

**Entrega direcionada às células dendríticas:
Funcionalização de um vetor de DNA
minicircular com ligandos**

Ana Sofia Mota Martins Serra

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2^o ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Doutora Ângela Maria Almeida de Sousa

Co-orientadora: Prof.^a Doutora Diana Rita Barata Costa

Covilhã, junho de 2021

Agradecimentos

A realização de uma dissertação de Mestrado é um processo desafiante que inclui, por vezes, momentos de frustração. Por isso, fazer este percurso só foi possível graças ao apoio incondicional de um conjunto de pessoas a quem, particularmente, agradeço.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Ângela Sousa e à Professora Doutora Diana Costa por me terem proporcionado a realização de todo este projeto e por todo o conhecimento científico que partilharam comigo. Agradeço, igualmente, a orientação, apoio e disponibilidade no esclarecimento das mais diversas dúvidas, que foram surgindo ao longo da elaboração deste documento. À professora Swati Biswas pela colaboração na síntese e caracterização do péptido usado no trabalho.

À Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por me ter disponibilizado todas as condições necessárias à realização desta dissertação.

Às minhas colegas Dalinda, Raquel e Tânia, agradeço todos os incentivos que me deram para continuar motivada e sobretudo pela paciência que sempre tiveram para comigo. O meu muito obrigada por estarem sempre disponíveis para esclarecer as minhas dúvidas e por todo o conhecimento que partilharam comigo.

À Cathy, ao Carlos e ao Renato, quero agradecer terem estado sempre ao meu lado em todos os momentos, fossem eles bons ou mais difíceis. Guardo no coração tudo o que vivemos juntos e especialmente toda a motivação que sempre me deram. Sem vocês esta experiência não teria tido a mesma alegria.

Não poderia deixar de referir alguns dos meus amigos mais próximos, Maria, Andreia, Rui e André, que embora estivessem longe, sempre se mostraram interessados no meu trabalho e sempre me procuraram incentivar e aconselhar da melhor maneira.

Devo, ainda, um agradecimento muito especial aos meus colegas de casa, Catarina, Rita e Luís, pela amizade linda e cúmplice que construímos ao longo destes últimos seis anos. Seremos, certamente, amigos para a vida toda. Muito obrigada por toda a paciência, companheirismo, motivação e por terem estado presentes em todos os momentos mais importantes da minha vida. Foram, sem dúvida, uma das minhas maiores motivações para conseguir concretizar este grande objetivo na minha vida. Ao Rodrigo e à Joana, não posso deixar de agradecer por todo o carinho e paciência que sempre demonstraram ter para comigo. E a ti Rafa, obrigada por demonstrares que estás sempre comigo para o que eu precisar.

Por último e não menos importante, um agradecimento especial aos meus pais, Fátima e Artur, por todo o esforço e sacrifícios que fizeram para que este percurso académico se tornasse possível. Sei que sempre acreditaram em mim e nas minhas capacidades. Agradeço a paciência nos meus momentos de insegurança. Ao meu irmão João e às minhas avós, por sempre demonstrarem o orgulho que têm em mim e por me fazerem acreditar que irei conseguir alcançar o que mais desejo.

Resumo

O cancro é uma doença que continua a proliferar em todo o mundo, sendo uma das principais causas de mortalidade, porém a probabilidade de encontrar a cura tem vindo a aumentar em resultado dos vários estudos desenvolvidos ao longo dos últimos anos. O cancro do colo do útero é a doença mais relevante associada à infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV), principalmente quando não é detetado precocemente, evoluindo para formas invasivas. A sobreexpressão das oncoproteínas HPV E6 e E7 interfere na regulação e proliferação do ciclo celular através do comprometimento das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respetivamente. Embora a vacinação profilática contra o HPV seja atualmente a melhor estratégia para prevenir o cancro do colo do útero, esse tipo de vacina não é eficaz no tratamento de infeções pré-existentes. Para preencher essa lacuna, vários tipos de vacinas terapêuticas contra o HPV têm sido estudadas. As vacinas de DNA têm assumido particular importância devido à sua capacidade de gerar respostas imunes celulares e humorais, a partir do uso de sequências de material genético do patogénio que se pretende combater. O DNA minicircular (mcDNA) é uma molécula de DNA inovadora e promissora, uma vez que a ausência de sequências procarióticas supera algumas das principais limitações do DNA plasmídeo tradicional.

O sucesso das vacinas de DNA está fortemente dependente do desenvolvimento de sistemas eficientes de entrega de genes que devem ser capazes de condensar e proteger o DNA, ligando-se à membrana e internalizando-se nas células eucarióticas, superando todos os obstáculos intracelulares e extracelulares. Os vetores virais oferecem alta eficiência de transfecção para células eucarióticas. No entanto, apresentam desvantagens significativas, como antigenicidade, potenciais efeitos oncogénicos, possível recombinação do vírus ou dificuldade de produção e armazenamento em larga escala. Para superar essas limitações, várias tentativas têm sido feitas para desenvolver sistemas de entrega de genes não virais baseados em lipossomas, polímeros catiónicos sintéticos ou naturais e péptidos de penetração celular (CPPs).

A polietilenimina (PEI) é o polímero catiónico sintético mais utilizado, existindo em diversos pesos moleculares e estruturas lineares ou ramificadas. A abundância de aminas favorece a formulação de sistemas de entrega PEI/DNA com elevada carga superficial, o que melhora a eficiência da transfecção, mas também aumenta a toxicidade. A conjugação de PEI com outras moléculas é uma abordagem possível para reduzir a toxicidade. Para aumentar a eficiência das vacinas de DNA, várias estratégias têm-se concentrado no direcionamento de células apresentadoras de antígenos (APCs). O desenvolvimento de novas formulações contendo ligandos específicos para direcionar e entregar vacinas de DNA

em APCs tem sido explorado. Neste contexto, os ligandos de manose são frequentemente usados para ligar a receptores de manose que são altamente expressos em superfícies de DC e macrófagos.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas binários e ternários, baseados no polímero PEI, no péptido R8 e em ligandos de manose, para entrega direcionada de uma vacina de mcDNA às APCs. Os sistemas foram formulados com vários rácios N/P (relação entre grupos amina e grupos fosfato) e as suas propriedades estruturais, físico-químicas e de estabilidade foram estudadas, a fim de identificar o sistema de entrega mais eficiente. Para avaliar a captação e internalização celular bem como a eficiência de transfecção destes sistemas, foram realizados ensaios de transfecção *in vitro* com diferentes linhas celulares.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que a elevada densidade de carga e capacidade de condensação do PEI e R8 aumentam a interação com o mcDNA, levando à formação de partículas menores. A adição do polímero PEI ao sistema binário R8-manose/mcDNA não só reduz o tamanho como também aumenta o potencial zeta e a estabilidade do sistema. Os estudos de microscopia de fluorescência confocal confirmaram a localização intracelular de sistemas de direcionamento, resultando na captação sustentada de mcDNA. Além disso, a eficiência da transfecção *in vitro* pode ser influenciada pela presença de R8-manose, com grandes implicações para a expressão génica. Os sistemas ternários R8-manose/PEI/mcDNA podem ser considerados ferramentas valiosas para instigar novas pesquisas, visando avanços no campo das vacinas de DNA.

Palavras-chave

Cancro do colo do útero; manose; polietilenimina; péptido R8; vacinas de DNA minicircular.

Abstract

Cancer is a disease that continues to spread worldwide and is a major cause of mortality, but the likelihood of finding a cure has increased due to the various studies that have been done in recent years. Cervical cancer is the most relevant disease associated with human papillomavirus (HPV) infection, especially when it is not detected early and develops into invasive forms. Overexpression of HPV oncoproteins E6 and E7 disrupts cell cycle regulation and proliferation through the involvement of tumor suppressor proteins p53 and pRb, respectively. Although prophylactic HPV vaccination is currently the best strategy to prevent cervical cancer, this type of vaccine is not effective in treating pre-existing infections. To address this gap, several types of therapeutic vaccines against HPV have been investigated. DNA vaccines have gained particular importance due to their ability to generate cellular and humoral immune responses by using sequences of the genetic material of the pathogen to be targeted. Mini-circular DNA (mcDNA) is an innovative and promising DNA molecule, as the absence of prokaryotic sequences overcomes some of the major limitations of traditional plasmid DNA.

The success of DNA vaccines depends heavily on the development of efficient gene delivery systems that must be able to condense and protect DNA, bind to the membrane, and internalize into eukaryotic cells, overcoming all intracellular and extracellular barriers. Viral vectors provide high transfection efficiency for eukaryotic cells. However, they have significant drawbacks, such as antigenicity, potential oncogenic effects, possible recombination of the virus, or difficulties in large-scale production and storage. To overcome these limitations, several attempts have been made to develop delivery systems for non-viral genes based on liposomes, synthetic or natural cationic polymers and cell-penetrating peptides (CPPs).

Polyethylenimine (PEI) is the most commonly used synthetic cationic polymer, existing in various molecular weights and linear or branched structures. The abundance of amines favors the formulation of PEI/DNA delivery systems with a high surface loading, which improves the efficiency of transfection, but also increases toxicity. Conjugation of PEI with other molecules is a possible approach to reduce toxicity. To increase the efficiency of DNA vaccines, several strategies have focused on targeting APCs. The development of new formulations containing specific ligands to target DNA vaccines to APCs has been explored. In this context, mannose ligands that bind to mannose receptors, highly expressed on DC surfaces and macrophages, are commonly used.

The aim of this work was to develop new binary and ternary systems based on the polymer PEI, R8 and mannose ligands for the targeted delivery of an mcDNA vaccine to APCs. The systems were formulated with different N/P ratios and their structural, physicochemical and stability properties were studied to identify the most efficient delivery system. To evaluate the cell uptake and internalization as well as the transfection efficiency of these systems, *in vitro* transfection assays were performed using different cell lines.

The results obtained in this work show that the high charge density and condensation ability of PEI and R8 increase the interaction with mcDNA, leading to the formation of smaller particles. The addition of the PEI polymer to the binary R8-mannose / mcDNA system not only reduces the size, but also increases the zeta potential and stability of the system. Fluorescence Confocal microscopy studies confirmed the intracellular location of the targeting systems, resulting in sustained mcDNA uptake. Moreover, the efficiency of *in vitro* transfection can be affected by the presence of R8-mannose, which has significant implications for gene expression. The ternary R8-mannose / PEI / mcDNA systems can be considered as valuable tools to initiate new research aimed at advancing the field of DNA vaccines.

Key-words

Cervical Cancer; mannose; minicircle DNA vaccine; polyethyleneimine; R8 peptide.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Cancro.....	1
1.2. Cancro do colo do útero.....	3
1.3. Vírus do papiloma humano.....	3
1.3.1- Genoma do HPV.....	4
1.3.2- Ciclo de Vida do HPV	5
1.3.3- Oncoproteínas.....	6
1.3.3.1- Oncoproteína E6.....	6
1.3.3.2- Oncoproteína E7.....	7
1.3.4- Fatores de Risco e Estratégias de prevenção	7
1.4. Vacinas preventivas e terapêuticas contra a infecção pelo HPV	8
1.5. Terapias baseadas em DNA.....	9
1.5.1- Terapia génica.....	9
1.5.2- Vacinas de DNA.....	10
1.6. DNA plasmídico	12
1.6.1- Construção do DNA plasmídico	13
1.6.2- Produção do DNA plasmídico	13
1.6.3- Purificação do DNA plasmídico	14
1.6.3.1- Cromatografia de exclusão molecular	14
1.6.3.2- Cromatografia de interação hidrofóbica.....	15
1.6.3.3- Cromatografia de Fase reversa.....	15
1.6.3.4- Cromatografia de troca aniónica.....	16
1.6.3.5- Cromatografia de afinidade	16
1.6.3.6- Suportes Monolíticos	17
1.7. DNA minicircular.....	17
1.7.1- Produção do DNA minicircular	18
1.7.2- Purificação do DNA minicircular	20

1.8.	Sistemas de entrega	21
1.8.1-	Vetores virais	22
1.8.2-	Vetores não virais	24
1.8.2.1-	Métodos Físicos	24
1.8.2.2-	Métodos Químicos	26
1.9.	Péptidos de penetração celular	29
1.9.1-	R8 (Octa-arginina)	30
1.10.	Veículos de entrega funcionalizados.....	31
Capítulo 2 – Objetivos		34
Capítulo 3 – Materiais e Métodos		36
3.1.	Produção	36
3.1.1.	Condições de crescimento bacteriano.....	36
3.2.	Extração e purificação do mcDNA-E7mutado.....	36
3.2.1.	Lise alcalina modificada	36
3.2.2-	Purificação do mcDNA-E7mutado através de cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular	37
3.2.3.	Eletroforese em gel de agarose	37
3.3.	Síntese de nanopartículas	37
3.4.	Determinação da eficiência de encapsulação.....	38
3.5.	Morfologia das nanopartículas	38
3.6.	Tamanho e potencial zeta das nanopartículas.....	39
3.7.	FTIR.....	39
3.8.	Estudos de estabilidade.....	39
3.9.	Linhas celulares e condições de cultura	39
3.10.	Viabilidade Celular	40
3.11.	Estudos de transfeção <i>in vitro</i>	40
3.11.1.	Marcação do plasmídeo com FITC	40
3.11.2.	<i>Live cell imaging</i>	41
3.12.	Transcrição do gene	41
3.12.1.	Extração de RNA	41

3.12.2. Síntese de cDNA	42
3.12.3. RT-PCR.....	42
3.12.4. RT-qPCR.....	42
3.12.4.1. Eficiência de primers.....	43
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	47
4.1. Influência do antibiótico na produção de mcDNA	47
4.2. Propriedades dos sistemas binários formulados.....	52
4.3. As propriedades dos sistemas ternários.....	58
4.4. Estudos de transfeção <i>in vitro</i>	66
4.4.1. Ensaio de Viabilidade Celular	66
4.4.2. Eficiência de transfeção	67
4.4.3. RT-PCR.....	69
4.4.4. RT-qPCR.....	70
Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras	73
Capítulo 6 - Referências Bibliográficas.....	76
Anexo I.....	90
Anexo II	92

Lista de Figuras

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1: Taxa de incidência de novos casos de cancro em 2018.....	2
Figura 2: Taxa de mortalidade do cancro em 2018.	2
Figura 3: Organização genómica do vírus do papiloma humano.	4
Figura 4: Ciclo de vida do vírus HPV.....	5
Figura 5: Ação da oncoproteína E6.....	6
Figura 6: Ação da oncoproteína E7.....	7
Figura 7: Capacidade de indução de respostas humorais e celulares.....	11
Figura 8: Representação das três etapas do processo biotecnológico.....	13
Figura 9: Representação da produção do mcDNA a partir do PP.	19
Figura 10: Estrutura do péptido R8.....	30
Figura 11: Vantagens dos sistemas de entrega direcionada.	31

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

Figura 12: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene housekeeping GAPDH em células Raw com uma eficiência de 106,52%.....	44
Figura 13: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene housekeeping GAPDH em fibroblastos com uma eficiência de 103,58%.	44
Figura 14: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene E7 em células Raw com uma eficiência de 104,35%.	45
Figura 15: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene E7 em fibroblastos com uma eficiência de 107,04%.	45

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Figura 16: Perfil cromatográfico da amostra de lisado, extraída de células provenientes da experiência com adição de antibiótico na pré-fermentação, fermentação e indução, na coluna <i>Sephacryl S-1000 SF</i> (I); Respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo (II).....	48
---	----

Figura 17: Perfil cromatográfico da amostra de lisado, extraída de células provenientes da experiência com adição de antibiótico somente na pré-fermentação e fermentação, na coluna <i>Sephacryl S-1000 SF</i> (I); Respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo (II).....	49
Figura 18: Perfil cromatográfico da amostra de lisado, extraída de células provenientes da experiência sem adição de antibiótico, na coluna <i>Sephacryl S-1000 SF</i> (I); Respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo (II).	50
Figura 19: Eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas por pico ao longo tempo.	51
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados (R8-mannose/mcDNA-E7mut) a diferentes rácios em triplicado.....	53
Figura 21: Espectro de FTIR (Absorbance vs Wavenumber (cm ⁻¹)) do mcDNA (A), R8-manose (B) e do sistema R8-manose/mcDNA-E7mut.....	54
Figura 22: Imagens SEM das nanopartículas R8-manose/mcDNA-E7mut formuladas....	55
Figura 23: Eletroforese em gel de agarose para analisar a estabilidade dos sistemas binários e conseqüente proteção do vetor de mcDNA após a sua incubação com DMEM + 10%FBS (A) e com tripsina (B).	57
Figura 24: Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 10 de PEI e apenas mudando o rácio de R8.....	58
Figura 25: Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 5 de PEI e apenas mudando o rácio de R8.....	59
Figura 26: Espectro de FTIR (Absorbance vs Wavenumber (cm ⁻¹)) do mcDNA (A), do sistema R8-manose/mcDNA-E7mut (B) do sistema PEI/R8-manose/mcDNA-E7mut (C) e do sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut (D).....	60
Figura 27: Imagens SEM das nanopartículas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut formuladas.	61
Figura 28: Eletroforese em gel de agarose para analisar a proteção do vetor de mcDNA após a sua incubação com DMEM + 10%FBS (A) e com tripsina (B). Sistemas formulados (R8-	

mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 5 de PEI e apenas mudando o rácio de R8.....	64
Figura 29: Eletroforese em gel de agarose para analisar a proteção do vetor de mcDNA após a sua incubação com DMEM + 10%FBS (A) e com tripsina (B). Sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 10 de PEI e apenas mudando o rácio de R8.....	65
Figura 30: Viabilidade celular dos Fibroblastos (A) e das células Raw 264.7 (B), após 24 e 48 h de incubação com os sistemas de R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut de diferentes rácios N/P.....	66
Figura 31: Avaliação da capacidade de transfeção dos sistemas PEI/mcDNA-E7mut (rácio N/P 5:1) e R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (rácio N/P 2:5:1).	68
Figura 32: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. Avaliação dos transcritos de E7 após 24 horas de transfeção em células Raw (A) e em fibroblastos (B).....	69
Figura 33: RT-qPCR dos níveis de expressão de E7 em células RAW 264.7 (A) e em fibroblastos (B).....	71

Lista de Tabelas

Capítulo 1 - Introdução

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos vetores virais..... 23

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos métodos físicos..... 25

Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos métodos químicos..... 29

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

Tabela 4: Concentração da amostra final resultante da junção das frações de cada pico (ng/uL) medida no Nanodrop..... 52

Tabela 5: Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de R8-mannose/mcDNA-E7mut formuladas para os diversos rácios..... 56

Tabela 6: Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de PEI/mcDNA-E7mut formuladas para os diversos rácios..... 62

Tabela 7: Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut formuladas para os diversos rácios..... 62

Lista de Acrónimos

AAHS: sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo

APCs: células apresentadoras de antígenos

Au: ouro

cDNA: DNA complementar

CLRs: receptores de lectina do tipo C

CO₂: Dióxido de Carbono

CPPs: péptidos de penetração celular

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindole

DCs: células dendríticas

DLS: *Dynamic Light Scattering*

DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium with Ham's F-12 Nutrient Mixture*

DMEM-HG: *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO: Densidade ótica

DP: Desvio Padrão

DRC: domínios de reconhecimento de carboidratos

dsDNA: DNA de cadeia dupla ("double string")

E. coli: *Escherichia coli*

E2F: Fator de Transcrição

E6AP: *E6-associated protein*

E7 mutado: E7mut

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPR: efeito de permeabilidade e retenção aumentada

EV: epidermodisplasia verruciforme

FBS: Soro fetal bovino

FibrH: Fibroblastos humanos

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FTIR: Espectroscopia de Infravermelhos com Transformadas de Fourier

FW: Forward

g: Unidade de aceleração

gDNA: DNA genómico

h: horas

HBV: vírus da hepatite B

HCl: Ácido Clorídrico

HIC: cromatografia de interação hidrofóbica

HPV: Vírus do Papiloma Humano

kDa: Quilo Daltons

Kpb: Quilo pares de bases

LB: Meio *Luria-Bertani*

LCR: Região Longa de Controlo

m/v: Massa/volume

M: Molar

mA: Miliamperes

mcDNA: DNA minicircular

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MHC: complexo maior de histocompatibilidade

min: minutos

mP: Mini-plasmídeo

MPL: monofosforil lipídico A

N: Grupos amina

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Cloreto de sódio

NIBS: *ótica não-invasiva de retroespalhamento*

oc: circular aberta

OPRs: *Open reading frames*

P: Grupos fosfato

PAA: ácido poliacrílico

PAE: poli (éster alifático)

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PDMAEMA: poli (N, N-dimetilaminoetil metacrilato)

pDNA: DNA plasmídico

PEI: Polietilenimina

PLL: Poli (L-lisina)

PP: Plasmídeo Parental

pRB: Proteína Retinoblastoma

R8: Octa-arginina

Região E: Região *early* ou precoce

Região L: Região *late* ou tardia

RNA: Ácido Ribonucleico

rpm: Rotações por minuto

RT-PCR: *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR: *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

RV: Reverse

sc: superenrolada

SDS: Dodecil sulfato de sódio

seg: segundos

SEM: Microscopia Eletrónica de Varrimento

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TB: *Terrific Broth*

TRIS: Tris (hidroximetil) aminometano

UV: Ultra-violeta

v/v: Volume/volume

VLPs: partículas semelhantes ao vírus

Lista de comunicações científicas

Comunicação de poster no XV Simpósio Anual do CICS-UBI, Covilhã (2020): Serra, A.S.; Eusébio, D.; Neves, A.R.; Costa, D.; Sousa, Â. Formulation of R8-based nanosystems to delivery a minicircle DNA vaccine to dendritic cells. (Anexo I)

Lista de publicações científicas

Serra, A.S.; Eusébio, D.; Neves, A.R.; Albuquerque, T.; Bhatt, H.; Biswas, S.; Costa, D.; Sousa, Â. Synthesis and Characterization of Mannosylated Formulations to Deliver a Minicircle DNA Vaccine. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 673. (Anexo II)

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Cancro

O cancro é uma doença associada ao crescimento anormal e descontrolado de células por ação de um agente iniciador que provoca uma mutação no DNA. Pode igualmente ser causado por vírus e bactérias associados a infeções crónicas, como é o caso do vírus do papiloma humano (HPV) que assume algum destaque no processo de desenvolvimento do cancro do colo do útero [1]. Por causas muito diferentes, estas células começam a multiplicar-se e a crescer sem controlo, dando origem a linhas celulares contínuas e imortalizadas capazes de invadir outros tecidos. As células de cancro têm a capacidade de se disseminarem pelo organismo usando os sistemas circulatório e linfático, dando origem a metástases [2].

Embora o cancro seja uma doença que continua a proliferar em todo o Mundo, a probabilidade de cura é cada vez maior. Ainda assim, este continua a ser uma das principais causas de mortalidade. Apesar dos grandes avanços na compreensão das bases moleculares do cancro e do progresso na deteção e tratamento desta doença, a mortalidade é ainda bastante elevada. Em 2018, registaram-se, em todo o mundo, 18 milhões de novos casos, sendo 23,4% na Europa e 6,2% em Portugal. Em média, há um risco de cerca de 20% de a população mundial contrair cancro antes dos 75 anos e de 10% morrer em consequência da doença [3].

Segundo a base de dados do *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), a nível mundial, um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres desenvolvem cancro durante a vida, e um em cada oito homens e uma em cada onze mulheres morrem da doença. O número total de pessoas vivas dentro de cinco anos após o diagnóstico de cancro, chamado de prevalência durante cinco anos, é estimado em 43,8 milhões [4].

