An overview,” *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 9, no. 1, pp. GE01–GE06, 2015, doi: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394.
- [8] D. Zhao, C. Q. Wang, R. X. Zhuo, and S. X. Cheng, “Modification of nanostructured calcium carbonate for efficient gene delivery,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 118, pp. 111–116, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.03.007.
- [9] W. Q. Li *et al.*, “Mitochondria-Targeting Polydopamine Nanoparticles to Deliver Doxorubicin for Overcoming Drug Resistance,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 20, pp. 16793–16802, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b01540.
- [10] A. Bank, “Human somatic cell gene therapy,” *Bioessays*, vol. 18, no. 12, p. 999–1007, 1996, doi: 10.1002/bies.950181210.
- [11] C. K. Chung, C. G. Da Silva, D. Kralisch, A. Chan, and L. J. Cruz, “Combinatory therapy adopting nanoparticle-based cancer vaccination with immune

- checkpoint blockade for treatment of post-surgical tumor recurrences,” *J. Control. Release*, p. #pagerange#, 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.011.
- [12] E. Herrero and A. Fernández-Medarde, “Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 93, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
- [13] S. Harilal *et al.*, “Revisiting the blood-brain barrier: A hard nut to crack in the transportation of drug molecules,” *Brain Res. Bull.*, vol. 160, pp. 121–140, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.03.018>.
- [14] A. Namvar, A. Bolhassani, N. Khairkhah, and F. Motevalli, “Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection,” *Biopolymers*, vol. 103, no. 7, pp. 363–375, 2015, doi: 10.1002/bip.22638.
- [15] C. Scholz and E. Wagner, “Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery : Common and different tasks for synthetic carriers,” *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 554–565, 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.014.
- [16] J. Filipa and A. Pereira, “Affinity purification and delivery of a p53-encoding plasmid DNA for gene mediated cancer therapy,” 2018.
- [17] Y. Li, B. Li, C. J. Li, and L. J. Li, “Key points of basic theories and clinical practice in rAd-p53 (Gendicine™) gene therapy for solid malignant tumors,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 15, no. 3, pp. 437–454, 2015, doi: 10.1517/14712598.2015.990882.
- [18] S. Erster, M. Mihara, R. H. Kim, O. Petrenko, and U. M. Moll, “In Vivo Mitochondrial p53 Translocation Triggers a Rapid First Wave of Cell Death in Response to DNA Damage That Can Precede p53 Target Gene Activation,” vol. 24, no. 15, p. 2017, 2017, doi: 10.1128/MCB.24.15.6728.
- [19] W. Walther and U. Stein, “Viral Vectors for Gene Transfer A Review of Their Use in the Treatment of Human Diseases,” vol. 60, no. 2, pp. 249–271, 2000.
- [20] B. Saqa and F. Rahbarizadeh, “Effect of PEI surface modification with PEG on cytotoxicity and transfection efficiency,” vol. 13, pp. 1090–1095, 2018, doi: 10.1049/mnl.2017.0457.
- [21] D. Pack, A. Hoffman, S. Pun, and P. Stayton, “Pack, DW, Hoffman, AS, Pun, S and Stayton, PS. Design and development of polymers for gene delivery. Nat Rev Drug Discov 4: 581-593,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, pp. 581–593, Aug.

- 2005, doi: 10.1038/nrd1775.
- [22] S. Laufs, K. Z. Nagy, F. A. Giordano, A. Hotz-Wagenblatt, W. J. Zeller, and S. Fruehauf, "Insertion of retroviral vectors in NOD/SCID repopulating human peripheral blood progenitor cells occurs preferentially in the vicinity of transcription start regions and in introns," *Mol. Ther.*, vol. 10, no. 5, pp. 874–881, 2004, doi: 10.1016/j.ymthe.2004.08.001.
- [23] A. Lamsfus-Calle *et al.*, "Hematopoietic stem cell gene therapy: The optimal use of lentivirus and gene editing approaches," *Blood Rev.*, vol. 40, p. 100641, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100641>.