Os cancros de pulmão, mama e colorretal são os três principais em termos de incidência e estão classificados entre os cinco primeiros em termos de mortalidade. Juntos, são responsáveis por um terço da incidência e da mortalidade em todo o mundo (figura 1). O cancro de pulmão é responsável pelo maior número de mortes (18,4%), seguido pelo cancro colorretal (9,2%), cancro de estômago e cancro de fígado (8,2%). O cancro da mama é classificado como a quinta principal causa de morte (6,6%), porque o prognóstico é relativamente favorável, especialmente nos países mais desenvolvidos (figura 2) [4].

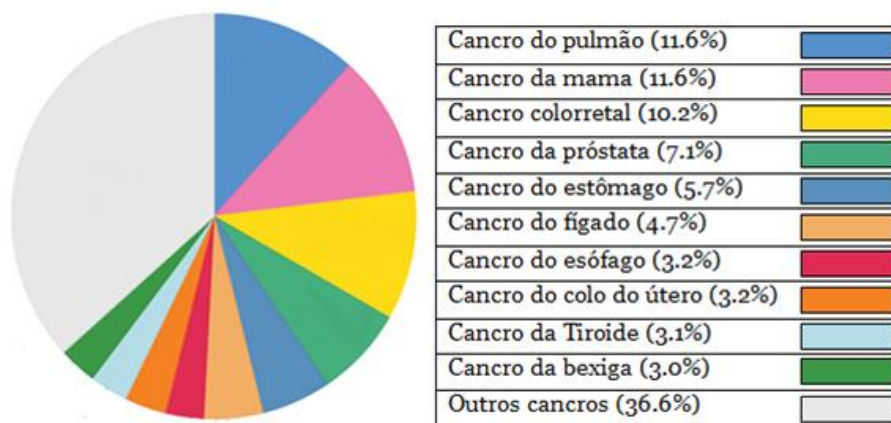


Figura 1: Taxa de incidência de novos casos de cancro em 2018 (Adaptado de [4]).

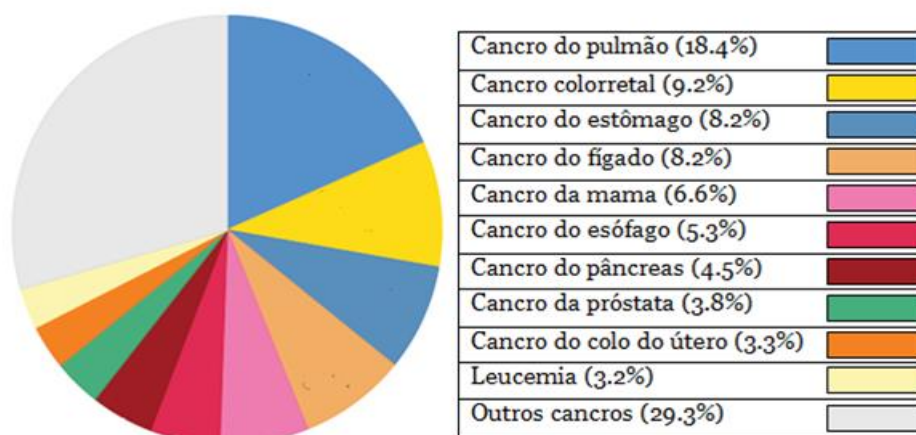


Figura 2: Taxa de mortalidade do cancro em 2018 (Adaptado de [4]).

O aumento da incidência e mortalidade por cancro está normalmente relacionado com o envelhecimento e crescimento da população, bem como com alterações na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco, muitos dos quais associados ao desenvolvimento socioeconómico. Na maior parte do continente africano, o cancro do colo do útero foi a principal causa de morte entre as mulheres, continuando a ser um grande problema de saúde pública que afeta mulheres de meia-idade, principalmente em países com poucos recursos. Foi igualmente classificado como um dos três principais tipos de cancro que afetam mulheres com menos de 45 anos em 146 (79%) dos 185 países avaliados [5].

1.2. Cancro do colo do útero

Considerando os dados fornecidos pelo *Global Cancer Observatory*, o cancro do colo do útero é o quarto cancro mais comum entre as mulheres, sendo a principal causa de morte entre as mulheres do leste, centro, sul e oeste de África. Em 2018, aproximadamente 570.000 mulheres desenvolveram este tipo de cancro e 311.000 mulheres foram vítimas da doença [5].

O cancro do colo do útero é a doença mais relevante associada à infeção por HPV, especialmente quando não é detetado precocemente, evoluindo para formas invasivas. A maioria dos casos invasivos deste tipo de cancro (79% a 100%) é responsável pela presença de DNA pertencente a tipos de HPV de alto risco, dos quais cerca de 70% estão relacionados com o HPV-16 e HPV-18 [6].

Nos países desenvolvidos, as taxas de incidência e mortalidade do cancro do colo do útero foram duas a quatro vezes menores do que as dos países com menos recursos, que registaram uma percentagem de cerca de 84% de casos e 88% de mortes causadas por esta doença. Este contraste reflete diferenças na exposição a fatores de risco e desigualdades no acesso a triagem adequada no tratamento do cancro. A distribuição de vacinas profiláticas baseadas em partículas virais poderá ter contribuído para a diminuição da infeção pelo HPV e conseqüente diminuição do número de casos em países desenvolvidos, com fácil acesso à vacinação [6]. Outros fatores devem ser igualmente considerados, nomeadamente algumas infeções sexualmente transmissíveis (HIV e *Chlamydia trachomatis*), tabagismo e contraceção hormonal oral [5] que serão abordados posteriormente.

1.3. Vírus do papiloma humano

O vírus do papiloma humano, da família *Papillomaviridae*, pertence a uma categoria de pequenos vírus de cadeia dupla de DNA circular e não envelopada, medindo 50–55 nm de diâmetro [7]. O HPV é responsável por um elevado número de infeções, que na maioria das vezes são assintomáticas e de regressão espontânea [8]. No entanto, a infeção persistente por HPV de alto risco pode causar cancro no colo do útero, vulva, vagina, ânus, pênis e no trato respiratório superior [1].

Os HPVs são responsáveis por uma série de doenças que causam infeções, tanto benignas como malignas, ao nível dos tecidos cutâneos e mucosas das membranas [8]. Existem mais de 200 genótipos de HPV identificados e agrupados em diferentes géneros - *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e

Nupapillomavirus -, de acordo com a estrutura do genoma viral e o tropismo nos tecidos epiteliais humanos. O género *Alpha* inclui genótipos descritos como causadores de cancro, enquanto os restantes incluem principalmente tipos responsáveis por lesões cutâneas [9]. Os tipos cutâneos causam lesões como, por exemplo, verrugas cutâneas e plantares e epidermodisplasia verruciforme (EV). Os tipos mucosos estão relacionados com lesões benignas e malignas que se manifestam sobretudo na região anogenital [10].

Os diferentes genótipos que infetam as mucosas encontram-se divididos em dois grupos, tendo por base as suas propriedades oncogénicas - alto risco e baixo risco. Nos HPV de alto risco incluem-se os tipos HPV16 e HPV18, que são responsáveis por 70% das lesões mais graves, nomeadamente o cancro do colo do útero [11].

1.3.1- Genoma do HPV

Tal como referido anteriormente, o HPV é constituído por uma cadeia dupla de DNA circular de aproximadamente 8000 pares de bases, com estrutura icosaédrica não envelopada e um tamanho entre os 50-55 nm de diâmetro [12].

O genoma do HPV é formado a partir de três regiões funcionais: a região E (*early* ou precoce) e a região L (*late* ou tardia), que compõem as oito ORF (*open reading frames*), e a LCR (região longa de controlo). As oito ORF são responsáveis pela codificação das proteínas estruturais responsáveis pela replicação e revestimento viral [12]. Estas proteínas podem ser divididas em estágio precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e estágio tardio (L1 e L2). No estágio precoce, as proteínas regulam a replicação do DNA viral (E1 e E2), a transcrição do RNA viral (E2), a reorganização do citoesqueleto (E4) e a transformação celular (E5, E6 e E7). Por outro lado, as proteínas tardias (L1 e L2) são componentes estruturais da cápside viral, contribuindo para a disseminação da infeção pelo sistema hospedeiro, através da libertação de partículas virais nas células epiteliais superficiais [6]. A LCR controla a replicação e transcrição dos genes que constituem as regiões E e L (figura 3) [12].

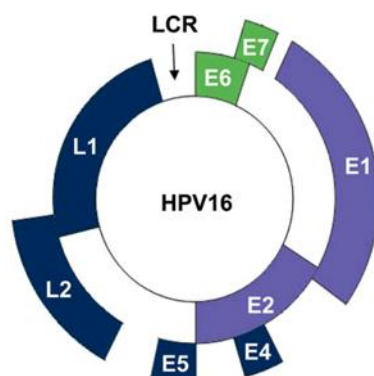


Figura 3: Organização genómica do vírus do papiloma humano (Adaptado de [13]).

1.3.2- Ciclo de Vida do HPV

A infecção pelo HPV ocorre na camada basal do epitélio, através de microlesões ou microfissuras que ocorram nessa região. O seu ciclo de replicação está intimamente ligado à diferenciação das células infetadas. Segundo Doorbar, o ciclo normal da infecção pelo HPV inclui cinco etapas: infecção, manutenção do genoma, fase proliferativa, amplificação genômica e por fim síntese e libertação de novas partículas virais [14].

Após a infecção das células epiteliais indiferenciadas dentro da camada celular basal, as proteínas E1 e E2 são expressas, regulando a replicação viral e a expressão de outros genes virais iniciais [15]. Quando as células basais se diferenciam para formar a camada suprabasal epitelial, o HPV codifica duas proteínas - E6 e E7 – que, em conjunto, promovem a proliferação celular, prolongam a progressão do ciclo celular e evitam a apoptose, sendo consideradas as oncoproteínas do HPV. A célula passa a apresentar um ciclo de vida mais rápido e a dividir-se mais frequentemente. As células transformadas aumentarão em número e acabarão por substituir as normais. Assim, o vírus promove a sua proliferação no tecido, sem ter que destruir a célula infetada (figura 4) [1]. Na fase final do ciclo, inicia-se a síntese das proteínas tardias L1 e L2 nas camadas mais superficiais do epitélio. Em células mais diferenciadas, dá-se a produção de viriões. A libertação dos vírus ocorre nos queratinócitos localizados mais superficialmente, à medida que estes vão morrendo [14]. De salientar que a proteína E2 tem um papel fundamental na regulação da expressão das oncoproteínas E6 e E7. A sua ausência após a integração do DNA do HPV no genoma da célula infetada leva à expressão elevada destas oncoproteínas, descrito como um processo que potencia o desenvolvimento de lesões malignas [16].

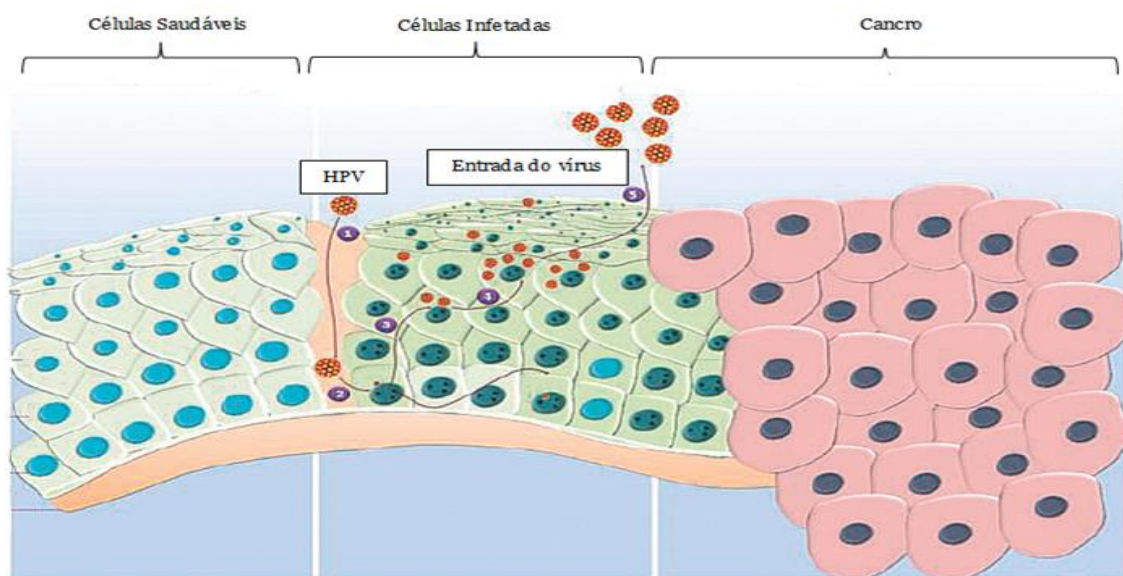


Figura 4: Ciclo de vida do vírus HPV (Adaptado de [17]).

1.3.3- Oncoproteínas

O potencial oncogénico do HPV reside na atividade das oncoproteínas E6 e E7, que interagem com uma variedade de proteínas reguladoras do ciclo celular codificadas por genes supressores de tumor. A E6 apresenta uma maior afinidade para se ligar à p53, proteína responsável pela apoptose das células infetadas, e a E7 tem afinidade para a proteína do retinoblastoma (pRb), que é responsável pelo controlo/regulação do ciclo celular [11].

As oncoproteínas virais E6 e E7 são consideradas proteínas com atividade oncogénica, uma vez que têm a capacidade de desregular uma série de eventos celulares, como o ciclo celular, apoptose, reparação do DNA, senescência e diferenciação das células, o que provocará a acumulação de danos no DNA e, conseqüentemente, a progressão das células cancerígenas [7].

1.3.3.1- Oncoproteína E6

A oncoproteína E6 é formada por aproximadamente 150-160 aminoácidos e contém duas regiões de ligação com quatro “motifs” Cys-X-X-Cys [7]. A região de ligação do terminal C tem um “motif” de ligação a PDZ responsável pela interação com várias proteínas celulares com vista à sua inativação e degradação [11].

Como referido anteriormente, esta oncoproteína desempenha um papel importante devido à sua capacidade de interagir com a proteína p53. Esta interação ocorre através da formação de um complexo trimérico E6/E6AP/p53. E6 liga-se à proteína E6AP (*E6-associated protein*), uma proteína celular E3 ubiquitina-ligase, formando um heterodímero estável, a E6 – E6AP, que em seguida se associa à p53 [11]. A formação deste complexo origina a degradação da p53 por ubiquitinação e subsequente degradação proteolítica (figura 5) [18]. A redução da atividade da p53 favorece a replicação do DNA danificado e a sobrevivência celular anormal, que seria reparada ou eliminada pela indução de apoptose se a p53 fosse expressa em níveis normais [6]. A E6 demonstra igualmente capacidade de degradar outras proteínas celulares para evitar a apoptose, nomeadamente Bak, FADD e procaspase 8 [6].

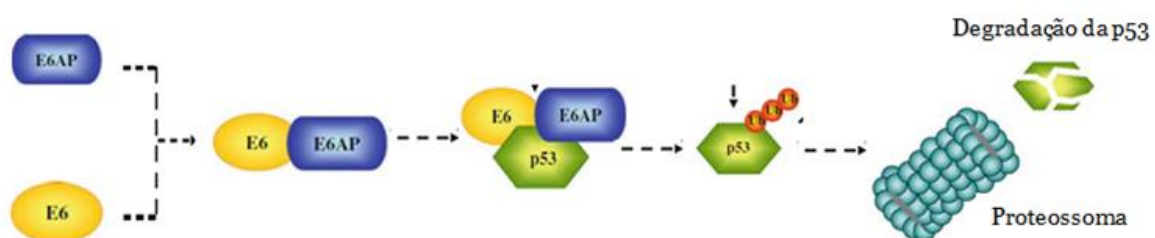


Figura 5: Ação da oncoproteína E6 (Adaptado de [19]).

1.3.3.2- Oncoproteína E7

A E7 é uma oncoproteína com 100 aminoácidos que possui uma região “motif” (LXCXE) e está dividida em três regiões conservadas (CR1, CR2 e CR3). Estas regiões controlam a sua interação com proteínas celulares, nomeadamente a proteína do retinoblastoma (pRb) [7].

A oncoproteína E7 inibe a atividade da pRb através da formação de complexos estáveis com fatores de transcrição da família E2F. Durante o ciclo celular normal, a interação pRb–E2F é fundamental para a progressão normal da célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Porém, nas células infetadas por HPV, a E7 é expressa e liga-se à pRb, interrompendo o seu complexo com E2F e permitindo, desta forma, a entrada prematura da célula na fase S, provocando uma proliferação celular descontrolada [7]. A pRb regula negativamente a atividade do fator de transcrição da família E2F. Quando a pRb é desativada pela E7, o fator de transcrição E2F é regulado positivamente e os genes de proliferação celular são ativados (figura 6) [11].

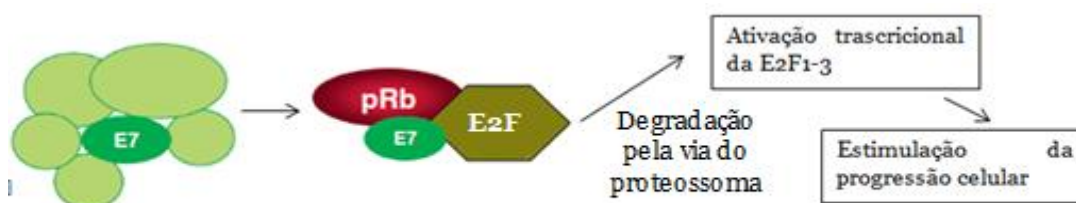


Figura 6: Ação da oncoproteína E7 (Adaptado de [21]).

Foi demonstrado que a proteína E7 de HPV de baixo e alto risco tem como alvos os membros da família pRB, incluindo a p107 (RBL1) e a p130 (RBL2), duas proteínas que também regulam a proliferação do ciclo celular através da ligação ao fator de transcrição E2F [11]. Assim sendo, podemos afirmar que a oncoproteína E7 de HPV de alto risco tem a capacidade de interagir com outras proteínas envolvidas na proliferação celular e imortalizar células por desregular mecanismos de apoptose [20].

1.3.4- Fatores de Risco e Estratégias de prevenção

A infecção pelo HPV é a principal causa para a ocorrência do cancro do colo do útero. No entanto, outros fatores de risco contribuem para o aumento de uma infecção persistente por HPV e conseqüente progressão para cancro, como tabagismo, multiplicidade de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce, uso prolongado de contraceptivos orais, deficiências nutricionais, imunodeficiência, predisposição genética e co-infecção com o vírus do herpes simplex tipo 2 ou o vírus da imunodeficiência humana [22]. A vulnerabilidade social

constitui igualmente um problema que possibilita a ocorrência e o desenvolvimento da doença, uma vez que pode condicionar o acesso a medidas preventivas.

A deteção pode ocorrer por meio de um exame citopatológico, o teste de Papanicolau, que tem sido o método de eleição para o rastreio do cancro do colo do útero, uma vez que permite a identificação da doença no seu estágio inicial. Contudo, apesar de ter sido fundamental no diagnóstico precoce de lesões precursoras do cancro, tem demonstrado uma taxa relativamente alta de falsos positivos, bem como de falsos negativos [8].

A vacinação surge assim como o método de prevenção mais eficaz. O desenvolvimento de vacinas profiláticas tem permitido, ao longo dos anos, reduzir a incidência de doenças relacionadas com o HPV, como o cancro do colo do útero [22].

1.4. Vacinas preventivas e terapêuticas contra a infeção pelo HPV

A introdução de vacinas preventivas contra a infeção por HPV tem revelado resultados consideráveis na redução da incidência de doenças relacionadas com este vírus, incluindo verrugas genitais, displasia cervical e cancro do colo do útero [23]. Este tipo de vacinas estimula o organismo a produzir anticorpos que, quando confrontados com o HPV, bloqueiam os viriões do vírus antes de estes terem acesso à camada celular basal proliferativa da superfície epitelial [1]. As vacinas preventivas, denominadas por profiláticas, são constituídas por partículas semelhantes ao vírus (VLPs), que são produzidas a partir da expressão recombinante da proteína capsídica principal L1 do HPV [24].

Existem atualmente três vacinas profiláticas em comercialização: Cervarix® (vacina bivalente contra o HPV16 e HPV18), Gardasil® (vacina quadrivalente contra o HPV6, 11, 16 e 18) e Gardasil 9® (vacina nonavalente contra o HPV6, 11, 16, 18,31, 33, 45, 52 e 58) [25]. O esquema de vacinação prevê a administração de três doses por via intramuscular para os três tipos de vacinas. Atualmente, em Portugal, a vacina contra o HPV incluída no Programa Nacional de Vacinação é a Gardasil 9® [26]. Para criar uma resposta imune mais forte, dois adjuvantes foram associados às vacinas atualmente disponíveis contra o HPV - sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo (AAHS) nas vacinas Gardasil® e Gardasil 9®; e adjuvante ASO₄ na vacina Cervarix® [23]. O sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo (AAHS) pertence ao grupo de sais de alumínio, frequentemente utilizados em vacinas profiláticas. Já o sistema adjuvante ASO₄ assenta na combinação de adjuvantes, uma vez que é composto por monofosforil lipídico A (MPL) adsorvido em hidróxido de alumínio,

sendo considerado como um adjuvante à base de lípidos ou óleos. É atualmente usado em vacinas contra o vírus do papiloma humano (HPV) e vírus da hepatite B (HBV) [27, 28].

Embora a vacinação profilática contra o HPV seja atualmente a melhor estratégia de prevenção do cancro do colo do útero, este tipo de vacinas induz apenas imunidade humoral (produção de anticorpos neutralizantes) evitando assim futuras infeções, não sendo eficaz no tratamento das infeções já existentes. Para colmatar esta lacuna, vários tipos de vacinas terapêuticas contra o HPV estão em estudo [29]. As vacinas terapêuticas são projetadas para induzir imunidade específica mediada por células, que impede o desenvolvimento de lesões e elimina lesões pré-existentes ou mesmo tumores malignos. O seu principal alvo são as oncoproteínas E6 e E7, uma vez que são as principais responsáveis pela transformação maligna induzida pela infeção com o HPV. Além disso, são essenciais para a indução e manutenção da transformação celular [24]. Assim, o objetivo deste tipo de vacinas é conferir imunidade celular através da ativação de células efetoras e linfócitos citolíticos para eliminar as células infetadas [7].

1.5. Terapias baseadas em DNA

A maioria dos planos de tratamento do cancro, incluindo o cancro do colo do útero, envolve cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. Embora estes tratamentos tenham obtido sucesso em doentes com cancro em fase inicial, a ação sobre células saudáveis e consequentes efeitos adversos, o estado avançado da doença e a formação de metástases continua a pôr em risco a vida dos doentes [30].

A elevada prevalência de lesões e neoplasias associadas ao HPV em todo o mundo, principalmente em países pouco desenvolvidos, revela que há uma necessidade premente de desenvolver novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, a terapia génica surge como uma opção promissora, apresentando estratégias de tratamento que incluem a substituição ou alteração da expressão de alguns genes que promovem o processo tumoral, como é o caso dos oncogenes E6 e E7 do HPV. Também as vacinas de DNA assumem particular destaque devido à capacidade de gerar uma resposta imune celular e humoral, baseando-se no uso de sequências de material genético do agente patogénico que se pretende combater [30].

1.5.1- Terapia génica

A terapia génica atrai grande interesse devido ao seu potencial efeito terapêutico em relação a várias doenças, como desordens genéticas, certas infeções virais e cancro [31]. Trata-se de uma técnica que utiliza ácidos nucleicos para reparar uma disfunção causada por um defeito

genético ou introduzir funções adicionais para tratar ou evitar a progressão de uma doença [32].

A terapia génica pode ser realizada em dois tipos de células, as somáticas e as germinativas. A diferença entre estas duas abordagens é que, ao contrário do que acontece em células germinativas, nas somáticas não há transmissão do material genético às células descendentes [33]. Contudo, a abordagem com células somáticas é a mais desenvolvida atualmente.

A terapia génica consiste num processo complexo, sendo necessário garantir a entrega do material genético ao núcleo da célula alvo sem sofrer degradação. Para tal, será necessário utilizar um sistema de entrega eficaz, que seja capaz de proteger e transportar a informação genética, que não interaja com células endoteliais vasculares e componentes do sangue evitando a absorção pelo sistema reticuloendotelial. O veículo de entrega utilizado para efetuar este tipo de terapia, deve igualmente ser pequeno o suficiente para passar através da membrana celular e alcançar o núcleo [32]. Entre a ampla gama de possíveis aplicações clínicas, a terapia génica no tratamento do cancro surge como uma das mais desafiantes e promissoras [34].

1.5.2- Vacinas de DNA

Atualmente, muitos tipos de cancro são curados, desde que tratados com administração de substâncias químicas ou radioterapia em estágios iniciais. No entanto, a taxa de mortalidade e morbidade das neoplasias associadas ao HPV e suas lesões precursoras continua a ser elevada. Por essa razão, torna-se urgente o desenvolvimento de vacinas terapêuticas eficazes contra o HPV [35].

As vacinas de DNA surgem como uma estratégia eficaz para o tratamento do cancro do colo do útero, associado à infeção pelo HPV. As oncoproteínas virais E6 e E7 são alvos adequados para a formulação de vacinas terapêuticas, uma vez que são sobreexpressas precocemente nas células infetadas com o HPV [36]. Contudo, será necessário erradicar o seu potencial oncogénico para aplicação em seres humanos, através da introdução de mutações pontuais que impeçam a interação/reconhecimento da E6 e E7 com p53 e pRb, respetivamente [37].

As vacinas de DNA são consideradas seguras, não imunogénicas, estáveis, de obtenção simples e económica, e pretendem estimular uma resposta imune específica e a indução de uma memória imunológica prolongada. Para tal, é necessário que os antigénios codificados nas vacinas de DNA sejam processados pelas células apresentadoras de antigénios (APCs), que por sua vez, vão ativar células de defesa imunológica, isto é, células T e células B [38].

A estimulação eficiente das células T pelas APCs requer a apresentação de fragmentos de antígenos na superfície das APCs pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe I e de classe II para serem reconhecidos pelos receptores das células T. Os fragmentos de antígenos endógenos, gerados no citoplasma das células pelo proteossoma, são apresentados por moléculas de MHC Classe I e estimulam os linfócitos T citotóxicos (células T CD8⁺), provocando a ativação de uma resposta imune celular. Os fragmentos de antígenos exógenos, adquiridos no meio extracelular, são apresentados por moléculas de MHC Classe II e estimulam as respostas das células T auxiliares (células T CD4⁺), que ativam as células B desencadeando uma resposta humoral através da produção de anticorpos de memória (figura 7) [39-42].

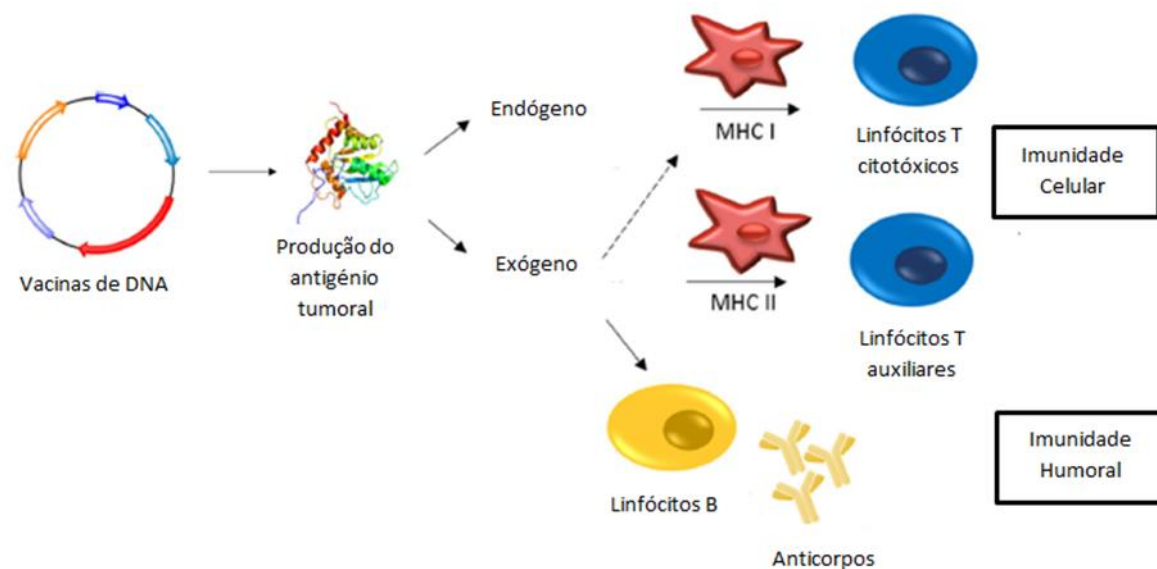


Figura 7: Capacidade de indução de respostas humorais e celulares (Adaptada de [42]).

As vacinas de DNA são, portanto, capazes de induzir ambos os tipos de imunidade, humoral e celular, o que lhes confere algumas vantagens em relação às vacinas convencionais. A rápida produção a baixo custo, a possibilidade de adaptação a patógenos emergentes e a elevada estabilidade térmica devido à molécula de DNA são outras vantagens a ter em consideração [35, 39].

No entanto, como principal desvantagem, é de salientar a baixa imunogenicidade destas vacinas quando testadas em animais de grande porte e em humanos, ao contrário do que tem sido observado nos testes *in vivo* com ratos, devido às barreiras biológicas extra e intracelulares para a entrega de genes [40, 43, 44]. Para aumentar a eficiência das vacinas de DNA em termos de imunogenicidade, várias estratégias têm-se focado no direcionamento de antígenos para as células dendríticas (DCs) [38].

As DCs são células apresentadoras de antígeno dotadas de uma extraordinária capacidade de estimular e regular a resposta dos linfócitos T e estão concentradas em áreas de potencial entrada de antígenos, especialmente em torno das superfícies epiteliais e mucosas [45]. As DCs no estado imaturo, encontram-se normalmente nos tecidos periféricos e são capazes de capturar e processar antígenos. Para isso empregam vários métodos de internalização de antígenos, como, fagocitose, endocitose mediada por receptores e macropinocitose [46]. Quando confrontadas com sinais de “perigo” resultantes de processos inflamatórios e infecciosos, as DCs entram nos vasos linfáticos aferentes e migram para os gânglios linfáticos, sendo gerados estímulos que desencadeiam a sua maturação [36, 47]. Durante este processo, as DCs sofrem várias alterações fenotípicas e funcionais, ocorrendo a produção de citocinas e quimiocinas, alterações na expressão de receptores de quimiocinas e ainda aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras e moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) contendo o antígeno que irá ser reconhecido pelo receptor dos linfócitos T [38, 48].

Tendo em mente as características funcionais das DCs, é expectável o desenvolvimento de novas e melhores formulações de vacinas de DNA direcionadas a este tipo de células, com vista à otimização da sua eficácia no que diz respeito a resultados imunológicos [38].

1.6. DNA plasmídico

O DNA plasmídico (pDNA) é uma pequena molécula, de cadeia dupla, capaz de se replicar autonomamente, e cujas extremidades estão ligadas covalentemente, formando um circuito fechado. O seu tamanho é medido por pares de bases (Kbp), podendo variar de 1 a 200 Kbp [49]. Nas últimas décadas, o DNA plasmídico tornou-se uma das ferramentas mais importantes em biologia molecular e, mais recentemente, em terapia génica e vacinação. O DNA plasmídico tem a capacidade de transportar certos genes, essenciais para a sobrevivência do hospedeiro, como genes de resistência a antibióticos e genes responsáveis pela síntese de certas proteínas. Além disso, o risco de integração de material genético no genoma do hospedeiro, em comparação com vetores virais, é praticamente nulo [50].

Estas moléculas possuem uma origem de replicação e assumem diferentes conformações estruturais, nomeadamente a circular aberta (oc), desnaturada, linear, superenrolada (sc) e oligomérica. Estas cinco isoformas são diferentes quanto à carga, tamanho, hidrofobicidade e exposição de bases. A obtenção da isoforma sc do pDNA é a recomendada para utilizar na vacinação de DNA e na terapia génica, sendo considerada a conformação biologicamente ativa devido à sua integridade estrutural que se reflete numa maior eficiência de expressão do gene alvo. Contudo, a isoforma sc pode converter-se em isoforma oc ou linear, sob a ação de certos procedimentos físicos e químicos, o que pode dificultar a etapa de purificação [51].

O processo de obtenção de DNA plasmídico envolve vários procedimentos divididos em três etapas que devem ser otimizadas e eficazes para maximizar a quantidade final desta biomolécula: a primeira envolve a construção de um vetor de expressão adequado e a escolha da estirpe bacteriana apropriada; a segunda (*upstream*) baseia-se na seleção e otimização das condições de produção; a terceira (*downstream*) está relacionada com o processo de isolamento e purificação do pDNA (figura 8) [52].

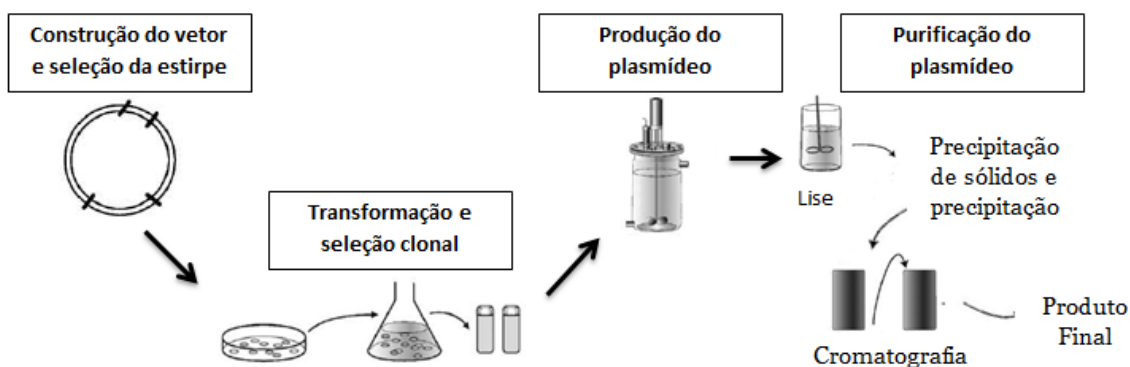


Figura 8: Representação das três etapas do processo biotecnológico (Adaptada de [53]).

1.6.1- Construção do DNA plasmídico

O desenvolvimento de um processo de produção de pDNA começa com a construção de um vetor e, em seguida, a seleção de uma estirpe hospedeira que irá clonar o plasmídeo de interesse. O pDNA deve incluir uma origem de replicação eficaz para a clonagem no hospedeiro e um gene de resistência a antibióticos para a seleção do crescimento. Deve igualmente incluir uma cassete de expressão eucariótica composta por um promotor da expressão celular eucariótica, uma sequência de terminação e o gene que codifica o antígeno de interesse [53].

Quanto à seleção da estirpe hospedeira, a produção de DNA plasmídico é quase exclusivamente baseada em bactérias Gram-negativas de *Escherichia coli* (*E.Coli*), uma vez que representam o organismo vivo bem caracterizado em termos genéticos, sendo facilmente modificadas por vários métodos de biologia molecular [54].

1.6.2- Produção do DNA plasmídico

É necessário um processo de fermentação eficiente para produzir grandes quantidades de pDNA. Nesse ponto, a otimização das condições de cultura, como componentes/nutrientes

do meio, pH, temperatura e oxigénio dissolvido são estabelecidas. O sucesso do processo de fermentação dependerá das interações entre o organismo hospedeiro, o vetor de DNA recombinante e o ambiente de crescimento [55]. Também é fundamental que a fermentação produza pDNA na conformação sc de forma a minimizar as impurezas e fontes de contaminação resultantes dos elementos do processo e meio de cultivo [54, 56].

Após a fermentação, é necessário proceder à recuperação da biomassa por centrifugação e à realização do processo de lise celular. Posteriormente, alguns processos de isolamento e extração de pDNA são realizados a fim de eliminar algumas impurezas precipitadas (DNA genómico (gDNA), algumas proteínas e RNA de alto peso molecular) e restos celulares. Por fim, é fundamental recorrer a processos de purificação adequados para eliminar as restantes impurezas e garantir o grau de pureza da amostra de pDNA que atenda às recomendações das agências reguladoras [52].

1.6.3- Purificação do DNA plasmídico

Diferentes técnicas cromatográficas, como exclusão molecular, troca aniónica, interação hidrofóbica, fase reversa ou cromatografia de afinidade, foram implementadas para isolar o pDNA na isoforma sc das impurezas remanescentes do hospedeiro. A semelhança entre as propriedades físicas e químicas do pDNA na isoforma sc com outras isoformas consideradas não funcionais e os ácidos nucleicos das células hospedeiras tem sido um desafio no processo de purificação. Para colmatar esta dificuldade, os ligandos imobilizados nos suportes cromatográficos foram otimizados, a fim de obter maior resolução e capacidade de ligação, além de desenvolver um bioreconhecimento específico e seletivo pela conformação desejada do plasmídeo, permitindo uma purificação eficiente [57].

1.6.3.1- Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular é uma técnica de separação baseada no tamanho molecular dos componentes da amostra, medido pela eficiência com que penetram nos poros da fase estacionária. As moléculas de maior dimensão, que não entram nos poros da matriz cromatográfica, eluem primeiro, enquanto as moléculas mais pequenas, cujo diâmetro permite que elas entrem nos poros, demoram mais tempo a eluir. Assim sendo, moléculas como o DNA genómico e o DNA plasmídico eluem rapidamente, ao passo que moléculas como RNA, endotoxinas e proteínas, realizam um percurso mais longo através dos poros da matriz sendo retardados na coluna cromatográfica. Apesar de permitir uma separação eficiente do DNA plasmídico das impurezas de menor dimensão, esta técnica apresenta limitações na remoção do DNA genómico e no isolamento da isoforma sc [52].

1.6.3.2- Cromatografia de interação hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) explora as diferenças de hidrofobicidade entre as moléculas presentes numa amostra. Esta técnica baseia-se na interação reversível entre os grupos hidrofóbicos das biomoléculas e os ligandos hidrofóbicos da matriz. A ligação à matriz cromatográfica é promovida com elevadas concentrações de sal, impulsionada principalmente por um deslocamento de moléculas de água ordenadas em torno das biomoléculas e dos ligandos imobilizados. Geralmente, um gradiente decrescente de sal é usado para eluir as amostras em ordem crescente de hidrofobicidade [58].

A cromatografia de interação hidrofóbica é frequentemente usada porque, apesar do complexo mecanismo envolvido na interação, as biomoléculas sofrem danos estruturais reduzidos e a sua atividade biológica é mantida. Assim, a purificação com base na hidrofobicidade é obtida com requisitos mínimos de solvente e com potencial de degradação mínima do produto. A temperatura, pH e sais podem ter um impacto significativo na retenção e seletividade desta técnica. Contudo, uma correta seleção e otimização destas condições irá permitir que as biomoléculas sejam separadas de forma eficiente [58].

No caso particular dos ácidos nucleicos, a cromatografia de interação hidrofóbica pode ser aplicada na purificação do pDNA através da manipulação das diferenças de hidrofobicidade do pDNA, ácidos nucleicos de cadeia simples e endotoxinas. A retenção de ácidos nucleicos é afetada principalmente pelo seu tamanho, composição das bases e estrutura das moléculas. Assim, esta técnica permite uma separação eficiente entre o pDNA e o RNA ou endotoxinas, embora não se verifique a separação das diferentes isoformas do pDNA ou do gDNA de cadeia dupla [58].

1.6.3.3- Cromatografia de Fase reversa

A cromatografia de fase reversa é um método cromatográfico que se baseia na interação das regiões hidrofóbicas das moléculas alvo e dos ligandos imobilizados não polares. As moléculas ligadas são eluídas por ordem crescente de hidrofobicidade, propriedade que é definida por características como composição da base, comprimento da cadeia e estrutura secundária. Os ácidos nucleicos de maior tamanho são retidos por mais tempo, o que é consistente com o facto de os oligonucleótidos de cadeia simples se ligarem mais firmemente às matrizes do que os fragmentos de cadeia dupla de igual tamanho [59]. RNA de baixo peso molecular, fragmentos de gDNA e pDNA linear são separados do pDNA sc de forma eficaz, sendo o pDNA linear o mais fortemente retido [52].

No entanto, a retenção de pDNA ocorre somente com elevadas concentrações de sal devido à sua hidrofobicidade baixa, o que constitui uma desvantagem. Também o uso de solventes

orgânicos, que são frequentemente tóxicos e voláteis, é problemático no que se refere à purificação em larga escala, exigindo medidas de segurança apropriadas [49, 52].

1.6.3.4- Cromatografia de troca aniônica

A cromatografia de troca aniônica permite a separação de moléculas com base na sua carga. Esta técnica explora a interação entre os grupos fosfato dos ácidos nucleicos carregados negativamente e os ligandos imobilizados na fase estacionária carregados positivamente. Um gradiente de sal é utilizado para deslocar os diferentes ácidos nucleicos que devem eluir em ordem crescente de densidade de carga, que varia em função da conformação e tamanho molecular [59]. A interação entre o pDNA e a fase estacionária é baseada na atração local gerada por cargas opostas. Logo, as isoformas terão diferentes tempos de retenção num gradiente crescente de sal, devido à diferença de densidade de cargas por área de superfície [49]. De modo geral, baixas concentrações de sal favorecem a ligação das biomoléculas e a eluição ocorre por aumento da força iônica, que desestabiliza as interações dos diferentes ácidos nucleicos [52].

A cromatografia de troca aniônica continua a ser uma técnica de cromatografia muito utilizada, pois oferece vantagens como separação rápida e simples, sem necessidade de solvente, higienização com hidróxido de sódio, separação da isoforma sc da isoforma oc do pDNA e remoção eficiente de impurezas de densidade de carga menor. No entanto esta técnica pode apresentar limitações, como uma resolução relativamente baixa entre o pDNA e endotoxinas e eluição do pDNA em elevadas concentrações de sal [51].

1.6.3.5- Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é um método de separação de biomoléculas com base em interações específicas entre a biomolécula alvo e o seu ligando específico, que é acoplado a uma matriz. Estas interações específicas resultam de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, forças de van der Waals e/ou ligação de hidrogênio. A escolha da matriz e das condições a serem utilizadas está dependente das propriedades moleculares das biomoléculas e da natureza físico-química e termodinâmica das suas interações moleculares. Assim, as etapas de eluição podem ser executadas especificamente, através de um ligando competitivo, ou não especificamente, alterando o pH, a força iônica ou a polaridade. Trata-se de um método único, na medida em que utiliza um agente de ligação específico para reconhecer ou purificar biomoléculas com base na sua função biológica ou estrutura química [56].

Os métodos de afinidade evidenciam vantagens como capacidade de eliminar etapas adicionais, aumentar o rendimento e seletividade e melhorar a economia do processo.

Contudo, há a evidenciar algumas limitações, particularmente no que diz respeito à origem biológica dos ligandos, que tendem a ser frágeis e com baixa capacidade de ligação. Estas limitações exigem novas abordagens que visem a projeção de ligandos mais adequados, isto é, que combinem a seletividade de ligandos naturais com a alta capacidade e durabilidade dos sistemas sintéticos. Ainda assim, a cromatografia de afinidade constitui uma técnica particularmente promissora porque combina a seletividade de uma interação biológica que ocorre naturalmente com a simplicidade de uma única molécula pequena usada como ligando [56].

1.6.3.6- Suportes Monolíticos

Os monolitos surgiram como uma excelente solução para a purificação de pDNA e foram extensivamente investigados e aprimorados por alguns grupos de pesquisa. Também designados como fases estacionárias contínuas, os monolitos são constituídos por uma estrutura contínua, única, composta por uma rede inter cruzada de canais, o que os torna altamente porosos. O tamanho do poro depende das condições de polimerização, sendo possível ajustar este parâmetro de acordo com a aplicação pretendida. O material monolítico pode ser polimerizado diretamente na coluna, formando uma rede tridimensional, o que aumenta a acessibilidade da molécula alvo a toda a estrutura monolítica. A tecnologia monolítica pode ser aplicada a quase todos os tipos de princípios cromatográficos através da utilização de ligandos específicos imobilizados em monolitos, como é o caso dos princípios hidrofóbicos e de afinidade [57]. Os canais interconectados permitem um aumento da permeabilidade, uma migração uniforme através do suporte e uma diminuição da pressão do sistema cromatográfico. Além disso, esta técnica permite que as moléculas passem unicamente por convecção, com uma elevada transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel [57].

Esta nova geração de colunas cromatográficas vem colmatar algumas das limitações associadas às colunas convencionais, como baixa difusividade, baixa transferência de massa, baixa capacidade de ligação para moléculas grandes e ensaios muito demorados. A excelente transferência de massa e as características associadas às colunas monolíticas permitem a ligação de grandes biomoléculas, como o pDNA, fazendo destes suportes uma ferramenta eficiente e rápida de purificação da isoforma sc do pDNA com elevado grau de pureza e produtividade [57].

1.7. DNA minicircular

Atualmente, diferentes classes de vetores estão disponíveis para promover a entrega e expressão de genes terapêuticos em células eucarióticas. Entre eles, temos o pDNA que

continua a ser uma biomolécula promissora para a transferência de genes, contemplada em vários estudos e ensaios clínicos. Contudo, devido aos seus níveis de expressão relativamente baixos e caráter transiente, diferentes estratégias têm sido abordadas para tentar superar essas limitações [50]. Os vetores de pDNA geralmente compreendem sequências bacterianas e motivos de CpG que desencadeiam respostas imunológicas adversas, originando problemas de biocompatibilidade [60]. Além disso, a presença de marcas de seleção pode conferir resistência a antibióticos, uma vez que pode ocorrer disseminação para a flora bacteriana humana [60]. Como tal, o foco de investigação neste campo tem sido no sentido de aumentar a eficiência da internalização do vetor de pDNA nas células alvo e respetivo núcleo, aumentar a expressão génica e projetar a resposta terapêutica desejada [61]. Neste contexto, surgiu recentemente uma tecnologia inovadora que se baseia em vetores de DNA minicircular (mcDNA).

O mcDNA é uma molécula de DNA circular de cadeia dupla que tem vindo a evidenciar-se e constitui, do ponto de vista atual, uma ferramenta eficiente, segura e sem efeitos citotóxicos, para desenvolver biofármacos inovadores. Trata-se de um vetor desprovido de sequências de origem bacteriana, devido à recombinação *in vivo* induzida durante o processo de produção, resultando assim na conversão do plasmídeo parental (PP) em mcDNA e mini-plasmídeo (mP). O mcDNA final adquire conseqüentemente um tamanho mais reduzido e apresenta uma expressão de genes persistente, pelo que evidencia uma eficácia terapêutica melhorada em comparação com o pDNA convencional [50].

1.7.1- Produção do DNA minicircular

Até ao momento, as tecnologias disponíveis para a produção de mcDNA baseiam-se em sistemas de recombinação *in vivo* que convertem o PP em moléculas circulares mais pequenas de DNA durante a fermentação bacteriana (figura 9), sendo a ParA resolvase e a recombinase Cre exemplos de alguns sistemas já utilizados [50].