- [24] T. HE *et al.*, "Gene therapy clinical trials worldwide to 2007 – an update," *J. Gene Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 44–53, 2012, doi: 10.1002/jgm.
- [25] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, and D. G. Anderson, "Non-viral vectors for gene-based therapy," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 8, pp. 541–555, 2014, doi: 10.1038/nrg3763.
- [26] L. Li, Y. Wei, and C. Gong, "Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 5, pp. 739–770, 2015, doi: 10.1166/jbn.2015.2069.
- [27] T. S. Anirudhan and A. S. Nair, "Temperature and ultrasound sensitive gatekeepers for the controlled release of chemotherapeutic drugs from mesoporous silica nanoparticles," *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, no. 3, pp. 428–439, 2018, doi: 10.1039/C7TB02292A.
- [28] R. A. Cordeiro, D. Farinha, N. Rocha, A. C. Serra, H. Faneca, and J. F. J. Coelho, "Novel cationic triblock copolymer of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-block-poly(β -amino ester)-block-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]: A promising non-viral gene delivery system," *Macromol. Biosci.*, vol. 15, no. 2, pp. 215–228, 2015, doi: 10.1002/mabi.201400424.
- [29] D. B. Chithrani, "Intracellular uptake, transport, and processing of gold nanostructures," *Mol. Membr. Biol.*, vol. 27, no. 7, pp. 299–311, 2010, doi: 10.3109/09687688.2010.507787.
- [30] C. K. Chen, P. K. Huang, W. C. Law, C. H. Chu, N. T. Chen, and L. W. Lo, "Biodegradable polymers for gene-delivery applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 2131–2150, 2020, doi: 10.2147/IJN.S222419.
- [31] K. Muhammad, J. Zhao, I. Ullah, J. Guo, X. Ren, and Y. Feng, "Ligand targeting

- and peptide functionalized polymers as non-viral carriers for gene therapy,” *Biomater. Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 64–83, 2020, doi: 10.1039/C9BM01112A.
- [32] V. Loczenski Rose, F. Mastrotto, and G. Mantovani, “Phosphonium polymers for gene delivery,” *Polym. Chem.*, vol. 8, no. 2, pp. 353–360, 2017, doi: 10.1039/C6PY01855F.
- [33] C. Oliveira, I. Silveira, F. Veiga, and A. J. Ribeiro, “Recent advances in characterization of nonviral vectors for delivery of nucleic acids: impact on their biological performance,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 12, no. 1, p. 27–39, 2015, doi: 10.1517/17425247.2014.945421.
- [34] R. Duncan, H. Ringsdorf, and R. Satchi-fainaro, “Polymer therapeutics – polymers as drugs , drug and protein conjugates and gene delivery systems : Past , present and future opportunities,” vol. 2330, 2008, doi: 10.1080/10611860600833856.
- [35] L. Kang, Z. Gao, W. Huang, M. Jin, and Q. Wang, “Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment,” *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 5, no. 3, pp. 169–175, 2015, doi: 10.1016/j.apsb.2015.03.001.
- [36] H. Y. Lee, K. A. Mohammed, and N. Nasreen, “Nanoparticle-based targeted gene therapy for lung cancer,” *Am. J. Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 1118–1134, 2016.
- [37] R. Effect, “Polymeric Co-Delivery Systems in Cancer Treatment : An Overview on Component Drugs ’ Dosage,” 2019, doi: 10.3390/molecules24061035.
- [38] S. L. Ginn, A. K. Amaya, I. E. Alexander, M. Edelstein, and M. R. Abedi, “Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update.,” *J. Gene Med.*, vol. 20, no. 5, p. e3015, May 2018, doi: 10.1002/jgm.3015.
- [39] W. Wang, W. Li, N. Ma, and G. Steinhoff, “Non-viral gene delivery methods.,” *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 46–60, 2013.
- [40] 2013 Sheean et al., “Factors Controlling the Pharmacokinetics, Biodistribution and Intratumoral Penetration of Nanoparticles,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1038/jid.2014.371.