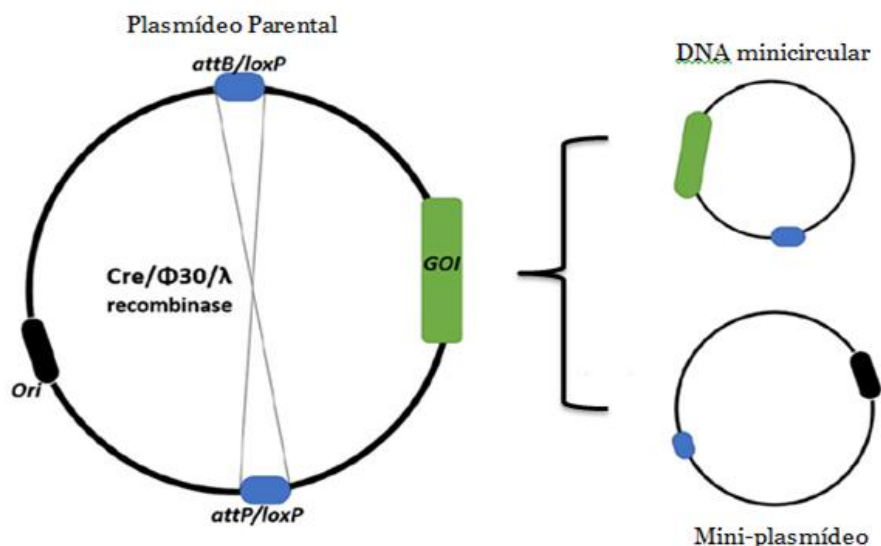


Figura 9: Representação da produção do mcDNA a partir do PP (Adaptado de [64]).

Num sistema mais aprimorado, os PP que codificam as informações do pDNA padrão são replicados e posteriormente convertidos em mcDNA e mP pela ação da recombinase $\Phi C31$ [60]. Os plasmídeos precursores do mcDNA são geralmente amplificados em bactérias gram-negativas de *E. coli* por exibirem alta densidade populacional e uma alta taxa de crescimento [50]. A estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T possui um sistema indutível através de L-arabinose que, na presença deste substrato, ativa a expressão simultânea da recombinase $\Phi C31$ e da endonuclease I-SceI [50].

Após a amplificação do PP, a fase de indução é estimulada pela adição de L-arabinose que promove a expressão do mecanismo celular responsável pela conversão de modelos de PP em mcDNA. Este período do bioprocessamento é crítico, uma vez que é significativamente influenciado pela concentração de L-arabinose e pela fase em que as culturas bacterianas são induzidas, isto é, o rendimento do mcDNA está dependente da fase em que é iniciada a indução. O rendimento mais elevado registra-se quando a indução é realizada no final da fase de crescimento bacteriano [50].

A enzima recombinase $\Phi C31$ realiza a conversão do PP em mP e em mcDNA, através do reconhecimento das sequências de recombinação attB e attP. O PP e o mP são degradados pela endonuclease I-SceI, que identifica o local de restrição 32x SceI dos dois vetores. No entanto, esta última fase do processo não é completamente eficaz pois o PP não é totalmente removido, sendo fundamental aplicar posteriormente uma etapa de purificação [62, 63].

1.7.2- Purificação do DNA minicircular

Diferentes estratégias cromatográficas implementadas para a purificação de mcDNA, tais como cromatografia de afinidade, tecnologia do DNA triplex, coluna monolítica de troca aniônica, cromatografia de interação hidrofóbica, entre outras, têm sido exploradas para a purificação de mcDNA [65]. No entanto, a maioria destas metodologias não apresenta excelentes performances na purificação do mcDNA, uma vez que evidenciam dificuldade em separar o mcDNA na isoforma sc das impurezas de PP e mP que são muito semelhantes em termos de tamanho e topologia molecular [66].

Embora alguns estudos tenham demonstrado bons resultados na purificação de mcDNA, a maioria exige a manipulação e inserção de sequências específicas no “backbone” do PP e não possuem seletividade suficiente para isolar a isoforma sc de outras isoformas de mcDNA, pois são projetadas para reconhecer os contaminantes ou para se ligar a sequências específicas compartilhadas por todas as isoformas de mcDNA. Assim sendo, é essencial o desenvolvimento de uma estratégia universal e eficaz para a purificação do mcDNA com vista à implementação terapêutica deste vetor. A utilização de uma estratégia cromatográfica única aplicada a vetores de mcDNA com diferentes “backbones” é de grande interesse, pois permitirá reduzir alguns dos custos do processo [65].

Uma das estratégias de purificação de mcDNA mais recentes baseia-se na utilização de uma coluna monolítica de troca aniônica (CIM® DEAE-1). Esta estratégia permite a purificação da isoforma sc do mcDNA, eliminando impurezas resultantes do processo de recombinação, nomeadamente o PP e o mP, bem como impurezas inerentes ao processo de produção em *E. coli*, como o RNA. As vantagens desta metodologia são a rapidez, a utilização de uma coluna comercial e o facto de não serem necessárias modificações iniciais do PP. Contudo, a recuperação da isoforma sc do mcDNA é inferior a 50%, uma vez que parte desta molécula co-elui com outras biomoléculas em diferentes picos cromatográficos, o que constitui uma desvantagem [67]. Na presença de outras moléculas com carga superficial semelhante, a seletividade destas matrizes cromatográficas pode diminuir significativamente [65].

A cromatografia de afinidade tem sido apontada como uma técnica eficaz na separação de biomoléculas devido à seletividade em relação à molécula alvo. Essa abordagem explora o reconhecimento específico da molécula alvo através de ligandos acoplados à matriz, com base na sua função biológica ou estrutura química. A utilização de aminoácidos ou derivados de aminoácidos como ligandos na cromatografia de afinidade tem sido extensivamente estudada pelo nosso grupo de investigação, devido à sua capacidade de promover um conjunto de interações com os ácidos nucleicos. A combinação de monolitos com ligandos à base de aminoácidos parece ser uma boa estratégia para a purificação de ácidos nucleicos.

Pela primeira vez, a lisina e o seu derivado descarboxilado, a cadaverina, foram utilizados como ligandos imobilizados em suportes monolíticos para a purificação da isoforma sc do mcDNA. No geral, o suporte modificado com cadaverina estabeleceu interações mais fortes com o mcDNA do que o monolito modificado com lisina, a pH ácido, e melhor seletividade, conseguindo o isolamento da isoforma sc de mcDNA da amostra de lisado bacteriano. Além disso, o nível de impurezas demonstrou atender às recomendações das agências reguladoras. Os resultados obtidos evidenciam o potencial do monolito modificado com cadaverina como uma estratégia cromatográfica viável e vantajosa para a purificação da isoforma sc de mcDNA, por se tratar de uma abordagem simples, prática e eficiente [65].

Outra estratégia de purificação de mcDNA envolve a técnica de cromatografia de exclusão molecular, utilizando a matriz *Sephacryl* S-1000 SF devido à sua ampla faixa de fracionamento favorável à separação de macromoléculas como o gDNA, PP e mcDNA. Os níveis de impurezas do mcDNA sc recuperado da matriz de *Sephacryl* foram analisados, tendo os resultados sugerido que a *Sephacryl* é capaz de recuperar uma amostra de mcDNA que cumpre os critérios estabelecidos pelas autoridades competentes, havendo, no entanto, a salientar que para obter este grau de pureza tão elevado, a recuperação foi levemente sacrificada para evitar a contaminação do mcDNA com outros ácidos nucleicos de alto peso molecular. Considerando o facto de que a maioria das proteínas e o RNA possuem tamanhos menores e que o gDNA é muito maior que as moléculas restantes, a eliminação dessas impurezas não é surpreendente. Como tal, a utilização da matriz de *Sephacryl* revelou-se uma estratégia adequada para isolar diferentes moléculas de mcDNA, sem recorrer ao uso de enzimas, exigindo apenas o ajuste das condições do ensaio de acordo com o tamanho do mcDNA [66].

1.8. Sistemas de entrega

O sucesso da terapia génica e das vacinas de DNA depende da forma como ocorre a entrega de material genético às células-alvo, sendo essencial que este não sofra qualquer forma de biodegradação. A sensibilidade do DNA à nuclease do meio biológico, o tamanho e a propriedade aniónica da macromolécula de DNA constituem barreiras a esse processo, que devem ser ultrapassadas de forma eficiente. Para tal, o DNA deve ser associado a um sistema ou vetor de entrega que o transporte para a célula alvo de forma eficiente, isto é, protegendo-o da degradação por nucleases e promovendo a sua internalização celular e nuclear de forma a que seja transcrito o gene terapêutico com eficiência [32]. Assim, as principais dificuldades a ultrapassar passam pela captação ineficiente do DNA transportado, pela libertação inadequada do DNA no interior da célula ou pelo direccionamento incorreto do DNA para o núcleo [68].

De modo a garantir a máxima eficiência, o sistema ou vetor de entrega deve preencher determinados requisitos, tais como: possuir uma dimensão que permita a passagem pela membrana celular e a entrada no núcleo, não estabelecer interações com células vasculares e endoteliais e ter a capacidade de evitar a captura por parte do sistema reticuloendotelial [32, 69]. Para facilitar a entrega do material genético terapêutico às células-alvo, são utilizados vetores virais e vetores não virais, sendo que ambos apresentam vantagens e desvantagens [70].

1.8.1- Vetores virais

Os vetores virais são produzidos a partir de vírus, que constituem, por si só, ferramentas atraentes para a transferência de genes terapêuticos devido à sua alta eficiência de evasão de uma grande variedade de células humanas [71]. Como vetores de entrega de DNA, devem ser manipulados geneticamente de forma a não constituírem riscos para a saúde dos pacientes, isto é, a parte patogênica do genoma viral é removida e alterada para receber o gene terapêutico, ao mesmo tempo que se retêm ou alteram as estruturas não patogênicas que permitem a infecção celular [32].

Apesar do vasto leque de possibilidades terapêuticas e vantagens dos vetores virais, estes apresentam algumas limitações ao nível da segurança e reprodutibilidade, nomeadamente respostas imunitárias severas, carcinogénese, tamanho da sequência de DNA limitado e a produção destes vetores em grandes quantidades é difícil e dispendiosa [72, 73].

Existem diversos tipos de vírus que podem ser utilizados como vetores, sendo os mais comuns os adenovírus, os retrovírus, os vírus adeno-associados, os lentivírus e os vírus derivados do herpes simplex. Cada vetor viral apresenta vantagens e limitações específicas, e a escolha do mesmo dependerá dos objetivos que se pretendem alcançar (tabela 1) [32].

Tabela 1: Vantagens e desvantagens dos vetores virais (Adaptado de [32, 74-76]).

	Material genético	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	dsDNA	Elevada eficiência de transfeção; Infeta vários tipos de células; Transfeção em células proliferativas e não proliferativas; Expressão prolongada.	Imunogenicidade elevada; manipulação complexa; Tamanho máximo do gene: 4-5 kb.
Retrovírus	RNA	Elevada eficiência de transfeção; expressão estável e prolongada; Tamanho máximo do gene: 9–12 kb; Reduzida imunogenicidade.	Infeta apenas células proliferativas; Possível mutagênese insercional; Dificuldade de produção.
Adeno-associados	ssDNA	Expressão prolongada; Infeta maioria das células; Reduzida imunogenicidade.	Possível mutagênese insercional; Dificuldade de produção; Tamanho máximo do gene: 5 kb.
Herpes simplex	dsDNA	Infeta vários tipos de células, incluindo as neuronais; Tamanho máximo do gene: 40-50 kb.	Expressão transiente; Imunogenicidade elevada.
Lentivírus	RNA	Transfeção em células proliferativas e não proliferativas; Expressão prolongada; Transfeção em células estaminais hematopoiéticas; Reduzida imunogenicidade.	Dificuldade de produção e armazenamento; Experiência clínica limitada; Tamanho máximo do gene: 8 kb; Possível mutagênese insercional; Procedimentos dispendiosos e elaborados.

1.8.2- Vetores não virais

Os vetores não virais são compostos por partículas biológicas produzidas sinteticamente, nas quais o DNA, contendo o gene terapêutico, é encapsulado ou ligado a um composto químico que, em seguida, é libertado nas células alvo no momento da entrega [72]. Além de DNA, os vetores não virais são capazes de transportar compostos sintéticos, como oligonucleótidos e RNA [71].

A eficiência de internalização celular e entrega do material genético destes sistemas é menor que a dos sistemas virais. Porém, estes sistemas são relativamente fáceis de produzir e o risco de complicações inflamatórias é menor. Acresce o facto de demonstrarem baixa imunogenicidade para as células hospedeiras e a dimensão do gene a utilizar ser praticamente ilimitada [32, 72]. Como limitações, os vetores não virais apresentam dificuldade em manter a sua integridade no meio extracelular, podendo sofrer degradação por ação de nucleases, e dificuldade em manter a expressão do gene terapêutico [71].

A entrega de DNA pode ser realizada através de métodos físicos, por ação de determinadas forças físicas que enfraquecem e tornam a membrana mais permeável, permitindo assim que o DNA chegue ao núcleo; e métodos químicos, em que o DNA é transportado através da membrana até ao núcleo por transportadores que sofrem vários tipos de reações químicas [32].

1.8.2.1- Métodos Físicos

O princípio dos sistemas físicos de entrega de genes é usar energia mecânica, ultrassónica, elétrica, hidrodinâmica ou a laser, a fim de criar pontos fracos temporários na membrana da célula alvo, causando lesões ou defeitos transitórios e permitindo que o DNA entre na célula por difusão [32].

Estes métodos pretendem direcionar ácidos nucleicos às células e constituem uma alternativa favorável, pois não recorrem a substâncias citotóxicas ou imunogénicas e não apresentam limitação no tamanho do ácido nucleico a ser transportado. As técnicas disponíveis incluem microinjeção, biobalística (tecnologia “*gene gun*”), irradiação a laser, eletroporação, sonoporação e magnetofecção (tabela 2) [74].

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos métodos físicos (Adaptado de [74,77,78]).

	Método	Vantagens	Desvantagens
Electroporação	A célula alvo é exposta ao campo elétrico, o que faz com que a membrana se torne altamente permeável.	Elevada capacidade de expressão génica; Seguro e reprodutível	Altamente dependente de impulsos elétricos; Procedimento cirúrgico difícil e invasivo; Estabilidade do DNA genómico pode ser afetada pela voltagem
Biobalística	A entrega do gene às células alvo é realizada utilizando metais pesados biocompatíveis, como portadores de partículas (ouro, tungsténio, prata).	Elevada capacidade de expressão génica; Expressão prolongada; Múltiplas aplicações; Comercialmente disponível.	Baixa eficiência; Danifica os tecidos em algumas aplicações.
Microinjeção	A membrana celular é penetrada por um processo mecânico simples, utilizando uma agulha de 0,5-5 µm de diâmetro.	Elevada eficiência de transfecção.	Procedimento extremamente demorado; Incapacidade de transfetar um grande número de células; Tecnicamente difícil.
Ultrassom (sonoporação)	Ondas de ultrassom de alta intensidade induzem poros na membrana celular.	Seguro, não invasivo; Sem necessidade de procedimento cirúrgico; Potencial para atravessar a barreira hematoencefálica.	Baixa eficiência <i>in vivo</i> .
Magnetofecção	Os campos magnéticos são usados para concentrar partículas contendo ácido nucleico nas células alvo.	Alta eficiência de transfecção; Capacidade de transfetar alvos celulares difíceis.	Risco potencial de partículas magnéticas afetarem a função da célula.

<p style="text-align: center;">Injeção Hidrodinâmica</p>	<p>Aplicação de uma pressão hidrodinâmica controlada em capilares para aumentar a internalização celular de ácidos nucleicos em circulação no sangue.</p>	<p>Procedimento simples; Possibilidade de readministração; Toxicidade reduzida; Elevada eficiência</p>	<p>Podem não ser seguras para o ser humano.</p>
---	---	--	---

1.8.2.2- Métodos Químicos

Ao contrário dos métodos físicos, que modificam as propriedades das membranas biológicas, os métodos químicos alteram as propriedades dos ácidos nucleicos de forma a facilitar a sua entrada nas células-alvo, nomeadamente mascarando a carga negativa do DNA, comprimindo a molécula de DNA para torná-la menor e protegendo-a da degradação por nucleases intracelulares [32]. As nanopartículas têm-se revelado eficientes como sistemas de entrega de uma enorme diversidade de moléculas terapêuticas devido ao seu tamanho reduzido, apresentando capacidade de internalizarem nas células eucarióticas [79, 80]. Vários materiais de fontes inorgânicas e orgânicas têm sido investigados para a formulação de nanopartículas.

As nanopartículas inorgânicas têm assumido algum destaque em virtude da sua ampla disponibilidade, facilidade de funcionalização, biocompatibilidade e potencial para entrega específica nas células alvo. Além disso, têm toxicidade reduzida e podem ser facilmente sintetizadas com tamanhos, formas e proporções ajustáveis. Os materiais mais comuns para formulações de nanopartículas inorgânicas incluem nanotubos de carbono, *quantum dots*, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílica e nanoestruturas de metais, como, por exemplo, ouro e prata [81]. As nanopartículas à base de ouro (Au) constituem um material versátil, de fácil fabricação e com boa biocompatibilidade. No entanto, apresentam alguma toxicidade, o que requer a sua funcionalização [82]. As nanopartículas de sílica, nomeadamente aquelas com uma estrutura mesoporosa, têm sido especialmente destacadas devido à capacidade de atravessar a membrana celular e à elevada eficácia na incorporação de diversos agentes terapêuticos que serão entregues controladamente no local alvo durante um período de tempo [83]. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, têm a capacidade de gerar calor em resposta a um campo magnético, permitindo a sua aplicação na hipertermia magnética. Estes nanomateriais podem ser aplicados como sistemas de entrega de fármacos, genes e radionucléotidos, como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética e em tecnologias baseadas na separação magnética de DNA/RNA, proteínas, bactérias, vírus e outras biomoléculas. Como vantagem

complementar, as nanopartículas apresentam a possibilidade de modificação dos grupos funcionais da sua superfície, de forma a atribuir-lhes outras características desejáveis [84].

No que se refere às nanopartículas orgânicas, estas são classificadas em duas grandes classes: nanopartículas baseadas em lípidos e em polímeros catiónicos [80]. As nanopartículas poliméricas estão entre os materiais mais amplamente investigados para entrega de ácidos nucleicos devido à sua segurança, versatilidade e capacidade de melhorar as respostas imunes [85]. Os polímeros podem ser divididos segundo vários critérios, sendo que o principal deles é: polímeros naturais e polímeros sintéticos. Em comparação com os polímeros catiónicos naturais, os polímeros catiónicos sintéticos apresentam maior facilidade de modificação química e tornam mais fácil a manipulação das propriedades na superfície da partícula do polímero. Entre os polímeros sintéticos mais comuns, estão incluídos a polietilenimina (PEI), Poli (L-lisina) (PLL), ácido poliacrílico (PAA), poli (éster alifático) (PAE) e poli (N, N-dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) [86]. A polietilenimina (PEI) é um dos polímeros mais promissores e mais usados no desenvolvimento de vários vetores, uma vez que pode ser sintetizada em diferentes comprimentos, ser ramificada ou linear e pode ser funcionalizada para uma melhor compatibilidade. Tem apresentado bons resultados quando se trata de eficiência da transfecção, condensando eficientemente o DNA e levando à formação de poliplexos esféricos homogêneos [87, 88]. A sua elevada capacidade de tamponamento constitui uma importante vantagem durante a fuga endossomal [89].

As micelas poliméricas e os dendrímeros surgem igualmente como estruturas muito promissoras. As micelas permitem a entrega direcionada de fármacos e geralmente desintegram-se rapidamente no organismo. Apesar da capacidade de transportar drogas e genes, os sistemas micelares não exibem estabilidade termodinâmica e cinética suficiente para impedir a entrega prematura de fármacos quando administrados na corrente sanguínea [90]. Os dendrímeros são polímeros 3D altamente ramificados, capazes de penetrar nas membranas celulares e endossômicas [91]. Estes podem incorporar pequenas moléculas por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, e os fármacos podem ser ligados covalentemente à sua superfície [90].

As nanopartículas de base lipídica são outra classe proeminente de material usado como vetores não virais, geralmente formadas como lipossomas ou micelas lipídicas. Os lipossomas são nanopartículas catiónicas que consistem em fosfolípidos e colesterol capazes de se ligar e encapsular o DNA. A sua elevada eficiência de transfecção é geralmente atribuída à compatibilidade do material com as bicamadas lipídicas que compõem a membrana celular, facilitando a entrada celular. No entanto, existem vários desafios a ultrapassar como

toxicidade, imunogenicidade inespecífica, instabilidade estrutural e rápida depuração sistêmica [85].

Embora os sistemas de entrega de genes não virais exibam várias vantagens, a sua utilização na prática clínica é ainda limitada devido à fraca capacidade de ultrapassar a membrana do endossoma e de translocar DNA para o núcleo. Na maioria dos casos, os genes carregados negativamente não têm a capacidade de penetrar a membrana celular e de se introduzirem eficazmente no núcleo. Durante os últimos anos, vários sistemas de entrega de genes baseados em péptidos foram propostos a fim de superar as limitações extracelulares e intracelulares [92]. Os péptidos com sequências curtas de aminoácidos são facilmente produzidos e caracterizados, para além de não serem geralmente imunogênicos ou tóxicos.

A sua capacidade de condensação de DNA, translocação de membrana e ruptura do endossoma tornam-nos ferramentas versáteis para a entrega de ácidos nucleicos nas células [93]. Contudo, a baixa eficiência demonstrada pelos péptidos como método de transferência génica tem levado à sua combinação com outros métodos tais como formulações polímero-péptido, que têm demonstrado eficácia [94].

Recentemente, as vantagens de cada um destes sistemas têm sido conjugadas em nanopartículas híbridas (tabela 3) [78]. As nanopartículas híbridas são compostas por componentes inorgânicos e orgânicos, que têm a capacidade de reter as vantagens de ambos os materiais, ajustando as suas propriedades através de uma combinação criteriosa de componentes funcionais [95]. As nanopartículas híbridas lípido-polímero são constituídas por um núcleo polimérico hidrofóbico, uma camada lipídica em torno do núcleo polimérico e uma camada de polímero hidrofílico fora da camada lipídica [96].

Tabela 3: Vantagens e desvantagens dos métodos químicos (Adaptado de [78, 97]).

	Características	Vantagens	Desvantagens
Lípidos catiónicos	Ácidos nucleicos incorporados em lípidos.	Seguro; Reduzida citotoxicidade; elevada eficiência <i>in vitro</i>	Dispendioso; respostas imunológicas agudas.
Polímeros catiónicos	Ácidos nucleicos aniônicos incorporados num complexo, denominado políplexo, mediante interações eletrostáticas	Elevada eficiência <i>in vitro</i> ; Baixo custo; Fácil de manipular.	Toxicidade; respostas imunológicas agudas.
Híbridos (Lípidos-polímeros)	Combinação de lípidos e polímeros catiónicos	Elevada eficiência <i>in vitro</i> ; reduzida citotoxicidade; Fácil de manipular.	Baixa eficiência <i>in vivo</i> ; Dispendioso.

1.9. Péptidos de penetração celular

Entre os métodos de entrega não viral, os péptidos de penetração celular (CPPs) têm recebido particular atenção devido à sua capacidade de entrar nas células de maneira não invasiva, mantendo a integridade das membranas celulares, e são considerados altamente eficientes e seguros [81]. Os CPPs são péptidos relativamente curtos, de 5 a 30 aminoácidos, caracterizados por um elevado conteúdo de aminoácidos básicos e uma carga positiva geral. Apresentam características como solubilidade em água, capacidade de atravessar membranas de diferentes tipos de células, baixa citotoxicidade e nenhuma restrição relativamente ao tamanho e tipo de substância ou nanopartícula a ser veiculada [98].