- [41] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, and T. Kissel, “In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 7, pp. 1121–1131, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00445-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00445-3).

- [42] Q. Hu *et al.*, “Biomaterials Intracellular pathways and nuclear localization signal peptide-mediated gene transfection by cationic polymeric nanovectors,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 4, pp. 1135–1145, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.023.
- [43] J. Kim, D. R. Wilson, C. G. Zamboni, and J. J. Green, “Targeted polymeric nanoparticles for cancer gene therapy,” *J. Drug Target.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–15, 2015, doi: 10.3109/1061186X.2015.1048519.
- [44] L. Kou, J. Sun, Y. Zhai, and Z. He, “The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1016/j.ajps.2013.07.001.
- [45] A. Aied, U. Greiser, A. Pandit, and W. Wang, “Polymer gene delivery: overcoming the obstacles,” *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 21–22, pp. 1090–1098, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.drudis.2013.06.014.
- [46] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, and H. J. Haisma, “Endosomal escape pathways for delivery of biologicals,” *J. Control. Release*, vol. 151, no. 3, pp. 220–228, 2011, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.004.
- [47] P. Y. Teo, W. Cheng, J. L. Hedrick, and Y. Y. Yang, “Co-delivery of drugs and plasmid DNA for cancer therapy,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 98, pp. 41–63, 2016, doi: 10.1016/j.addr.2015.10.014.
- [48] N. Nikitenko and V. Prassolov, “Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs,” *Acta Naturae*, vol. 5, pp. 35–53, Dec. 2013, doi: 10.32607/20758251-2013-5-3-35-53.
- [49] S. Yang and S. May, “Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis,” *J. Chem. Phys.*, vol. 129, no. 18, 2008, doi: 10.1063/1.3009263.
- [50] A. Manuscript, “A ligand-mediated nanovector for targeted gene delivery and transfection in cancer cells,” vol. 30, no. 4, pp. 649–657, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.003.A.
- [51] J. Suh, D. Wirtz, and J. Hanes, “Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus,” no. Track II, 2003.
- [52] T. Merdan, J. Kopeček, and T. Kissel, *Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer*, vol. 54, no. 5. 2002.

- [53] Y. Yue and C. Wu, “Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery,” *Biomater. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 152–170, 2013, doi: 10.1039/C2BM00030J.
- [54] L. Parhamifar, A. K. Larsen, A. C. Hunter, L. Andresen, and S. M. Moghimi, “Polycation cytotoxicity : a delicate matter for nucleic acid therapy — focus on polyethylenimine,” pp. 4001–4009, 2010, doi: 10.1039/c000190b.
- [55] R. Miguel and R. Faria, “Terapia do cancro do colo do útero : Avaliação do efeito terapêutico da ação combinada de uma droga e do DNA plasmídico Dedicatória,” 2018.
- [56] D. Costa, A. J. M. Valente, J. A. Queiroz, and Â. Sousa, “Finding the ideal polyethylenimine-plasmid DNA system for co-delivery of payloads in cancer therapy,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 170, p. 627–636, 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.063.
- [57] S. Di Gioia, “Polyethylenimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications,” pp. 163–188, 2008.
- [58] H. Eliyahu, Y. Barenholz, and A. J. Domb, “Polymers for DNA delivery,” *Molecules*, vol. 10, no. 1, pp. 34–64, 2005, doi: 10.3390/10010034.
- [59] L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng, and N. He, “Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers,” *Theranostics*, vol. 4, no. 3, pp. 240–255, 2014, doi: 10.7150/thno.6914.
- [60] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, and A. Göpferich, “Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems.,” *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft fur Pharm. Verfahrenstechnik e.V.*, vol. 60, no. 2, pp. 247–266, Jul. 2005, doi: 10.1016/j.ejpb.2004.11.011.
- [61] M. M. Mady, W. A. Mohammed, N. M. El-Guendy, and A. A. Elsayed, “Interaction of DNA and polyethylenimine: Fourier-transform infrared (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) studies,” *Int. J. Phys. Sci.*, vol. 6, no. 32, pp. 7328–7334, 2011, doi: 10.5897/IJPS11.1005.