De acordo com as suas propriedades físico-químicas e constituição em termos de aminoácidos, podem ser classificados como péptidos catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos [98]. Os CPPs catiónicos geralmente contêm um grande número de resíduos de aminoácidos com carga positiva (arginina, lisina e histidina), tais como os péptidos RALA (7 argininas) e o R8 (8 argininas), por exemplo [99]. Os anfipáticos, como o MPG (27

resíduos: sequência GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV) e Pep-1(21 resíduos: sequência KETWWETWWTEWSQPKKKRKV), possuem uma parte hidrofílica, que interage com os grupos fosfato, e uma parte hidrofóbica que participa na interação com a zona hidrofóbica da membrana fosfolipídica [100]. Os CPPs hidrofóbicos demonstram grande afinidade com os domínios hidrofóbicos das membranas celulares, sendo cruciais para o processo de internalização celular. Até ao momento, apenas um número limitado de péptidos hidrofóbicos foi descoberto, tendo os seus mecanismos de internalização sido pouco estudados em comparação com as classes catiónicas e anfipáticas. Os péptidos C105Y e Pep-7 são exemplos de CPPs hidrofóbicos [101].

Ainda que as propriedades de entrega dos CPPs não sejam questionáveis, o mecanismo de captação celular e escape endossómico ainda é controverso [98]. As propriedades intrínsecas dos péptidos, como distribuição e comprimento de carga, permitem interagir com inúmeras moléculas da superfície celular, o que pode influenciar a escolha do mecanismo de acesso ao interior da célula [81]. Em termos gerais, acredita-se que os CPPs tenham acesso ao interior da célula por endocitose ou por penetração direta [98].

1.9.1- R8 (Octa-arginina)

O péptido R8 (sequência RRRRRRRR) é um CPP catiónico de 8 argininas, com carga positiva, conhecido por facilitar a interação e o acesso ao interior das células (figura 10) [102].

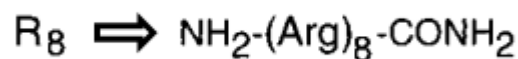


Figura 10: Estrutura do péptido R8 (Adaptado de [103]).

Vários estudos têm sido realizados a fim de investigar o papel das argininas na entrega de material genético às células. A eficiência de translocação e localização celular de vários péptidos de arginina com vários comprimentos de cadeia foi analisada, tendo o R8 (octâmero) apresentado alta eficiência de internalização e localização no núcleo [104, 105]. Relativamente ao mecanismo de captação dominante, este dá-se por penetração direta da membrana, em oposição à endocitose mediada por recetores [106]. No entanto, novos estudos em células vivas mostraram que a captação de péptidos ricos em arginina pode ser realizada por combinação de penetração direta e endocitose [81].

Vários péptidos ricos em arginina têm sido utilizados com sucesso na entrega de proteínas, oligonucleótidos, DNA plasmídico e até esferas e lipossomas [107]. Estes resultados sugerem a existência de mecanismos de entrega comuns entre os péptidos ricos em

arginina, havendo, no entanto, a destacar o péptido R8 que apresentou resultados bastante satisfatórios ao nível da entrega intracelular, através da membrana celular, e da promoção da localização nuclear para transcrição [105, 108].

1.10. Veículos de entrega funcionalizados

O princípio básico de uma entrega direcionada é que esta seja administrada apenas nas células alvo e não nos tecidos circundantes. O direcionamento para uma área de interesse dentro do corpo aumenta a eficácia terapêutica e reduz a toxicidade, pelo que as nanopartículas devem ser facilmente reconhecidas pelas células alvo (figura 11).

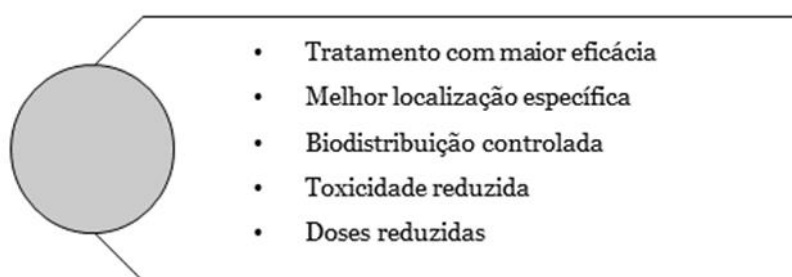


Figura 11: Vantagens dos sistemas de entrega direcionada (Adaptado de [109]).

Duas estratégias são amplamente usadas para direcionar o vetor ao tecido desejado: direcionamento passivo e direcionamento ativo. A estratégia de direcionamento passivo baseia-se na acumulação preferencial de fármacos em células tumorais, conseguida através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). O direcionamento ativo envolve a funcionalização do sistema de entrega com ligandos direcionados a recetores específicos, o que permitirá a entrega a células específicas, que no caso das vacinas de DNA, são as células apresentadoras de antígenos [109].

Com os avanços na identificação dos recetores específicos para os diferentes subconjuntos de APCs - macrófagos, células B e DCs, uma grande variedade de ligandos tem sido explorada para criar veículos de entrega funcionalizados, sendo os recetores de manose, DC205, recetores Fc (I, II e III), integrinas CD11c – CD18 e moléculas de MHC classe II, os mais utilizados para o direcionamento específico de APCs, que são cruciais para iniciar uma resposta imune protetora contra patógenos [110].

O direcionamento específico para recetores de manose, altamente expressos em células do sistema imunológico, macrófagos e células dendríticas, é visto como uma boa estratégia para melhorar a eficácia de vacinas. Com a identificação da expressão do recetor de manose nas DCs, as APCs mais importantes, a manoseilação tem sido aplicada com sucesso na vacinação [94]. A especificidade da manose é determinada pela sequência de aminoácidos

que compõe os domínios de reconhecimento de carboidratos (DRC). Além disso, a sua conformação tridimensional e o padrão de multimerização de cada recetor de manose determinam a sua capacidade de ser conjugada com proteínas ou péptidos e de induzir respostas imunes significativas [111].

Alguns estudos têm mostrado bons resultados com outros recetores de lectina do tipo C (CLRs), como a langerina e o DC-SIGN que, tal como os recetores de manose, também reconhecem carboidratos em patogénios que medeiam a endocitose, ativando assim a resposta imune adaptativa contra patogénios e, portanto, podem funcionar como adjuvantes de vacinas [112-114].

Os recentes avanços na área da Biotecnologia têm permitido o desenvolvimento de vacinas que exibem um perfil de segurança aprimorado. As vacinas são constituídas por alvos específicos, os antigénios, que irão induzir a resposta mediada por linfócitos e, se necessário, por componentes adicionais, que são designados por adjuvantes. A baixa imunogenicidade dos antigénios requer o uso de adjuvantes para estimular a imunidade inata e, por sua vez, gerar uma resposta imune adaptativa robusta. Os adjuvantes potenciam e determinam o tipo de resposta, privilegiando um carácter mais humoral (anticorpos) ou mais celular. Muitas vezes, os adjuvantes mimetizam os padrões moleculares associados a microrganismos patogénicos, ativando a imunidade inata, que é essencial para uma boa resposta específica ou adquirida. A funcionalização da superfície das nanopartículas pode ser uma estratégia eficaz, uma vez que melhora a internalização celular e a ativação de DCs e aumenta as propriedades de mimetização de patogénios [115].

Capítulo 2 – Objetivos

Sendo o cancro do colo do útero uma das principais causas de morte a nível mundial, torna-se premente encontrar estratégias terapêuticas que combatam a doença. As vacinas de DNA têm revelado resultados promissores para o tratamento deste tipo de cancro.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de novos sistemas binários e ternários, baseados no polímero PEI, no R8 e em ligandos de manose, para entrega direcionada de uma vacina de mcDNA às APCs. Os sistemas foram formulados considerando vários rácios N/P e as suas propriedades estruturais, físico-químicas (morfologia, tamanho, carga superficial e capacidade de encapsulação) e de estabilidade foram estudadas, a fim de identificar o sistema de entrega mais eficiente. Para avaliar a captação e internalização celular bem como a eficiência de transfeção destes sistemas, foram realizados ensaios de transfeção *in vitro* com diferentes linhas celulares. A utilização da manose está relacionada com a sua capacidade de melhorar a internalização do sistema por meio do reconhecimento de recetores de manose, altamente expressos em células do sistema imunológico. No caso do péptido R8, a sua presença nos sistemas formulados ficou a dever-se ao seu potencial em termos de captação pela membrana celular e especificidade de localização no interior do núcleo.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1. Produção

3.1.1. Condições de crescimento bacteriano

Para erradicar o potencial oncogénico do gene E7 do HPV, este foi modificado para incluir três mutações pontuais que impedem a interação com pRB, mas que mantêm a sua estrutura. O plasmídeo parental (PP) pMC.CMV-MCS-EF1-GFP-SV40PolyA foi previamente clonado com o gene E7 mutado (E7mut) e posteriormente amplificado na estirpe *E. coli* ZYCY10P3S2T. A *E. coli* transformada com o PP-E7mut foi inoculada em placas de LB-agar contendo canamicina (50 µg/mL) e deixada “overnight” a 37 °C. Após o crescimento em meio sólido, as colónias foram inoculadas para um Erlenmeyer correspondente à pré-fermentação (V= 62,5 mL). Foi utilizado o meio *Terrific Broth* (TB), constituído por 20 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017 M KH₂PO₄ e 0,072 M K₂HPO₄, suplementado com canamicina (50 µg/mL). O crescimento bacteriano deu-se a 42 °C e sob agitação de 250 rpm num agitador orbital, até atingir uma densidade ótica (DO) de aproximadamente 2,6. Procedeu-se em seguida ao cálculo da quantidade de cultura bacteriana necessária a transferir para a fermentação (v = 250 mL) de forma a que esta inicie com uma DO de 0,2. O crescimento bacteriano foi novamente promovido a 42 °C com agitação a 250 rpm, até atingir uma DO entre 4 e 5. Quando se atingiu a DO pretendida, o meio de fermentação foi dividido para dois Erlenmeyers de 1 L de capacidade, contendo já a mistura de indução (v = 125 mL), constituída por 25 g/L de meio LB com 0,01% de L-arabinose estéril e 0,04 M de NaOH, para induzir a produção de mcDNA-E7mutado. O processo de indução foi realizado durante 2 h a 32 °C e sob agitação de 250 rpm. No final, as células foram recuperadas através de centrifugação a 4500 rpm durante 10 min a 4 °C, sendo os *pellets* bacterianos armazenados a -20 °C.

3.2. Extração e purificação do mcDNA-E7mutado

3.2.1. Lise alcalina modificada

Após o descongelamento do *pellet* bacteriano resultante da fermentação de 250 mL, foram adicionados 20 mL de solução A (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA com pH 8,0), agitando-se vigorosamente no vórtex. O conteúdo foi dividido por dois tubos de lise, adicionando-se, em seguida, 10 ml da solução B (200 mM NaOH, 1% de SDS (m/v)) a cada tubo, homogeneizando cuidadosamente e incubando durante 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 10 mL de solução C (3 M de acetato de potássio, pH 5,0) a cada tubo e após homogeneização cuidadosa incubou-se durante 20 min no gelo. Foram

realizadas duas centrifugações durante 30 min a 20000 *g* e a 4 °C para eliminar detritos celulares, DNA genómico e proteínas. Após a centrifugação, descartou-se o *pellet* e mediuse o volume de sobrenadante para posterior adição de 0,7 volumes de isopropanol, homogeneizando cuidadosamente e incubando durante 30 min no gelo para precipitar os ácidos nucleicos. De seguida, foi realizada uma centrifugação durante 30 min a 16000 *g* e a 4 °C. Depois de descartar o sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de 10 mM Tris-HCl (pH 8,0). Foi adicionado sulfato de amónio para uma concentração final de 3 M (para 2 mL adicionar 0,793g). Por último, foi realizada uma outra centrifugação durante 20 min a 16000 *g* e a 4 °C, com o objetivo de precipitar proteínas e RNA, recuperando-se o sobrenadante. As amostras finais foram armazenadas a -80 °C, para posterior utilização na cromatografia de exclusão molecular.

3.2.2- Purificação do mcDNA-E7mutado através de cromatografia de filtração em gel ou exclusão molecular

Após a extração, procedeu-se a uma purificação de mcDNA-E7mut no equipamento ÄKTA Pure, com o intuito de promover a eliminação do PP-E7mut e RNA. Foi utilizada uma coluna de filtração em gel *Sephacryl S-1000 SF* (GE Healthcare Biosciences, Suécia), com volume de 106 mL, equilibrada com 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, a pH 7,0. Foram injetados 2 mL de amostra proveniente da extração e foram recolhidas frações de 3 mL correspondentes ao pico de mcDNA. O ensaio foi realizado com um caudal de 0,3 mL/min, à temperatura ambiente, monitorizando-se a absorvância a 260 nm ao longo do tempo. Todas as frações recolhidas foram posteriormente dessalinizadas e concentradas para 200 µL em concentradores Vivaspin®.

3.2.3. Eletroforese em gel de agarose

As frações cromatográficas recolhidas, depois de dessalinizadas e concentradas, foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v). O gel usado foi preparado para 50 mL de tampão TAE 1x (40 mM de base Tris, 20 mM de ácido acético e 1 mM de EDTA a pH 8,0), 0,4 g de agarose e corado com 0,6 µL de GreenSafe. A eletroforese foi realizada durante 40 min a 120 Volts e o gel analisado recorrendo à luz ultravioleta (UV), com utilização do sistema Uvitec Fire-Reader (UVITEC, Reino Unido).

3.3. Síntese de nanopartículas

O R8-manose, sintetizado e caracterizado pela professora Swati Biswas (Department of Pharmacy, Nanomedicine Research Laboratory, Birla Institute of Technology & Science-Pilani) numa colaboração estabelecida com o nosso grupo de investigação, foi fornecido como um pó liofilizado dessalinizado, tendo a sua reconstituição sido realizada com água

ultrapura para uma concentração stock de 0,5 mg/mL. O polímero PEI foi dissolvido em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5).

Foram preparados dois sistemas, o sistema binário R8-manose/mcDNA-E7mut e o sistema ternário R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut. A formulação das nanopartículas de R8-manose/mcDNA-E7mut consistiu na adição de um volume apropriado e calculado de solução de péptido (50 µL), gota a gota, com agitação constante no vórtex, durante 1 min, a uma quantidade fixa de mcDNA de 1 µg (200 µL). Após a adição do R8 ao mcDNA, deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 30 min para permitir a formação dos complexos. De seguida, os sistemas foram centrifugados a 10000 rpm, durante 20 min e a 4 °C.

No caso das nanopartículas de R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut, diferentes concentrações do polímero PEI foram adicionadas, gota a gota, a um volume fixo de mcDNA, formando o sistema PEI/mcDNA-E7mut. O sistema ternário foi posteriormente obtido pela adição de concentrações variáveis de R8-manose às nanopartículas de PEI/mcDNA-E7mut. De igual forma, deixou-se equilibrar à temperatura ambiente durante 30 min para permitir a formação dos complexos. De seguida, os sistemas foram centrifugados a 10000 rpm, durante 20 min e a 4 °C.

Os dois sistemas foram preparados a vários rácios N/P, tendo em conta a concentração molar de cargas positivas provenientes dos grupos amina do R8 e de PEI (N) e a concentração molar das cargas negativas presentes nos grupos fosfato do DNA (P).

3.4. Determinação da eficiência de encapsulação

Após a centrifugação dos sistemas a 10.000 rpm durante 20 min e a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido para posterior análise da eficiência de encapsulação através de análise de mobilidade eletroforética num gel de agarose.

3.5. Morfologia das nanopartículas

A morfologia dos sistemas formulados foi avaliada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Os sistemas preparados foram centrifugados e o *pellet* contendo as nanopartículas recuperado. As nanopartículas foram lavadas quatro vezes com 200 µL de água Milli Q e entre cada lavagem foi feita uma centrifugação a 9500 rpm durante 12 min. Em seguida, o *pellet* de nanopartículas foi ressuscitado em 40 µL de tungsténio 2% e uma diluição de 1:20 da amostra foi realizada em água Milli Q. Após esta diluição, foram pipetados 10 µL numa lamela redonda, deixando-se secar “*overnight*” à temperatura ambiente. No dia seguinte, as amostras foram revestidas com ouro usando o aparelho Emitech K550 sputter coater (London, England).

3.6. Tamanho e potencial zeta das nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas e as cargas de superfície (potencial zeta) foram determinados a 25 °C usando o aparelho Zetasizer nano ZS. Após a centrifugação dos sistemas formulados, o sobrenadante resultante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 600 µL de água Milli Q. Para a avaliação do tamanho e da carga superficial das nanopartículas foram realizadas as técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) com o laser He-Ne a 633 nm com *ótica não-invasiva de retroespalhamento* (NIBS) e de espalhamento de luz eletroforético utilizando um laser denominado de M3-PALS (Phase analysis Light Scattering), respectivamente. Os valores médios dos tamanhos e potenciais à superfície foram obtidos através de 3 medições ± desvio padrão. No caso do potencial zeta, este foi determinado em glucose a 5 % com 1 mM de NaCl.

3.7. FTIR

A avaliação da presença de R8-manose foi determinada por espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR). O *pellet* resultante de vários ensaios foi ressuspensionado em 10 µL de água Milli Q para análise posterior. Os espectros foram adquiridos usando o espectrofotômetro Nicolet iS10 FTIR (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), operado no modo ATR (*Smart iTR diamond ATR*), em 120 *scans* com uma largura espectral entre os 4000 e os 600 cm⁻¹ e uma resolução espectral de 32 cm⁻¹.

3.8. Estudos de estabilidade

Os sistemas R8-manose/mcDNA-E7mut e R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut foram preparados e o *pellet* foi ressuspensionado em 25 µL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37 °C durante 0, 1, 4 e 6h. Os mesmos sistemas foram igualmente ressuspensionados em 25 µL de tripsina e incubados a 37 °C durante 0, 1, 4 e 6h. As amostras dos ensaios acima referidos foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1% durante 40 min, a 120 Volts. Para servir de controle foi usada uma amostra de mcDNA-E7mut não encapsulado.

3.9. Linhas celulares e condições de cultura

Neste estudo foram utilizadas linhas celulares da ATCC, as células de macrófagos murinos, Raw 264.7, e os fibroblastos humanos (FibH). As células Raw 264.7 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium with High Glucose* (DMEM-HG) e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) não inativado, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e 1% (v/v) de uma mistura de antibióticos constituída por penicilina

(100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os fibroblastos humanos foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium with Ham's F-12 Nutrient Mixture* (DMEM/F-12) e suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 2,438 g/L de bicarbonato de sódio e 1% (v/v) de uma mistura de antibióticos constituída por penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). O crescimento das células foi promovido a uma temperatura de 37 °C, em atmosfera húmida contendo 5% de CO₂.

3.10. Viabilidade Celular

A biocompatibilidade dos sistemas foi avaliada através do ensaio com a resazurina. Foram utilizadas as células Raw 264.7 e os fibroblastos humanos, semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de 0.8×10^4 por poço e 1×10^4 por poço, respetivamente. Para facilitar a transfeção, mudou-se o meio para meio simples no dia seguinte, pelo menos 12h antes da transfeção. As células Raw 264.7 foram transfetadas adicionando 0,24 µg de mcDNA, encapsulado nos diferentes sistemas, a cada poço. Para os fibroblastos, foram adicionadas a cada poço 0,3 µg de mcDNA, encapsulado nos diferentes sistemas, tendo a transfeção terminado após 6h trocando o meio simples para meio completo. O meio de cultura foi descartado após 24h e 48h de incubação, sendo adicionados a cada poço 100 µL de meio completo fresco e 20 µL de resazurina 0,1% e incubados durante quatro horas no escuro, a 37 °C, em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Após a incubação, a fluorescência resultante da reação com resazurina foi medida utilizando um espectrofluorómetro (SpectraMAX® Gemini™ EM Molecular Devices, Estados Unidos da América) a um comprimento de onda de excitação de 544 nm e a um comprimento de onda de emissão de 590 nm, para analisar a fluorescência da resorufina produzida.

3.11. Estudos de transfeção *in vitro*

3.11.1. Marcação do plasmídeo com FITC

O mcDNA foi marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), por adição de 16,3 µL de mcDNA, 66,7 µL de *labeling buffer* e 2 µL de FITC ($V_f = 85 \mu\text{L}$). As amostras foram colocadas sob agitação constante durante 4 h à temperatura ambiente e protegidas da luz, tendo-se adicionado posteriormente 1 volume de 3 M de NaCl (85 µL) e 2,5 volumes de etanol 100% (212,5 µL). As amostras com o mcDNA marcado foram incubadas a -20 °C durante a noite. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, durante 30 min a 12000 g, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com etanol 75%. Este procedimento foi repetido várias vezes até o sobrenadante deixar de apresentar coloração

laranja. Após a sua lavagem, o *pellet* foi ressuspendido em 200 µL de água Milli Q para posterior formulação das nanopartículas.

3.11.2. Live cell imaging

Para realizar a experiência de *Live cell imaging*, as células Raw 264.7 foram semeadas com uma densidade de 3×10^4 células por poço em placas “µ-Slide 8 Well” (Ibidi, Martinsried, Alemanha) e cultivadas em 250 µL de meio completo a 37 °C numa atmosfera húmida com 5% de CO₂. Para facilitar a transfeção, mudou-se o meio para meio simples no dia seguinte, pelo menos 12h antes da transfeção. As células foram transfetadas adicionando 0,9 µg de mcDNA, encapsulado nos diferentes sistemas, a cada poço, depois de adquiridas as imagens só com a marcação do núcleo com DAPI (controlo). O mcDNA marcado com FITC foi encapsulado com o sistema PEI/mcDNA-E7mut e com o sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut e a internalização celular foi visualizada utilizando o microscópio confocal de varredura a laser LSM710 (Carl Zeiss, Alemanha), sob uma ampliação de 63x. Todas as imagens foram adquiridas utilizando ao mesmo tempo os lasers correspondentes ao DAPI e FITC e as células mantidas a 37 °C com 5% de CO₂.

3.12. Transcrição do gene

3.12.1. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada tanto para os fibroblastos como para as células Raw 264.7. Os fibroblastos foram semeados com uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço numa placa de 12 poços, enquanto as células Raw foram semeadas com uma densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço numa placa de 12 poços. Os fibroblastos foram transfetados adicionando 7,5 µg de mcDNA, encapsulado nos diferentes sistemas, a cada poço. Para as células Raw 264.7, foram adicionadas a cada poço 6 µg de mcDNA encapsulado nos diferentes sistemas, tendo a transfeção terminada após 6h trocando o meio simples para meio completo. Após 24 horas de transfeção, o meio foi removido e as células foram lavadas 3 vezes com PBS. Para promover a lise das células, adicionou-se 250 µL do reagente TripleXtractor, incubando-se durante 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de clorofórmio e agitou-se vigorosamente para permitir a separação de diferentes biomoléculas em diferentes fases, incubando-se 10 min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000 *g* durante 15 min a 4 °C, para se obter a separação de uma fase aquosa superior que contém o RNA, de uma fase intermediária e da fase orgânica inferior que contém DNA e proteínas. A fase aquosa foi recuperada cuidadosamente e 125 µL de isopropanol gelado foram adicionados para permitir a

precipitação do RNA, incubando-se durante 10 min no gelo. As amostras foram centrifugadas novamente a 12000 *g* por 15 min a 4 °C, e o *pellet* foi lavado com 125 µL de etanol 75% em água dietil-pirocarbonato (DEPC) para eliminar os compostos orgânicos. Uma nova centrifugação foi realizada a 12000 *g* por 5 min a 4 °C e o *pellet* de RNA foi ressuspenso em 20 µL de DEPC. Para confirmar o sucesso da extração de RNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação das amostras foi realizada num nano-espectrofotômetro (Implen GmbH, Alemanha).