- [62] J. Rejman, A. Bragonzi, and M. Conese, “Role of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis in Gene Transfer Mediated by Lipo- and Polyplexes,” vol. 12, no. 3, pp. 468–474, 2005, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.03.038.
- [63] A. Andreia F. Jorge, a M. Carmen Mor´ an, b M. Pilar Vinardell, b Jorge C. Pereira and R. S. D. and A. A. C. C. Pais*a, “Ternary complexes DNA–

- polyethylenimine–Fe(III) with linear and branched polycations: implications on condensation, size, charge and in vitro biocompatibility,” pp. 10799–10810, 2013, doi: 10.1039/c3sm51616d.
- [64] A. V. Ulasov, Y. V. Khrantsov, G. A. Trusov, A. A. Rosenkranz, E. D. Sverdlov, and A. S. Sobolev, “Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy,” *Mol. Ther.*, vol. 19, no. 1, pp. 103–112, 2011, doi: 10.1038/mt.2010.233.
- [65] N. Skandrani, A. Barras, D. Legrand, T. Gharbi, H. Boulahdour, and R. Boukherroub, “Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 13, pp. 7379–7390, 2014, doi: 10.1039/C4NR01110D.
- [66] M. Lee and S. W. Kim, “Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery.,” *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2005, doi: 10.1007/s11095-004-9003-5.
- [67] K. Ladewig, Z. P. Xu, P. Gray, and G. Q. Lu, “Polyethyleneimine-poly(ethylene glycol)-star-copolymers as efficient and biodegradable vectors for mammalian cell transfection,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 7, pp. 2137–2146, 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34888.
- [68] H. Cwerman-Thibault, S. Augustin, S. Ellouze, J. A. Sahel, and M. Corral-Debrinski, “Gene therapy for mitochondrial diseases: Leber Hereditary Optic Neuropathy as the first candidate for a clinical trial,” *Comptes Rendus - Biol.*, vol. 337, no. 3, pp. 193–206, 2014, doi: 10.1016/j.crvi.2013.11.011.
- [69] A. Rasola and P. Bernardi, “The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis,” vol. 2, pp. 815–833, 2007, doi: 10.1007/s10495-007-0723-y.
- [70] D. C. Wallace, “Mitochondrial diseases in man and mouse,” *Science (80-.)*, vol. 283, no. 5407, pp. 1482–1488, 1999, doi: 10.1126/science.283.5407.1482.
- [71] S. Marrache and S. Dhar, “Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics,” 2012, doi: 10.1073/pnas.1210096109/-
/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1210096109.
- [72] C. Vicente and S. Costa, “Terapia Génica Mitochondrial Desenvolvimento de um vetor com afinidade pela,” 2015.

- [73] G. S. Shadel and D. A. Clayton, "Mitochondrial Dna Maintenance in Vertebrates," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, no. 1, pp. 409–435, 1997, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.409.
- [74] F. A. Godoy, "Estudo do papel da proteína p53 em reparo por excisão de bases em mitocôndrias de células de mamíferos," 1392.
- [75] A. B. Robertson, A. Klungland, T. Rognes, and I. Leiros, "Base excision repair: The long and short of it," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, no. 6, pp. 981–993, 2009, doi: 10.1007/s00018-009-8736-z.
- [76] I. R. Indran, G. Tufo, S. Pervaiz, and C. Brenner, "Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1807, no. 6, pp. 735–745, 2011, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.03.010.
- [77] S. Adhya, B. Mahato, S. Jash, S. Koley, G. Dhar, and T. Chowdhury, "Mitochondrial gene therapy: The tortuous path from bench to bedside," *Mitochondrion*, vol. 11, no. 6, pp. 839–844, 2011, doi: 10.1016/j.mito.2011.06.003.
- [78] M. P. Murphy and R. A. J. Smith, "medicine," vol. 41, pp. 235–250, 2000.
- [79] C. Zhang *et al.*, "Targeted minicircle DNA delivery using folate-poly(ethylene glycol)-polyethylenimine as non-viral carrier," *Biomaterials*, vol. 31, no. 23, pp. 6075–6086, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.042.
- [80] G. Bayramoğlu and M. Yakup Arica, "Adsorption of Cr(VI) onto PEI immobilized acrylate-based magnetic beads: Isotherms, kinetics and thermodynamics study," *Chem. Eng. J.*, vol. 139, no. 1, pp. 20–28, 2008, doi: 10.1016/j.cej.2007.07.068.
- [81] G. Battogtokh *et al.*, "Mitochondria-targeting drug conjugates for cytotoxic, anti-oxidizing and sensing purposes: current strategies and future perspectives," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 8, no. 6, pp. 862–880, 2018, doi: 10.1016/j.apsb.2018.05.006.
- [82] H. Jiang, Y. Kim, and C. Cho, "Medical Polymer-Based Gene Therapy," 2006.
- [83] Q. Xie, G. Xinyong, C. Xianjin, W. Yayu, P. Pei, and Á. Cho, "ORIGINAL RESEARCH PEI / DNA formation affects transient gene expression in suspension Chinese hamster ovary cells via a one-step transfection process," pp. 263–271, 2013, doi: 10.1007/s10616-012-9483-9.

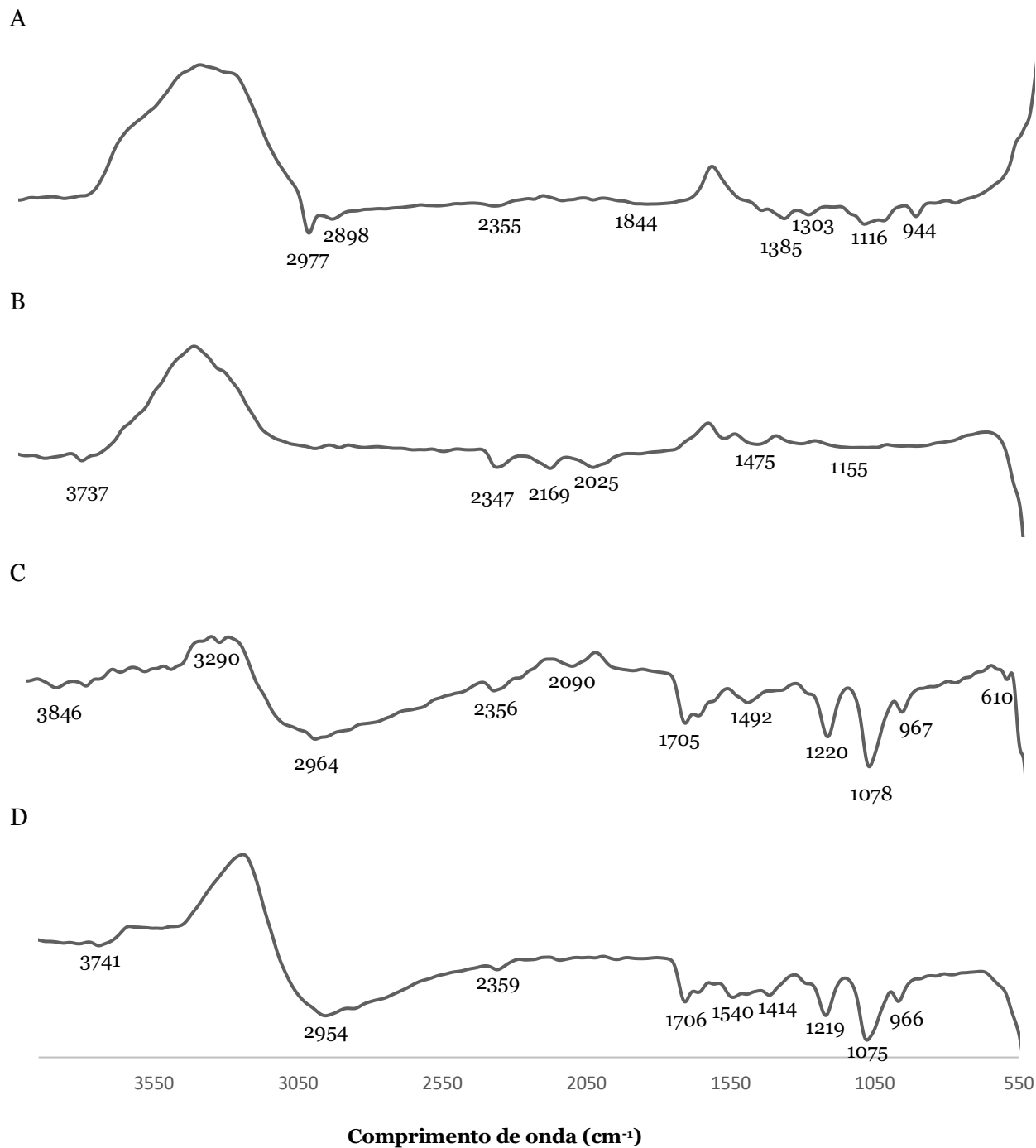
- [84] M. M. Mady, W. A. Mohammed, N. M. El-guendy, and A. A. Elsayed, "EFFECT OF POLYMER MOLECULAR WEIGHT ON THE DNA / PEI POLYPLEXES PROPERTIES," vol. 21, no. 2, pp. 151–165.
- [85] D. Costa, W. H. Briscoe, and J. Queiroz, "Polyethylenimine coated plasmid DNA-surfactant complexes as potential gene delivery systems," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 133, p. 156–163, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.06.005.
- [86] S. Choosakoonkriang, B. A. Lobo, G. S. Koe, J. G. Koe, and C. R. Middaugh, "Biophysical characterization of PEI/DNA complexes," *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, no. 8, pp. 1710–1722, 2003, doi: 10.1002/jps.10437.