3.12.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit Xpert cDNA Synthesis (GRiSP - Research Solutions, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. Em cada tubo de PCR foi adicionado 1 µg de RNA total, 1 µL de *Random Primers* e 1 µL de dNTP's e *RNase free water* até perfazer um volume final de 14,5 µL. As amostras foram incubadas a 65 °C durante 5 min, seguindo-se uma incubação no gelo durante 2 min. Posteriormente, adicionou-se 4 µL de *buffer*, 0,5 µL de *RNase Inhibitor* e 1 µL de *Xpert RTase*. Homogeneizou-se suavemente e realizou-se um mini-spin. Por último, utilizando o Termociclador, a mistura reacional foi incubada a 25 °C durante 10 min, seguindo-se uma incubação a 50 °C durante 50 min e, por último, uma incubação a 85 °C durante 5 min.

3.12.3. RT-PCR

A técnica de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) foi utilizada para analisar os transcritos de E7. A cada reação de PCR adicionou-se 8,25 µL de H₂O estéril, 0,40 µL de *primer forward* (5'-AAT CTA GAA TGC CTG ATA CAC CTA C -3') e *primer reverse* (5' -ATG GAT CCT TAT GGT TTC TGA GAA CAG A -3 '), 0,7 µL de MgCl₂, 0,25 µL de dNTP's, 1,25 µL de tampão de PCR, 0,25 µL de GRS Taq e 1 µL de cDNA. As amostras foram homogeneizadas e um mini-spin foi realizado. As amostras foram então colocadas num termociclador T100™ (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, Califórnia, EUA), programado da seguinte forma: 95 °C por 5 min, 26 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C e 1 min a 72 °C e finalmente 10 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.12.4. RT-qPCR

Para analisar quantitativamente os níveis de transcritos, foi realizada a técnica de *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR). A mistura para uma reação com primers projetados para a transcrição do gene E7mut foi preparada

com 10 µL de NZY qPCR Green Master Mix (2x), 0,64 µL de *primer forward*, 0,64 µL de *primer reverse*, 7,72 µL de H₂O estéril e 1 µL de cDNA, resultando num volume de 20 µL por reação. A mistura para uma reação com o par de primers do transcrito do gene *housekeeping* GAPDH (FW: 5'- ATG GGG AAG GTG AAG GTC G -3 ' ; RV: 5'- GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A -3 ') foi preparada com 10 µL de NZY qPCR Green Master Mix (2x), 1,2 µL de *primer forward*, 1,2 µL de *primer reverse*, 7,5 µL de H₂O estéril e 1 µL de cDNA, resultando num volume de 20 µL. As misturas reacionais foram colocadas num sistema de Real-Time CFX Connect™ (BioRad, Estados Unidos da América), programado com a seguinte sequência: 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 30 seg a 60 °C. A análise estatística dos resultados foi realizada com o ensaio *Ordinary one-way ANOVA* no software *GraphPad Prism* (versão 6.01).

3.12.4.1. Eficiência de primers

Para estudar a eficiência dos *primers* de GAPDH e E7mutado foi utilizada uma linearidade de 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10 000. A amostra inicial correspondeu a uma amostra de células 24h após serem transfetadas com o sistema R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut. As amostras foram colocadas num sistema de Real-Time CFX Connect™ (BioRad, Estados Unidos da América) e os resultados foram analisados na folha de cálculo Excel.

A eficiência de *primers* foi previamente realizada para assegurar que as avaliações posteriores dos respetivos transcritos serão realizadas nas melhores condições. Tal como podemos verificar pelos gráficos representados nas figuras 12, 13, 14 e 15, todos os primers estavam nas melhores condições, uma vez que apresentaram valores de eficiência entre 103,58% e 107,04%. Assim sendo, podemos considerar que estes valores encontram-se dentro de padrões aceitáveis, que se situam entre os 90% e 110%.

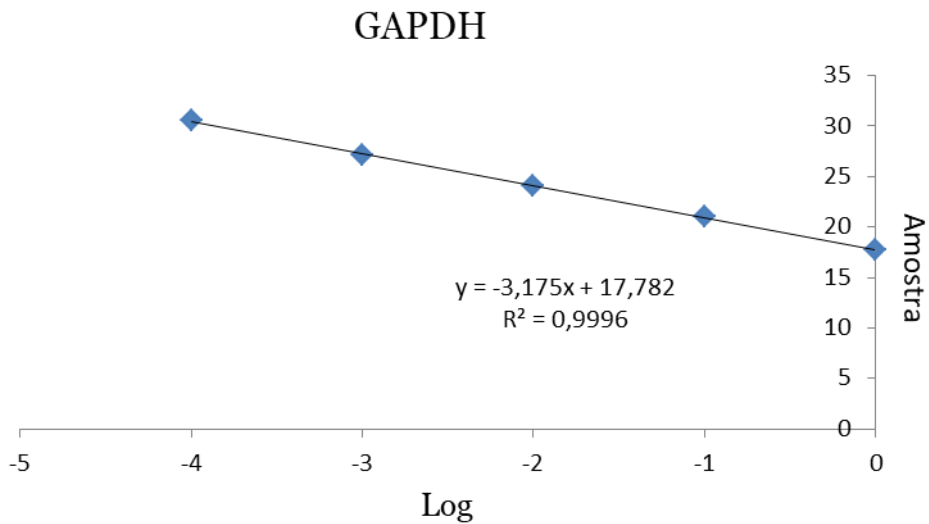


Figura 12: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene housekeeping GAPDH em células Raw com uma eficiência de 106,52%.

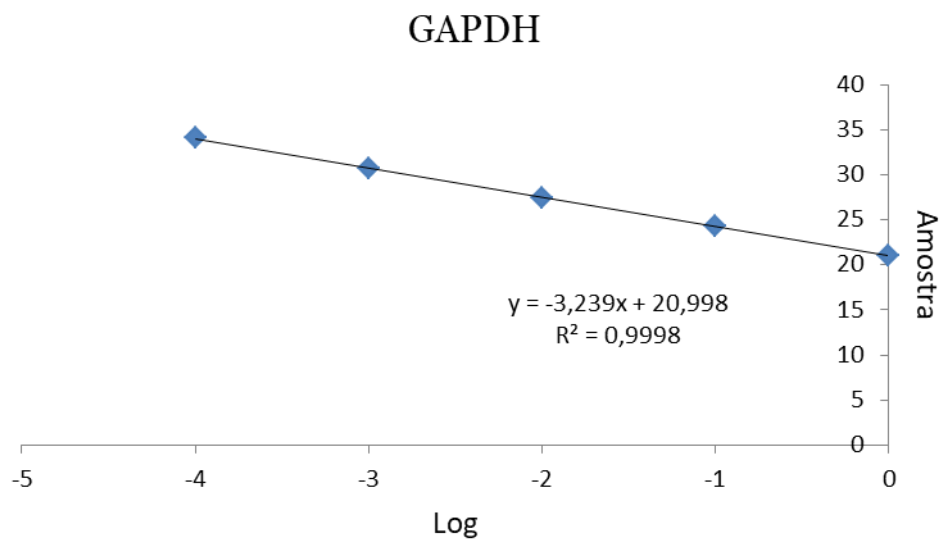


Figura 13: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene housekeeping GAPDH em fibroblastos com uma eficiência de 103,58%.

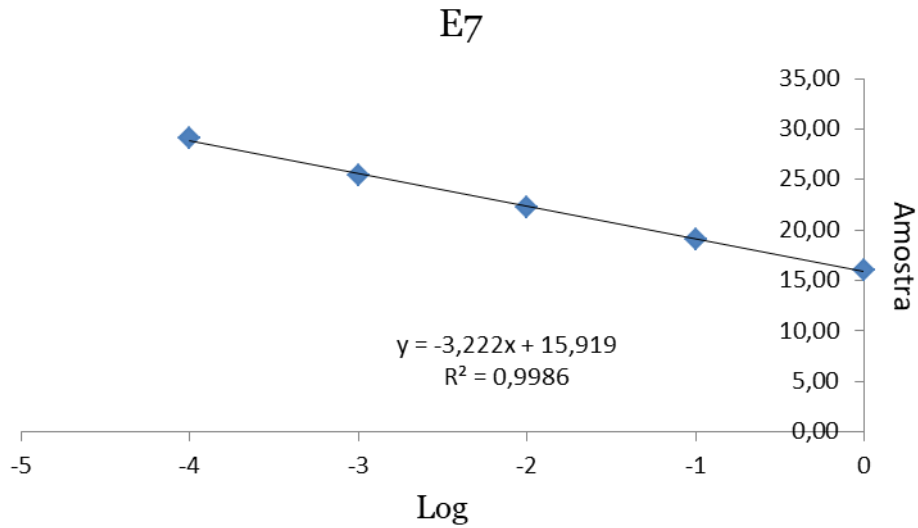


Figura 14: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene E7 em células Raw com uma eficiência de 104,35%.

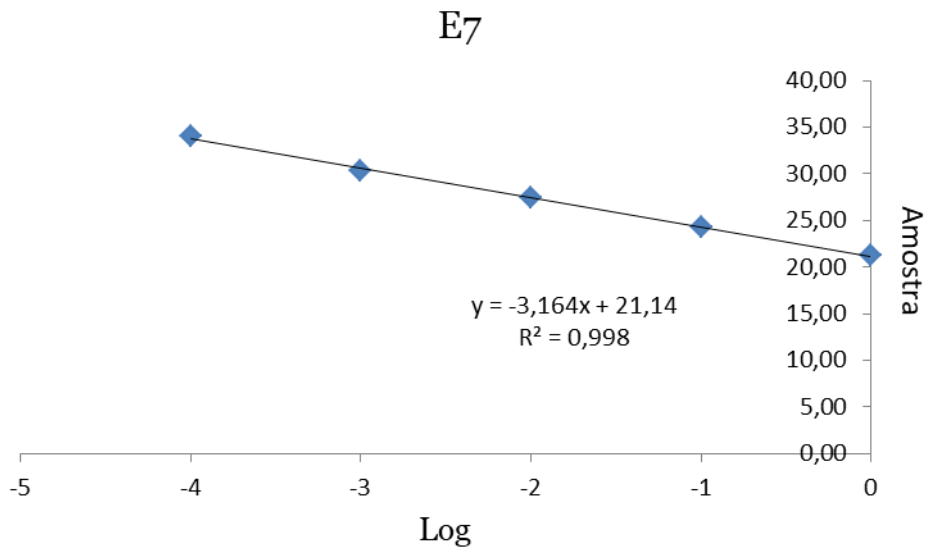


Figura 15: Representação gráfica da eficiência de primers para o transcrito do gene E7 em fibroblastos com uma eficiência de 107,04%.

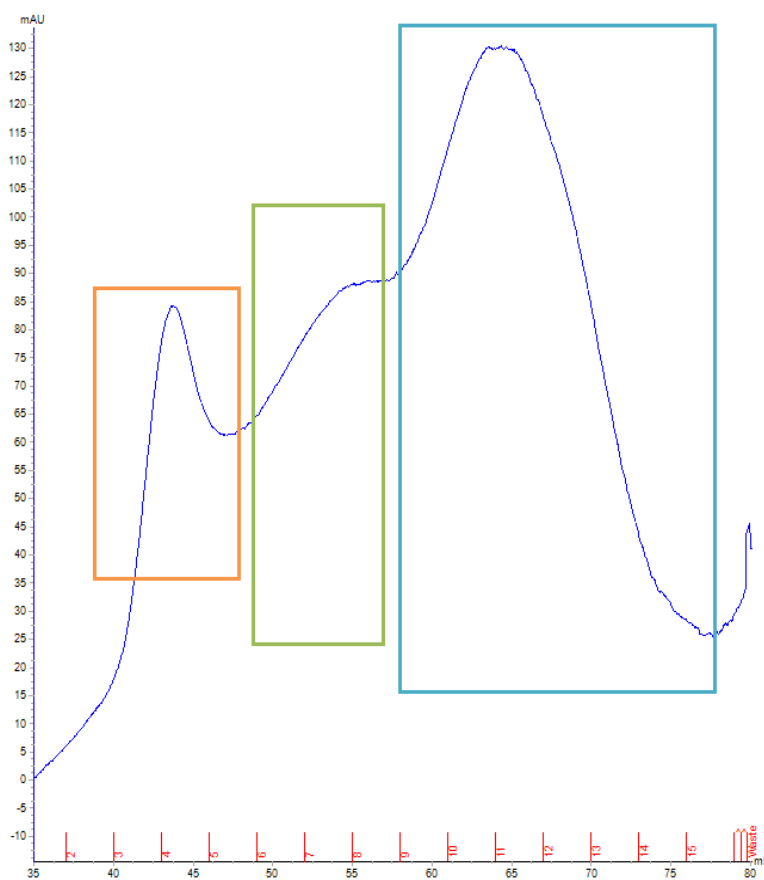
Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Influência do antibiótico na produção de mcDNA

A fim de avaliar a influência que a adição de antibiótico irá ter no rendimento de mcDNA, os meios utilizados nos processos de pré-fermentação, fermentação e indução foram suplementados com canamicina (50 µg/mL). A produção de mcDNA foi testada sob três condições diferentes - adicionando antibiótico ao meio de pré-fermentação, fermentação e indução; adicionando antibiótico somente na pré-fermentação e fermentação; e sem adição de antibiótico na pré-fermentação, fermentação e indução. Após o processo de produção, foi utilizada a técnica de cromatografia de exclusão molecular, utilizando a coluna *Sephacryl S-1000 SF* de 60 cm, para a purificação de mcDNA. O equilíbrio da coluna foi promovido com 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, a pH 7,0 e o ensaio foi realizado com um caudal de 0,3 mL/min, após a injeção de 2 mL de amostra proveniente da extração. Procedeu-se à recolha de várias frações ao longo do ensaio até a eluição de mcDNA para serem posteriormente concentradas e analisadas por eletroforese de agarose como representado nas figuras 16, 17 e 18.

A- Adição de antibiótico na pré-fermentação, fermentação e indução.

I



II

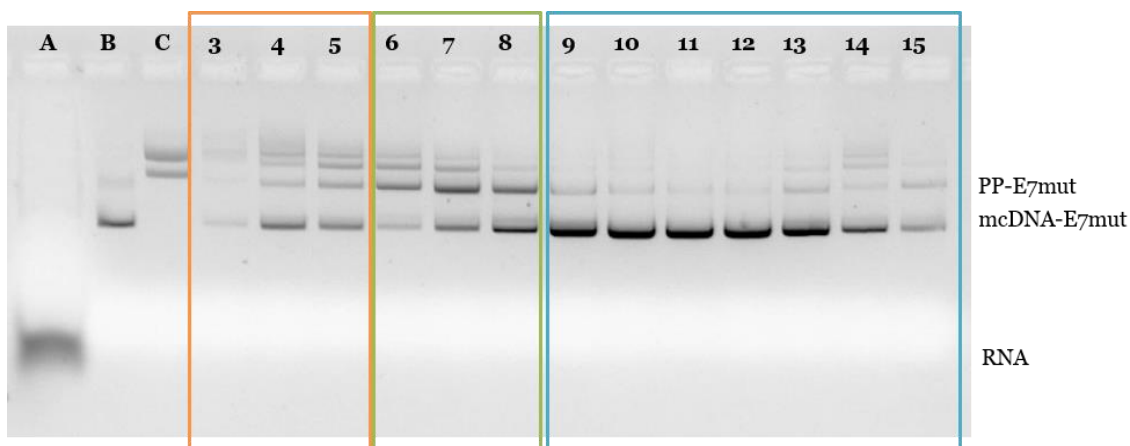
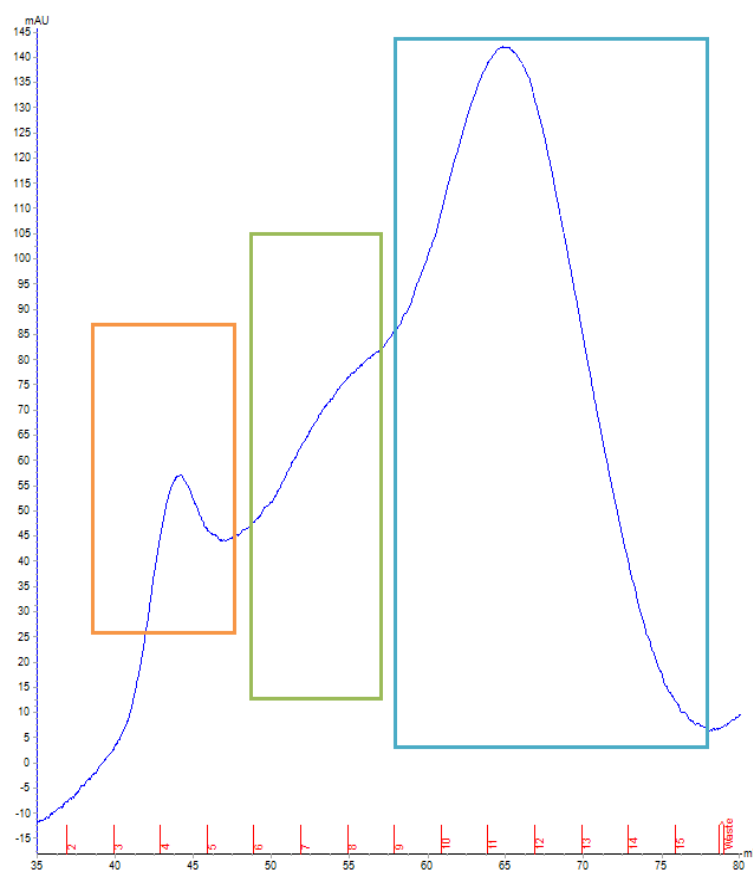


Figura 16: Perfil cromatográfico da amostra de lisado, extraída de células provenientes da experiência com adição de antibiótico na pré-fermentação, fermentação e indução, na coluna *Sephacryl S-1000 SF* (I); Respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo. A- Amostra inicial após extração; B- Amostra de mcDNA-E7mut; C- Amostra de PP-E7mut (II).

B- Adição de antibiótico na pré-fermentação e fermentação.

I



II

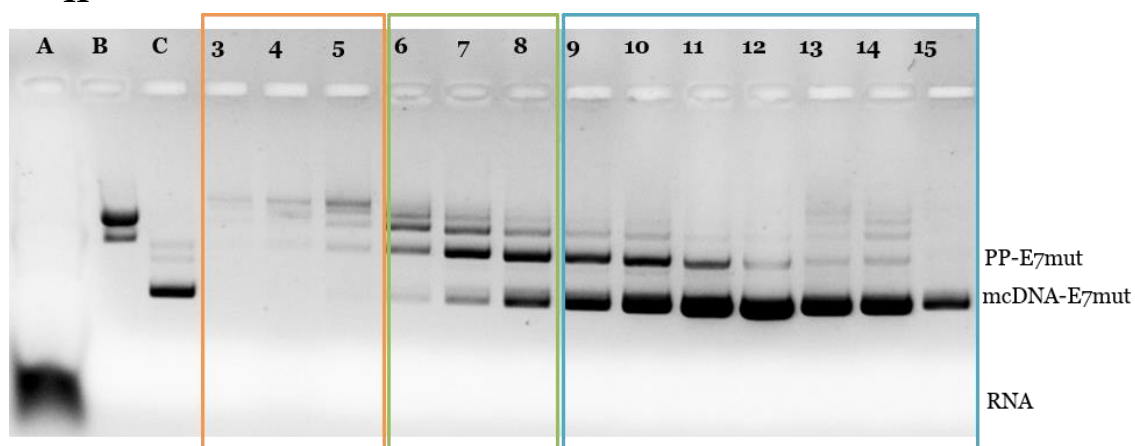


Figura 17: Perfil cromatográfico da amostra de lisado, extraída de células provenientes da experiência com adição de antibiótico somente na pré-fermentação e fermentação, na coluna *Sephacryl S-1000 SF* (I); Respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo. A- Amostra inicial após extração; B- Amostra de mcDNA-E7mut; C- Amostra de PP-E7mut (II).

C- Sem adição antibiótico.

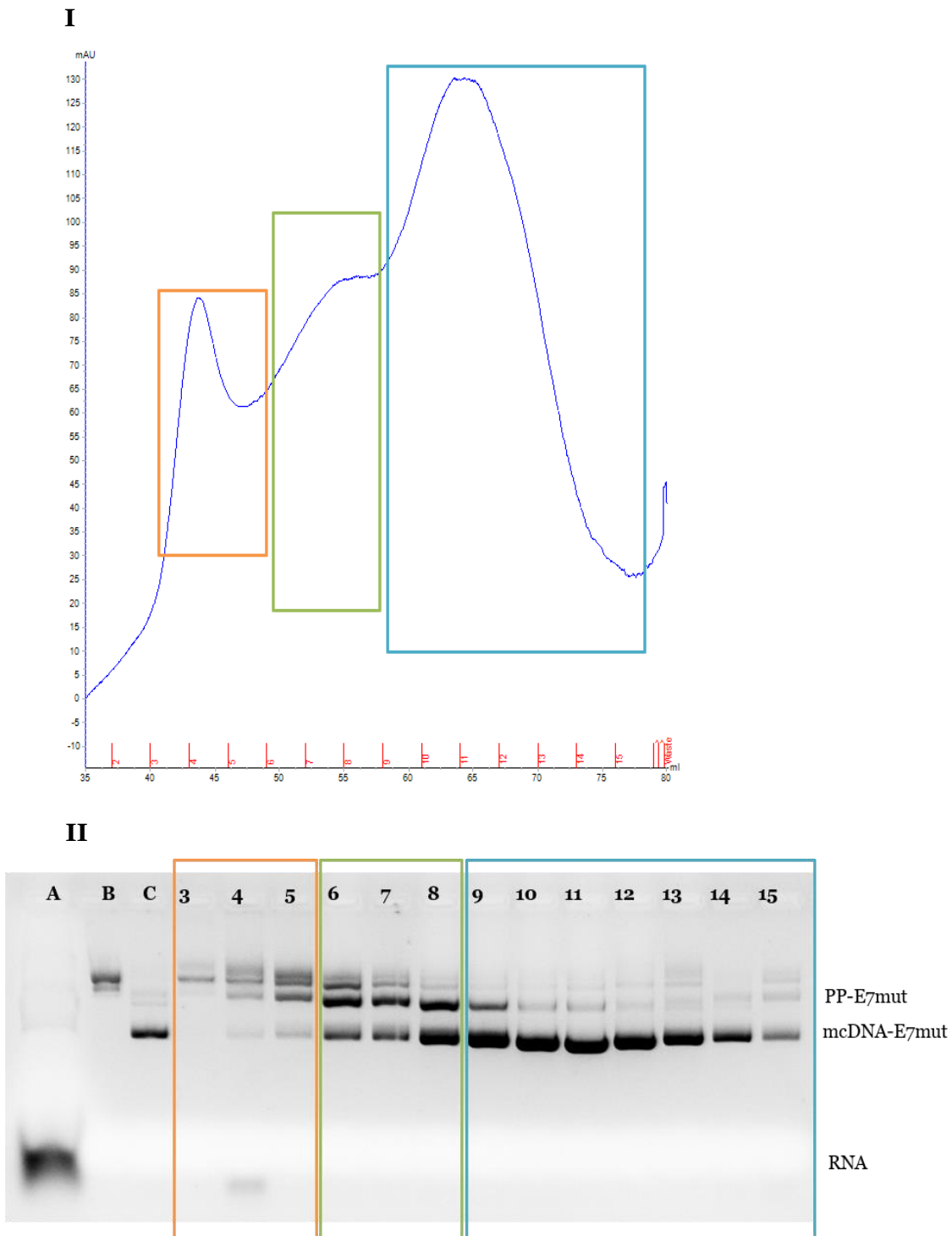


Figura 18: Perfil cromatográfico da amostra de lisado, extraída de células provenientes da experiência sem adição de antibiótico, na coluna *Sephacryl S-1000 SF* (I); Respetiva eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas ao longo do tempo. A- Amostra inicial após extração; B- Amostra de mcDNA-E7mut; C- Amostra de PP-E7mut (II).