- [87] E. V. Hackl, S. V. Kornilova, and Y. P. Blagoi, "DNA structural transitions induced by divalent metal ions in aqueous solutions," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 35, no. 3–4, pp. 175–191, 2005, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2005.01.011.
- [88] J. D. Ziebarth, D. R. Kennetz, N. J. Walker, and Y. Wang, "Structural Comparisons of PEI/DNA and PEI/siRNA Complexes Revealed with Molecular Dynamics Simulations," 2017, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10775.
- [89] Â. Sousa *et al.*, "Design of experiments to select triphenylphosphonium-polyplexes with suitable physicochemical properties for mitochondrial gene therapy," *J. Mol. Liq.*, vol. 302, p. 112488, 2020, doi: 10.1016/j.molliq.2020.112488.
- [90] S. Ghiamkazemi, A. Amanzadeh, R. Dinarvand, and M. Amini, "Synthesis , and Characterization , and Evaluation of Cellular Effects of the FOL-PEG-g-PEI-GAL Nanoparticles as a Potential Non-Viral Vector for Gene Delivery," vol. 2010, 2010, doi: 10.1155/2010/863136.
- [91] S. E. A. Gratton *et al.*, "The effect of particle design on cellular internalization pathways," vol. 105, no. 33, 2008.
- [92] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55–63, 1983, doi: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [93] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, "Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability," *Biomaterials*, vol. 22, no. 5, p. 471–480, 2001, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00203-9.
- [94] J. Lee, J. Oh, E. Lee, Y. Kim, and M. Lee, "Journal of Industrial and Engineering Chemistry Conjugation of prostate cancer-specific aptamers to polyethylene

- glycol-grafted polyethylenimine for enhanced gene delivery to prostate cancer cells,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 73, pp. 182–191, 2019, doi: 10.1016/j.jiec.2019.01.023.