As figuras 16I, 17I e 18I mostram que as moléculas eluem de acordo com o seu peso molecular, sendo primeiro eluídas as moléculas de maior peso molecular, como o gDNA (frações 3 a 5 da figura 16II, 17II e 18II), em seguida as de menor peso molecular, o PP (frações 6-8 da figura 16II, 17II e 18II), a molécula de interesse/mcDNA (frações 9-5 da figura 16II, 17II e 18II) e por fim o RNA que dado o seu tamanho reduzido se consegue facilmente eliminar num último pico que não foi recolhido nestes ensaios. Tendo em conta que a estratégia de purificação utilizada se baseia na separação das moléculas em função das suas dimensões (do seu volume hidrodinâmico), os resultados obtidos estão em concordância com o expectável, isto é, as moléculas de menor tamanho ficam retidas nos poros da matriz cromatográfica e percorrem um caminho maior, sendo as moléculas de maiores dimensões as primeiras a serem eluídas. Considerando o facto de que a maioria das proteínas e o RNA possuem tamanhos menores e que o gDNA é muito maior que as restantes moléculas, a eliminação dessas impurezas é expectável [52], tal como já foi explorado previamente pelo nosso grupo de investigação [66].

Relativamente à análise dos picos de interesse do vetor de mcDNA de cada ensaio, foi possível verificar que no ensaio com antibiótico na pré-fermentação, fermentação e indução e no ensaio sem antibiótico (figura 16I e 18I) o pico de mcDNA tem uma absorvância de aproximadamente 130 mAU, enquanto no ensaio com antibiótico somente na pré-fermentação e fermentação (figura 17I) o pico de mcDNA tem uma absorvância de 145 mAU, o que pode sugerir a presença de uma maior concentração de mcDNA nessa amostra de lisado. No sentido de perceber melhor essa relação e poder comparar o conteúdo de ácidos nucleicos por pico de cada ensaio, as frações de cada pico foram juntas num só tubo. As amostras finais foram novamente avaliadas por eletroforese em gel de agarose (figura 19) e num nano-espectrofotómetro (tabela 4) a fim de identificar o ensaio com maior rendimento de mcDNA.

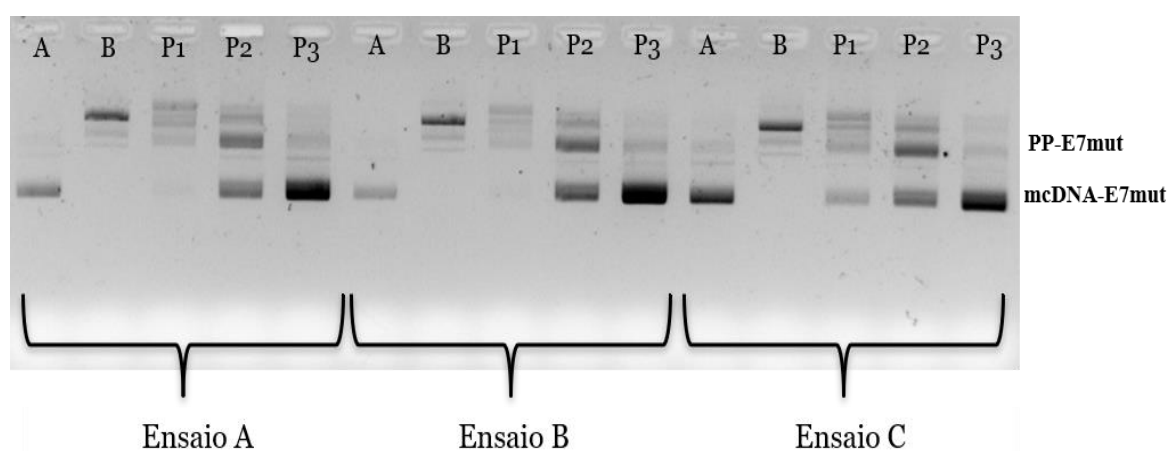


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose das frações recolhidas por pico ao longo tempo. A - Amostra de mcDNA-E7mut; B- Amostra de PP-E7mut; P1- frações 3-5; P2- frações 6-8; P3- frações 9-15 correspondentes aos 3 ensaios cromatográficos anteriores.

Tabela 4: Concentração da amostra final resultante da junção das frações de cada pico (ng/uL) medida no Nanodrop.

	Ensaio com adição de antibiótico na pré-fermentação, fermentação e indução.	Ensaio com adição de antibiótico na pré-fermentação e fermentação.	Ensaio sem adição antibiótico
Pico 1	20,5	13,5	25
Pico 2	28	37,5	44
Pico 3	40	57,5	50,5

Após o estudo das diversas condições, verificou-se que o ensaio com adição de antibiótico somente na pré-fermentação e fermentação é o mais promissor para a produção de mcDNA, dado que é o ensaio com maior conteúdo de ácidos nucleicos e pela eletroforese percebe-se que é maioritariamente mcDNA. A ausência de antibiótico na etapa de fermentação irá aumentar o risco de perda de vetor na divisão das células (instabilidade segregacional do pDNA em *E. coli*), podendo ocorrer a multiplicação de células sem vetor que vai contribuir para a perda de rendimento de mcDNA final. Por outro lado, a presença de antibiótico na fase de indução poderá conduzir à perda/morte de algumas células que deixaram de ter presente o gene de resistência a antibióticos por ação da enzima endonuclease I-SceI que vai reconhecer uma sequência recente na zona procariótica do PP e mP [116].

4.2. Propriedades dos sistemas binários formulados

O péptido de octa-arginina R8 é um CPP catiónico, com carga positiva, conhecido por facilitar a interação e o acesso ao interior das células [102]. Esta capacidade do R8 se ligar, interagir e, conseqüentemente, condensar o DNA tem sido explorada na funcionalização de sistemas de entrega de material genético às células [104, 105]. Também uma grande variedade de ligandos tem sido explorada para criar veículos de entrega funcionalizados. A eficácia dos dispositivos manosilados é atribuída à sua capacidade de direcionar a receptores de manose, que são altamente expressos nas células do sistema imunológico [111]. Seguindo esta estratégia, no presente estudo, concentrações variáveis de R8-manose foram adicionadas, gota a gota, a um volume fixo de mcDNA para formular os sistemas binários R8-manose/mcDNA-E7mut. Estes sistemas foram preparados tendo em conta os rácios N/P de 0,8, 1, 1,5, 2 e 2,5, uma vez que a capacidade de condensação do mcDNA é condicionada pela composição dos sistemas e pelo rácio N/P a que estes são preparados

[117]. A eficiência de encapsulação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (figura 20).

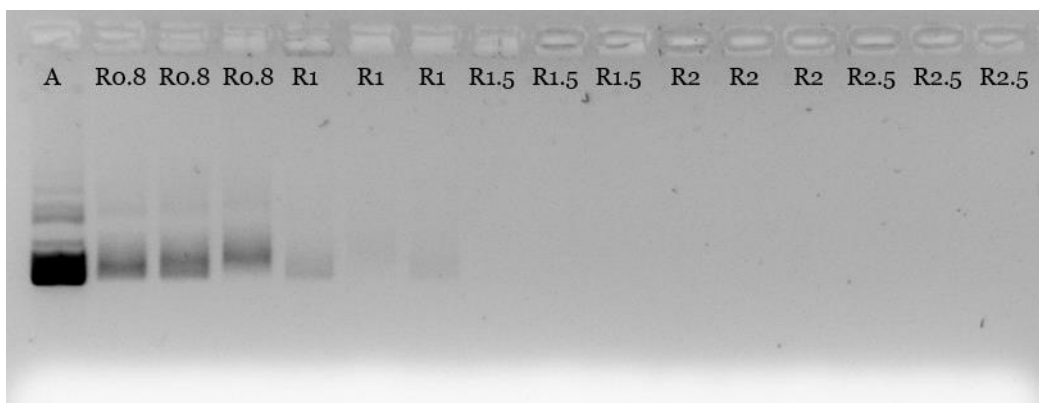


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados (R8-mannose/mcDNA-E7mut) a diferentes rácios em triplicado. (Ro.8 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 0,8:1; R1 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 1:1; R1.5 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 1,5:1; R2 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:1; R2.5 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 2,5:1.

Os resultados obtidos revelam que para os sistemas preparados a rácio N/P de 0,8, o R8-mannose é incapaz de condensar eficientemente o mcDNA, na medida em que é possível verificar a existência de mcDNA livre que migrou no gel de agarose (figura 20). A formulação preparada a rácio N/P de 1 demonstra que o mcDNA não é totalmente encapsulado. A não existência de bandas correspondentes ao mcDNA na mobilidade eletroforética dos sobrenadantes dos sistemas formulados nos restantes rácios considerados, revela que o R8-mannose é capaz de neutralizar eficientemente a carga negativa do mcDNA-E7mut, sugerindo uma eficiência de encapsulação elevada. Como relatado na literatura, o aumento do rácio N/P corresponde a uma quantidade aumentada de grupos amina das argininas, e conseqüentemente de cargas positivas, que aumentam a interação eletrostática com os grupos fosfato de mcDNA [34]. Este fator parece originar uma maior condensação de mcDNA dentro dos sistemas, resultando em maiores eficiências de encapsulação [34].

A confirmação da presença de mcDNA e R8-mannose nos sistemas foi avaliada através da técnica de espectroscopia infravermelha por transformada de Fourier (FTIR). Foram registados os espectros dos compostos isolados e da formulação do sistema binário estudado, tendo-se procedido em seguida à comparação dos picos característicos evidenciados nos respetivos espectros (figura 21).

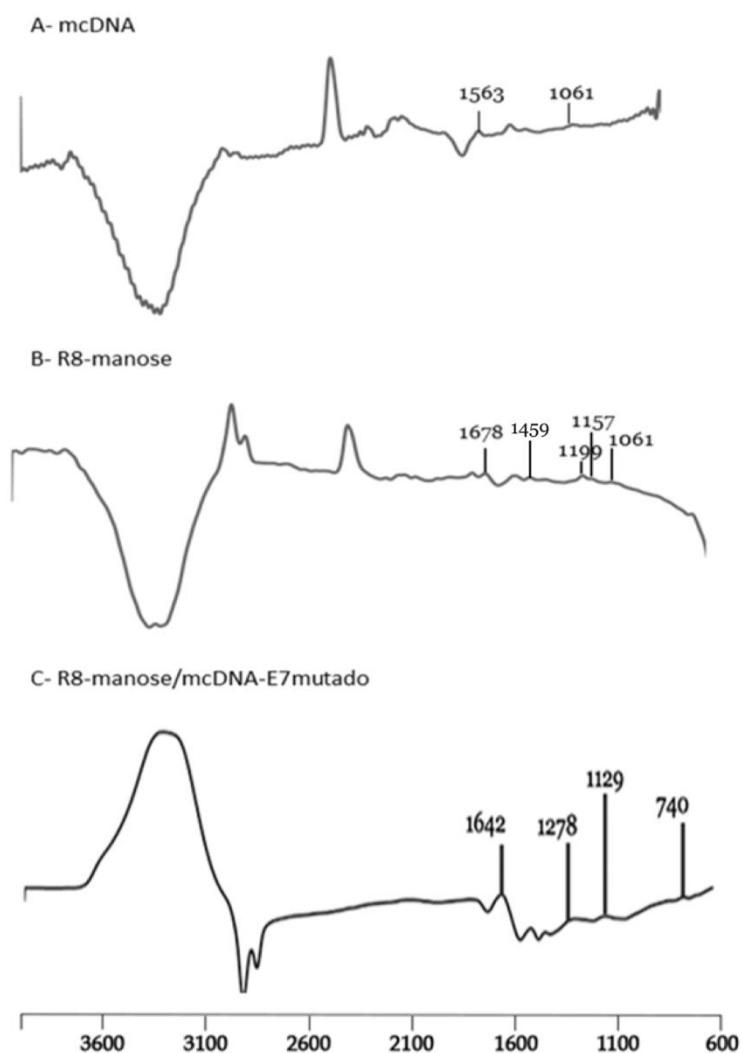


Figura 21: Espectro de FTIR (Absorbance vs Wavenumber (cm⁻¹)) do mcDNA (A), R8-manose (B) e do sistema R8-manose/mcDNA-E7mut.

O espectro de mcDNA na região de 2.000 a 400 cm⁻¹ contém uma variedade de informações sobre o arranjo conformacional desta molécula. Este espectro apresenta picos na região 1700 a 1500 cm⁻¹ que estão associados às bases nitrogenadas do plasmídeo. O pico de absorção visualizado em 1061 cm⁻¹ é conhecido por estar relacionado com a vibração de ribose (açúcar C-C) [118].

O espectro B, correspondente ao péptido R8-manose, apresenta picos de absorção semelhantes a valores já identificados em outros estudos [119, 120]. O pico proeminente em 1459 cm⁻¹ corresponde a um dos picos principais característicos da octaarginina. O pico proeminente a 1678 cm⁻¹ é atribuído ao alongamento de guanidina N=C e de carbonilo C=O e os picos em 1199 cm⁻¹ e 1157 cm⁻¹ são atribuídos aos alongamentos C(O)-O e N-C, respetivamente [119]. O pico a 1061 cm⁻¹ é atribuído à vibração de C-O da manose, sugerindo a sua presença no polímero de R8 [121, 122].

O espectro do sistema R8-mannose/mcDNA-E7mut permite detetar a existência de interações entre todos os seus componentes. A presença do R8-mannose comprova-se pela observação dos seus picos de absorção característicos, que sofreram alguns deslocamentos muito provavelmente como consequência do processo de complexação. É possível identificar picos proeminentes em 1642 cm^{-1} , 1278 cm^{-1} e 1129 cm^{-1} . O pico de absorvância do mcDNA é a 740 cm^{-1} .

A morfologia dos sistemas binários R8-mannose/mcDNA-E7mut foi analisada através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM). As imagens representadas na figura 22 ilustram os sistemas preparados a diferentes rácios N/P.

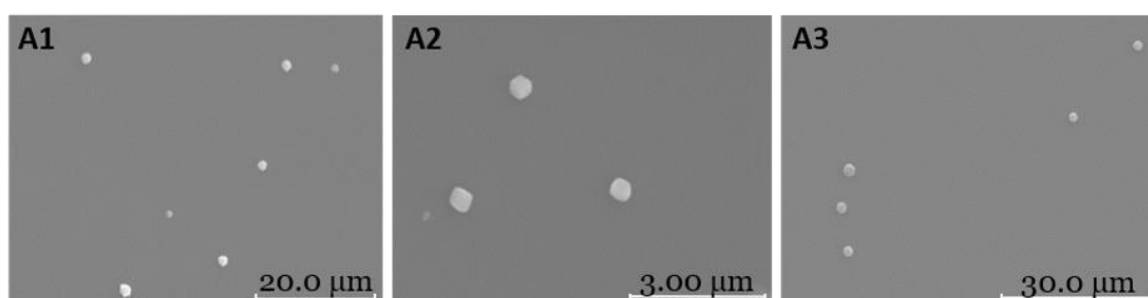


Figura 22: Imagens SEM das nanopartículas R8-mannose/mcDNA-E7mut formuladas. A1 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 1:1; A2 - R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 1,5:1; A3 -. R8-mannose/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:1.

É possível verificar que as nanopartículas formadas apresentam uma forma esférica ou oval, o que as torna adequadas para um processo de internalização celular. Estudos anteriores revelaram que as nanopartículas com formato esférico favorecem a captação celular e eficiência de transfecção [123, 124].

O tamanho e o potencial zeta são conhecidos por afetar diretamente a capacidade das nanopartículas de entrar efetivamente na célula. As nanopartículas com tamanhos menores facilitam a entrada na célula, enquanto o potencial zeta positivo favorece a interação entre os sistemas e a membrana celular carregada negativamente [34]. O tamanho médio e o potencial zeta das nanopartículas de R8-mannose/mcDNA-E7mut foram avaliados utilizando um Zetasizer Nano Zs. Os valores encontram-se resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Tamanho e potencial zeta das nanopartículas de R8-mannose/mcDNA-E7mut formuladas para os diversos rácios. Os valores foram calculados com os dados obtidos em três medidas independentes (média \pm DP, n = 3).

N/P ratio	Tamanho	Potencial Zeta
R8-mannose/mcDNA-E7mut (1:1)	432,44 \pm 0,96	-0,67 \pm 0,74
R8-mannose/mcDNA-E7mut (1,5:1)	410,33 \pm 0,74	+1,78 \pm 0,31
R8-mannose/mcDNA-E7mut (2:1)	365,78 \pm 0,94	+6,11 \pm 0,63

A análise dos resultados revela que o tamanho das nanopartículas de R8-mannose/mcDNA-E7mut diminui   medida que aumenta o rácio N/P. Os resultados confirmam que todas as nanopartículas apresentam um tamanho inferior a 500 nm. Além disso, o tamanho das partículas diminui   medida que o rácio N/P aumenta, o que vai de encontro ao que já foi descrito na literatura. O aumento do r cio N/P, ou seja, o aumento da quantidade de grupos amina irá originar um maior grau de condensac o de mcDNA, resultando em complexos mais pequenos [34]. Apesar de existirem na literatura referências de que as nanopartículas mais pequenas, entre 50-150 nm, favorecerem a eficiência de transfec o e internaliza o celular, ainda existe muita controvérsia sobre este tema [125]. Alguns estudos relatam que nanopartículas até 500 nm foram eficazes na internaliza o celular [126]. Há ainda a salientar que apesar do sistema em estudo ter sido formulado com R8 funcionalizado com manose, alguns estudos demonstram que a presença de manose não tem influência no tamanho das nanopartículas [121, 127].

Os potenciais zeta das nanopartículas de R8-mannose/mcDNA-E7mut revelaram uma diferença substancial para os diversos rácios N/P testados. Pela análise dos valores descritos na tabela 5,   possível constatar um aumento nos valores do potencial zeta   medida que se aumentou o rácio N/P utilizado na formula o das nanopartículas. O rácio N/P = 1 apresenta valores negativos, -0,67 mV, enquanto os sistemas de maior rácio testado possuem valores de potencial zeta positivos, a variar entre os +1,78 e os +6,11 mV. Os sistemas R8-mannose/mcDNA-E7mut possuem valores de potencial zeta ligeiramente superiores quando   usado o rácio N/P mais elevado. Os valores apresentados indicam que as cargas negativas de mcDNA podem ser neutralizadas, aumentando o rácio N/P.

Para que a entrega de material genético às células-alvo seja bem sucedida   fundamental que este não sofra qualquer forma de biodegrada o que possa levar   sua perda e degrada o durante o transporte. Como tal, o sistema de entrega terá que garantir a

proteção do mcDNA da degradação por nucleases, por forma a promover/garantir a transcrição do gene terapêutico dentro da célula alvo [32].

Para confirmar a estabilidade e capacidade de proteção das nanopartículas, estas foram incubadas em meio DMEM suplementado com FBS (10%) e com tripsina, a 37 °C durante 0 h, 1 h e 4 h. Os sobrenadantes resultantes destas incubações foram analisados por eletroforese em gel de agarose, estando os resultados obtidos representados na figura 23.

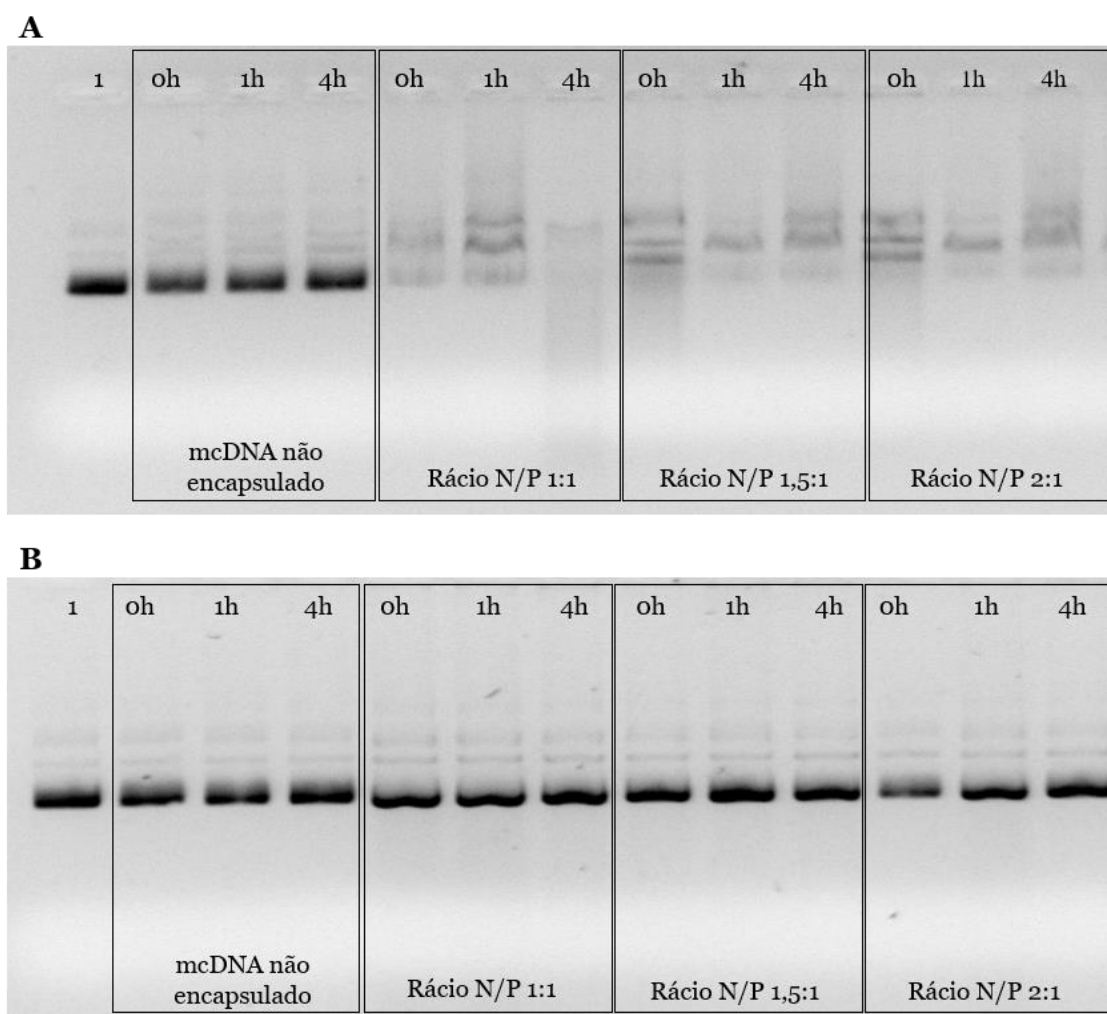


Figura 23: Eletroforese em gel de agarose para analisar a estabilidade dos sistemas binários e consequente proteção do vetor de mcDNA após a sua incubação com DMEM + 10%FBS (A) e com tripsina (B). 1- Controlo mcDNA.

Os resultados evidenciam que os sistemas binários sofrem descomplexação quando incubados quer em meio com soro quer com tripsina, deixando o mcDNA desprotegido, que acaba por sofrer ação das nucleases levando à sua degradação. Este fenómeno ocorre logo às 0 h, pelo que é possível concluir que o sistema R8-manose/mcDNA-E7mut não é capaz de proteger o mcDNA contendo o gene terapêutico, uma vez que não é estável. Os resultados obtidos inviabilizam, no contexto do presente projeto, futuros estudos *in vitro* dado que o

sistema R8-manose/mcDNA-E7mut é degradado pela presença de enzimas séricas, não garantindo, portanto, a entrega de material genético às células-alvo.