- [95] J. Wang, S. Yuan, Y. Zhang, W. Wu, Y. Hu, and X. Jiang, “The effects of poly(zwitterions)s: Versus poly(ethylene glycol) surface coatings on the biodistribution of protein nanoparticles,” *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 9, pp. 1351–1360, 2016, doi: 10.1039/c6bm00201c.
- [96] J. H. Lee and M. J. Lee, “Liposome-mediated cancer gene therapy: Clinical trials and their lessons to stem cell therapy,” *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 33, no. 2, pp. 433–442, 2012, doi: 10.5012/bkcs.2012.33.2.433.
- [97] H. Faneca, A. Cardoso, S. Trabulo, S. Duarte, and M. Pedroso de Lima, “Cationic Liposome-Based Systems for Nucleic Acid Delivery: From the Formulation Development to Therapeutic Applications,” *Drug Deliv. Syst. Adv. Technol. Potential. Appl. Pers. Treat. Adv. Predict. Prev. Pers. Med.*, vol. 4, pp. 153–184, Jan. 2013, doi: 10.1007/978-94-007-6010-3__6.
- [98] G. Bozzuto and A. Molinari, “Liposomes as nanomedical devices,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 975–999, 2015, doi: 10.2147/IJN.S68861.
- [99] zia ur Rehman, I. Zuhorn, and D. Hoekstra, “How Cationic Lipids transfer Nucleic Acids into Cells and across Cellular Membranes: Recent Advances,” *J. Control. Release*, vol. 166, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.014.
- [100] D. Zhi, S. Zhang, S. Cui, Y. Zhao, Y. Wang, and D. Zhao, “The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 24, no. 4, pp. 487–519, Apr. 2013, doi: 10.1021/bc300381s.
- [101] A. K. Jain, A. Massey, H. Yusuf, D. M. McDonald, H. O. McCarthy, and V. L. Kett, “Development of polymeric–cationic peptide composite nanoparticles, a nanoparticle-in-nanoparticle system for controlled gene delivery,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 7183–7196, 2015, doi: 10.2147/IJN.S95245.

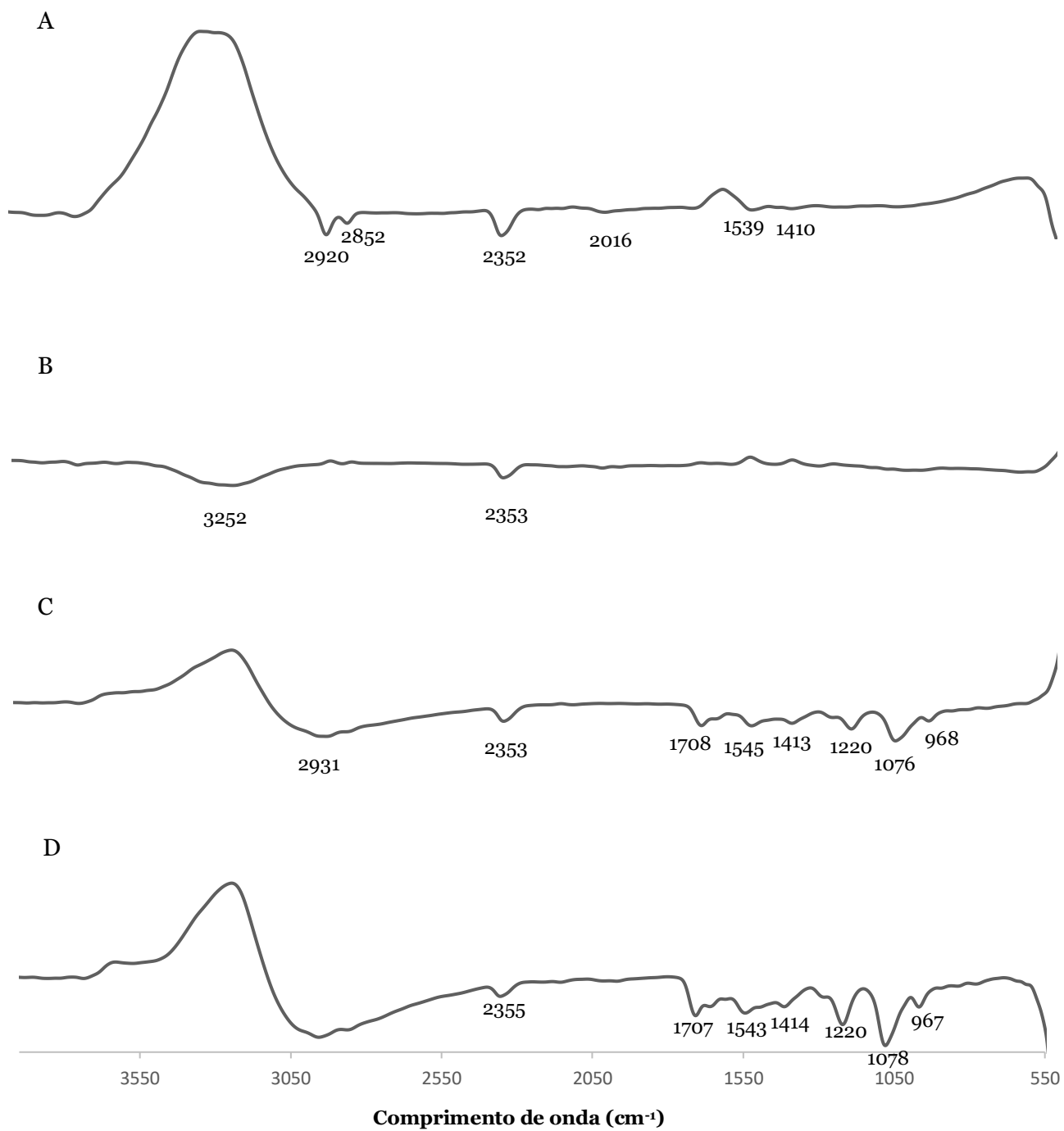
Anexos

Anexo 1 - Vetores orgânicos usados na entrega de material genético.

Nano transportadores	Tipos		Vantagens	Desvantagens
Lipossomas e imunolipossomas [95, 96, 97]	Doxorubicina, daunorubicina...		Biocompatíveis, biodegradáveis, toxicidade baixa a moderada	Aplicação <i>in vivo</i> limitada: baixa eficácia de tranfeção, instabilidade coloidal com tendência de agregação na circulação sanguínea e dificuldade da síntese em larga escala
Lípidos [98, 99]	Catiônicos	DOPC, DOPA, DOTAP...	Favorecem interações eletrostáticas com glicoproteínas e proteoglicanos dada a carga positiva superficial, protegendo material genético de nucleases intracelulares e extracelulares e da membrana celular.	Baixa estabilidade e tendência para formar <i>clusters</i> na circulação, o que induz alguma toxicidade
	Colípidios	DOPE	Menor toxicidade induzida devido à baixa carga superficial	Elevada carga superficial, reduz o tempo de circulação dos lipoplexos no sangue
		Colesterol	Estabiliza as estruturas da membrana lipídica contra a ação de compostos séricos	
	Micelas	Biocompatíveis e estáveis. Biodisponibilidade dos fármacos pouco solúveis em água (núcleo hidrofóbico) a baixa dose e frequência de administração		
Polímeros [101]	Naturais, sintéticos e copolímeros	Proteínas, peptídeos, PEI, PEG, dendrímeros, micelas	Biocompatíveis e bastante estáveis	Citotoxicidade elevada e elevados valores de rácio N/P



Anexo 2 - Espectro de ATR-FTIR (Transmitância (%) vs Comp. Onda (cm⁻¹)) do pADN (A), PEI (B), sistema PEI/pADN a rácio N/P=2 (C) e a rácio N/P=5 (D).



Anexo 3 - Espectro de ATR-FTIR (Transmitância (%) vs Comp. Onda (cm⁻¹)) do pADN (A), PEI-PEG-TPP (B), sistema PEI-PEG-TPP/pADN a rácio N/P=2 (C) e a rácio N/P=5 (D).