4.3. As propriedades dos sistemas ternários

Encontrar o sistema ideal de entrega de material genético às células, que atenda a todos os requisitos já referidos anteriormente, pode ser desafiante. Neste contexto, o polímero polietilenamina (PEI) tem sido amplamente aplicado na formação de nanopartículas baseadas em DNA, uma vez que tem mostrado capacidade para entregar DNA de forma eficiente quer *in vitro*, quer *in vivo* [34]. O PEI é um polímero sintético altamente solúvel em água, carregado positivamente, cujas aminas catiônicas reduzem a carga negativa do DNA após a complexação, originando a sua condensação [128].

Considerando os resultados obtidos pelo sistema binário R8-manose/mcDNA-E7mut, que não se revelou conveniente para prosseguir para estudos de transfecção *in vitro*, optou-se pelo desenvolvimento de um sistema ternário de R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut. Primeiro, diferentes concentrações do polímero PEI foram adicionadas, gota a gota, a um volume fixo de mcDNA, formando o sistema PEI/mcDNA-E7mut. O sistema ternário foi então obtido pela adição de concentrações variáveis de R8-manose às nanopartículas de PEI/mcDNA-E7mut. O sistema desenvolvido foi posteriormente caracterizado em termos de eficiência de encapsulação, presença de R8-manose, morfologia, tamanho e potencial zeta e estabilidade.

Os resultados da eficiência de encapsulação variando o rácio de R8-manose (1, 1.5 e 2) para o rácio de PEI 5 e 10 foram avaliados por eletroforese em gel de agarose e encontram-se representados na figura 24 e 25.

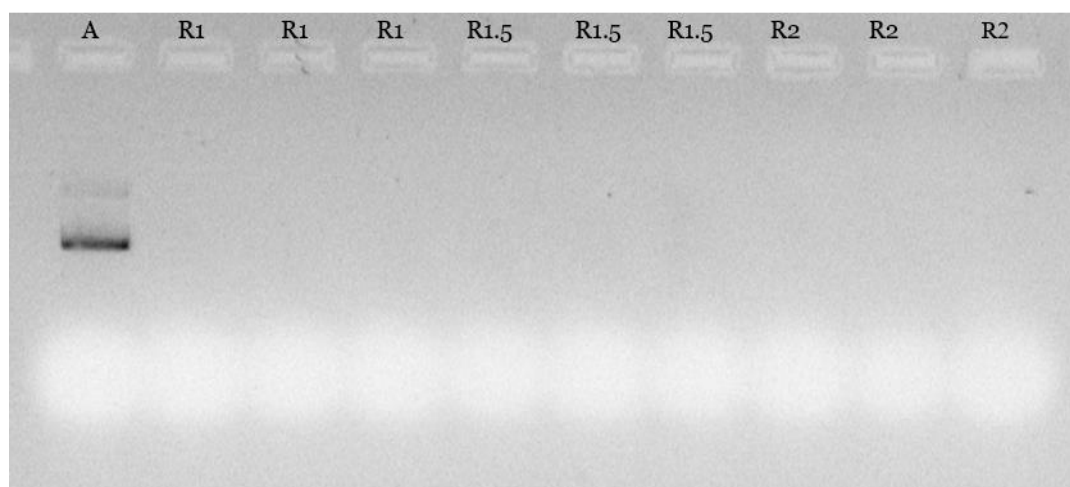


Figura 24: Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 10 de PEI e apenas mudando o rácio de R8. (R1 - R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1:10:1; R1.5 - R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1,5:10:1; R2 - R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:10:1).

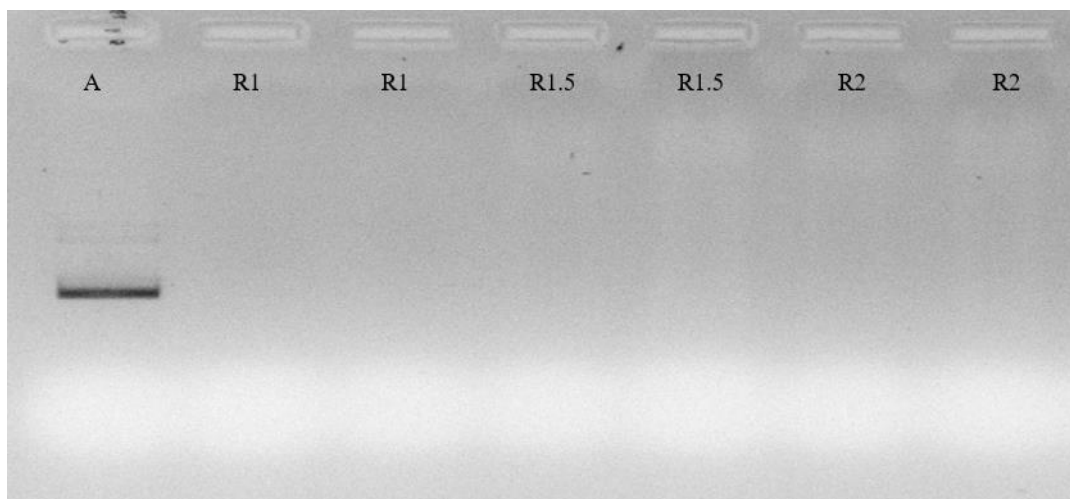


Figura 25: Eletroforese em gel de agarose da amostra de mcDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 5 de PEI e apenas mudando o rácio de R8. (R1 - R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1:5:1; R1.5 - R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1,5:5:1; R2 - R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:5:1).

Todos os sistemas preparados foram capazes de condensar eficientemente o mcDNA, na medida em que é possível verificar a não existência de bandas correspondentes ao mcDNA para os sistemas formulados. A interação eletrostática entre os grupos amina positivos de PEI e de R8-manose com a molécula de mcDNA carregada negativamente, permitiu a formação das nanopartículas.

A técnica FTIR foi utilizada para avaliar a presença de R8-manose nos sistemas estudados após a adição do polímero PEI. Os espectros dos compostos isolados que compõem a formulação dos sistemas foram registados para posterior comparação dos picos característicos com os picos evidenciados no espectro das nanopartículas formuladas (figura 26).

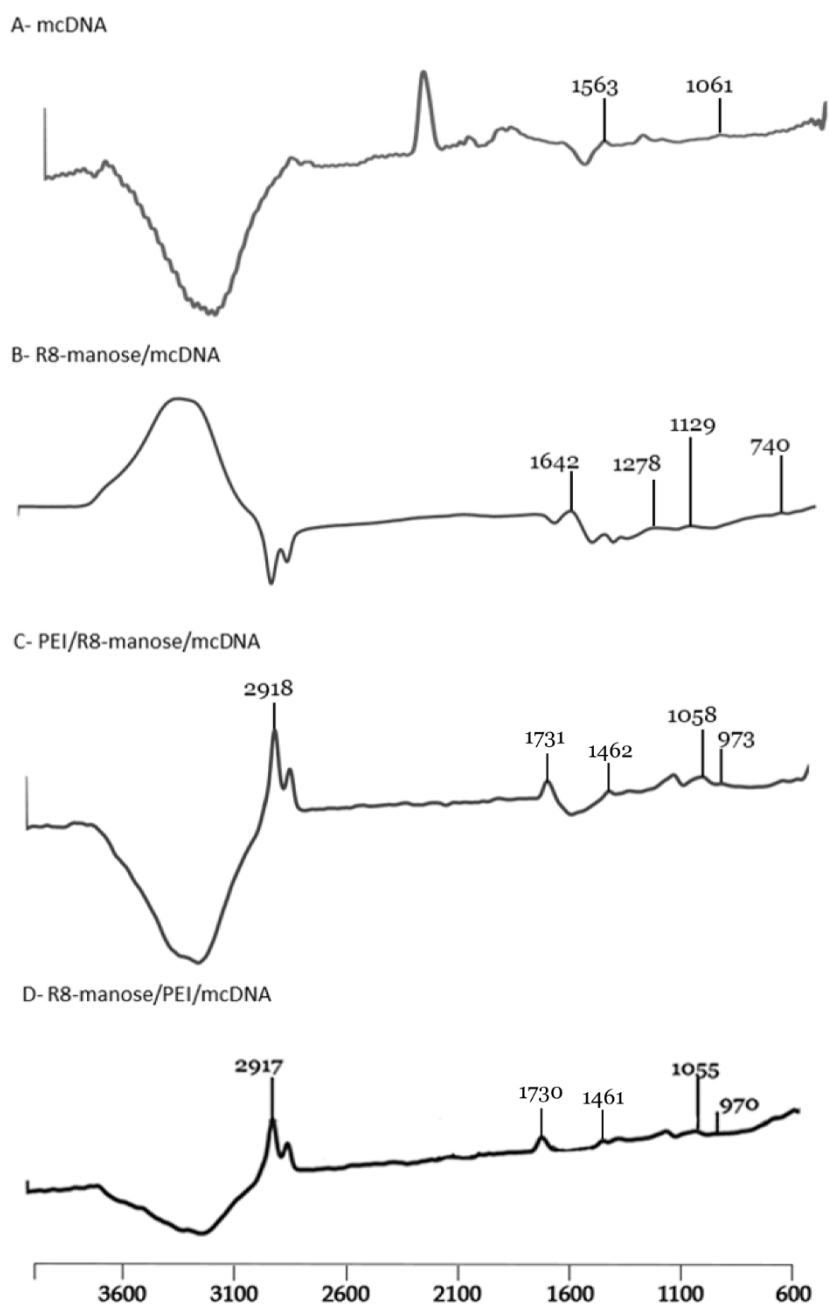


Figura 26: Espectro de FTIR (Absorbance vs Wavenumber (cm⁻¹)) do mcDNA (A), do sistema R8-manose/mcDNA-E7mut (B) do sistema PEI/R8-manose/mcDNA-E7mut (C) e do sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut (D).

Com base na literatura, o espectro do polímero PEI mostra picos em 3000-3422 cm⁻¹ que são característicos de movimentos de “stretching” e vibrações do grupo -NH₂. Os picos em 1539 e 1632 cm⁻¹ são normalmente atribuídos a vibrações do grupo N-H. Os múltiplos picos na região de 1000-1300 cm⁻¹ podem ser atribuídos como correspondendo a vibrações de ligação N-C [129].

Foram registados os espectros de R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut e de PEI/R8-manose/mcDNA-E7mut a fim de verificar se a ordem de adição do R8-manose e do PEI teria influência na estrutura da superfície dos sistemas, nomeadamente no que diz respeito à presença da manose. Verificou-se que, em ambos os espectros, a sua presença comprova-se pela observação dos picos de absorção em 1055 cm^{-1} e 1058 cm^{-1} . O polímero de PEI também apresenta no espectro do sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut os seus picos mais importantes a, aproximadamente, 1461 cm^{-1} e 1730 cm^{-1} , representando as ligações N-H que ocorrem da encapsulação com os restantes compostos. O pico que se observa a aproximadamente 2917 cm^{-1} já foi identificado como sendo um pico correspondente a este polímero [130]. Podemos ainda verificar que o polímero PEI não condiciona a presença de R8-manose na composição do sistema, uma vez que são identificados alguns picos característicos de ambos os polímeros. Relativamente ao mcDNA, a sua presença é comprovada pelo pico de absorvância em 970 cm^{-1} .

Os sistemas ternários R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut, com diferentes rácios, também foram analisados através de SEM, a fim de verificar a sua morfologia (figura 27). As nanopartículas formadas apresentam uma geometria esférica ou oval, idêntica à evidenciada no estudo do sistema R8-manose/mcDNA-E7mut, pelo que continuam a ser adequadas para um processo de internalização celular.

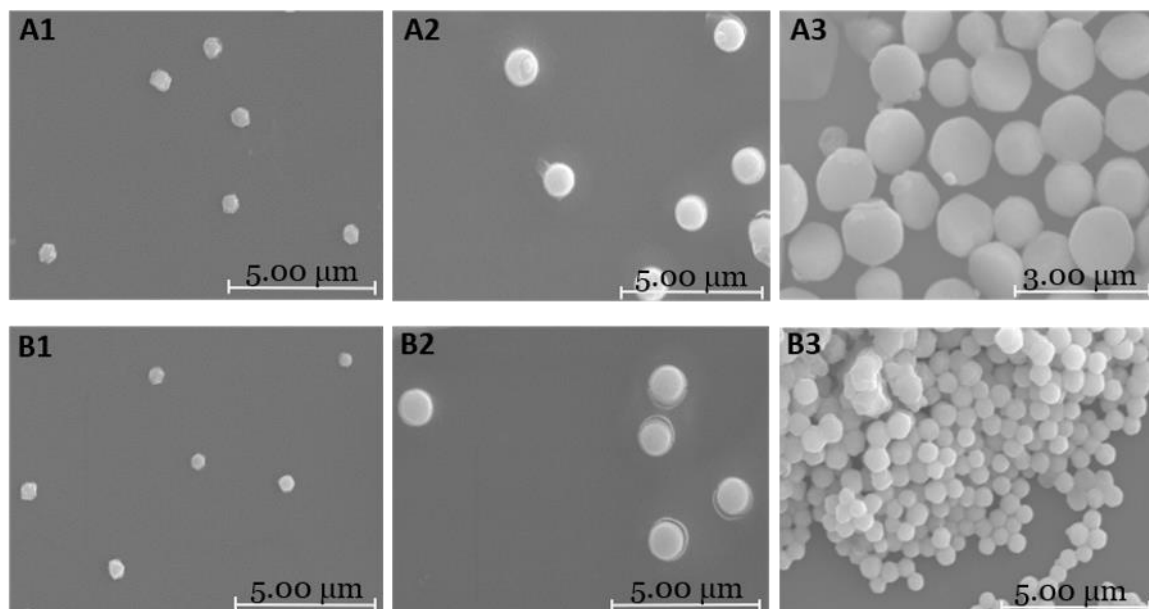


Figura 27: Imagens SEM das nanopartículas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut formuladas. A1 – R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1:5:1; A2 – R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1,5:5:1; A3 – R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:5:1; B1 – R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1:10:1; B2 – R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 1,5:10:1 e B3 – R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:10:1.

Foram ainda realizados estudos, usando um Zetasizer nano ZS, para obter dados sobre o tamanho médio e potencial zeta dos sistemas, formulados com diferentes rácios N/P, e que são apresentadas na tabela 6 e 7.

Tabela 6: Tamanho e potencial zeta das nanop rticulas de PEI/mcDNA-E7mut formuladas para os diversos rácios. Os valores foram calculados com os dados obtidos em três medidas independentes (média \pm DP, n = 3).

	Tamanho	Potencial Zeta
PEI/mcDNA-E7mut (5:1)	213,33 \pm 0,31	16,22 \pm 0,79
PEI/mcDNA-E7mut (10:1)	177,11 \pm 0,89	20,56 \pm 0,59

Tabela 7: Tamanho e potencial zeta das nanop rticulas de R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut formuladas para os diversos rácios. Os valores foram calculados com os dados obtidos em três medidas independentes (média \pm DP, n = 3).

N/P ratio	Tamanho	Potencial Zeta
R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (1:10:1)	281,7 \pm 1,40	+11,44 \pm 0,79
R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (1,5:10:1)	270,00 \pm 0,74	+13,22 \pm 0,90
R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (2:10:1)	234,56 \pm 0,96	+14,67 \pm 0,59
R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (1:5:1)	402,00 \pm 0,85	+7,00 \pm 0,59
R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (1,5:5:1)	370,89 \pm 0,89	+8,44 \pm 0,63
R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut (2:5:1)	300,11 \pm 0,74	+10,00 \pm 0,90

Relativamente aos resultados do tamanho, verificou-se que mantendo os rácios N/P do PEI (5 e de 10) e mudando apenas os rácios N/P de R8-mannose (1,1,5 e 2), o tamanho vai diminuindo, sendo o valor mais reduzido correspondente ao maior rácio N/P. O mesmo ocorre quando se mant m apenas os rácios N/P de R8-mannose (1, 1,5 e 2) e vai-se aumentando os rácios N/P de PEI (5 e de 10), uma vez que o tamanho das nanop rticulas diminui   medida que aumenta o rácio N/P, apresentando os tamanhos menores. Os sistemas preparados a um rácio N/P de R8-mannose de 2 exibem um tamanho significativamente menor (234,56 nm), se o rácio N/P de 10 do PEI for considerado. Para

isso contribui a alta densidade de carga e a grande capacidade de condensação do PEI e R8-manose, que juntos potencializam uma forte interação com o mcDNA, levando à formação de nanopartículas de menor tamanho. A análise dos valores do potencial zeta, para cada sistema em estudo, exibiu um perfil idêntico, na medida em que mantendo os raios N/P do PEI e mudando apenas os raios N/P de R8-manose, ou mantendo apenas os raios N/P de R8-manose e aumentando os raios N/P de PEI, verifica-se um aumento de carga superficial. A diferença entre a quantidade de amins primárias provenientes do polímero e a quantidade de grupos fosfato provenientes do plasmídeo, resulta num incremento da carga positiva à superfície dos sistemas. Os sistemas que se revelaram mais adequados foram os preparados a um rácio N/P de R8-manose de 2 pois exibem o tamanho menor (234,56 nm) e o potencial zeta (+14,67) mais elevado, se o rácio N/P de 10 do PEI for considerado. Alguns estudos têm-se debruçado sobre a formação de complexos com PEI para a construção de sistemas ternários, os quais têm revelado propriedades resistentes às proteínas séricas e rápida captação celular, levando a uma maior eficiência de transferência de genes [131]. Devido às suas amins primárias, secundárias e terciárias, o polímero PEI apresenta maior carga positiva em pH fisiológico em comparação com o péptido R8. Além disso, o aumento do peso molecular do PEI (25 kDa) e o aumento do rácio N/P resultarão na formação de sistemas mais estáveis e menores [34]. Isso pode, no entanto, induzir maior citotoxicidade [131]. Neste contexto, Song e colaboradores prepararam um nanogel de polietilenimina -RRRRRRRR (R8)-heparina (HPR) como um sistema eficiente de entrega de genes. O péptido R8 foi complexado com PEI (R8-PEI) para aumentar a densidade de carga, reduzir a toxicidade do sistema de entrega de genes e, assim, aumentar a captação celular e a eficiência de transfecção de genes [132]. Estes resultados vêm ao encontro dos obtidos neste estudo, uma vez que a adição de PEI ao sistema R8-manose/mcDNA-E7mut não só reduziu consideravelmente o tamanho das partículas, como também aumentou o potencial zeta.

Contudo, importa referir que os valores relativos ao tamanho e potencial zeta do sistema formulado apenas com PEI são inferiores aos obtidos no sistema com R8-manose e PEI. Este resultado pode ser explicado devido à estrutura ramificada do PEI. A sua complexação com R8-manose poderá conduzir a um conjunto de cargas positivas inferior, levando a uma menor capacidade de condensação do mcDNA e resultando em partículas com tamanhos superiores para os mesmos raios de PEI em ambos os sistemas, binários e ternários.

É fundamental avaliar a estabilidade dos sistemas no compartimento extracelular e verificar a proteção que o sistema confere ao transgene, pois isso afetará significativamente o sucesso da transfecção. Para tal, os sistemas foram incubados com tripsina e com meio DMEM suplementado com 10% de soro (FBS), por diferentes períodos de tempo (0, 1, 4 e 6h) e a

eletroforese em gel de agarose foi utilizada para avaliar a proteção do mcDNA (figura 28 e 29).

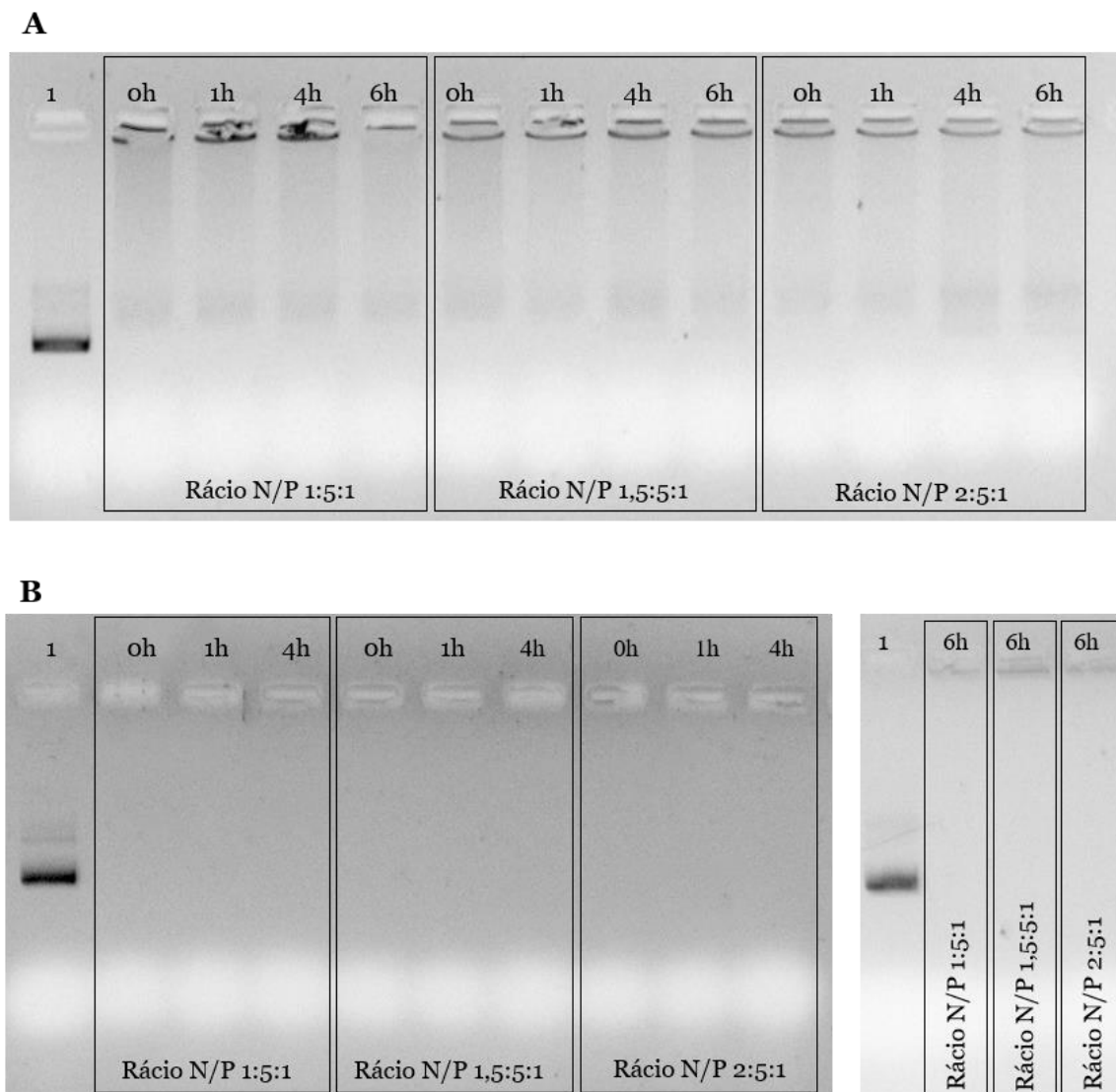


Figura 28: Eletroforese em gel de agarose para analisar a proteção do vetor de mcDNA após a sua incubação com DMEM + 10%FBS (A) e com tripsina (B). 1- Controlo mcDNA. Sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 5 de PEI e apenas mudando o rácio de R8.

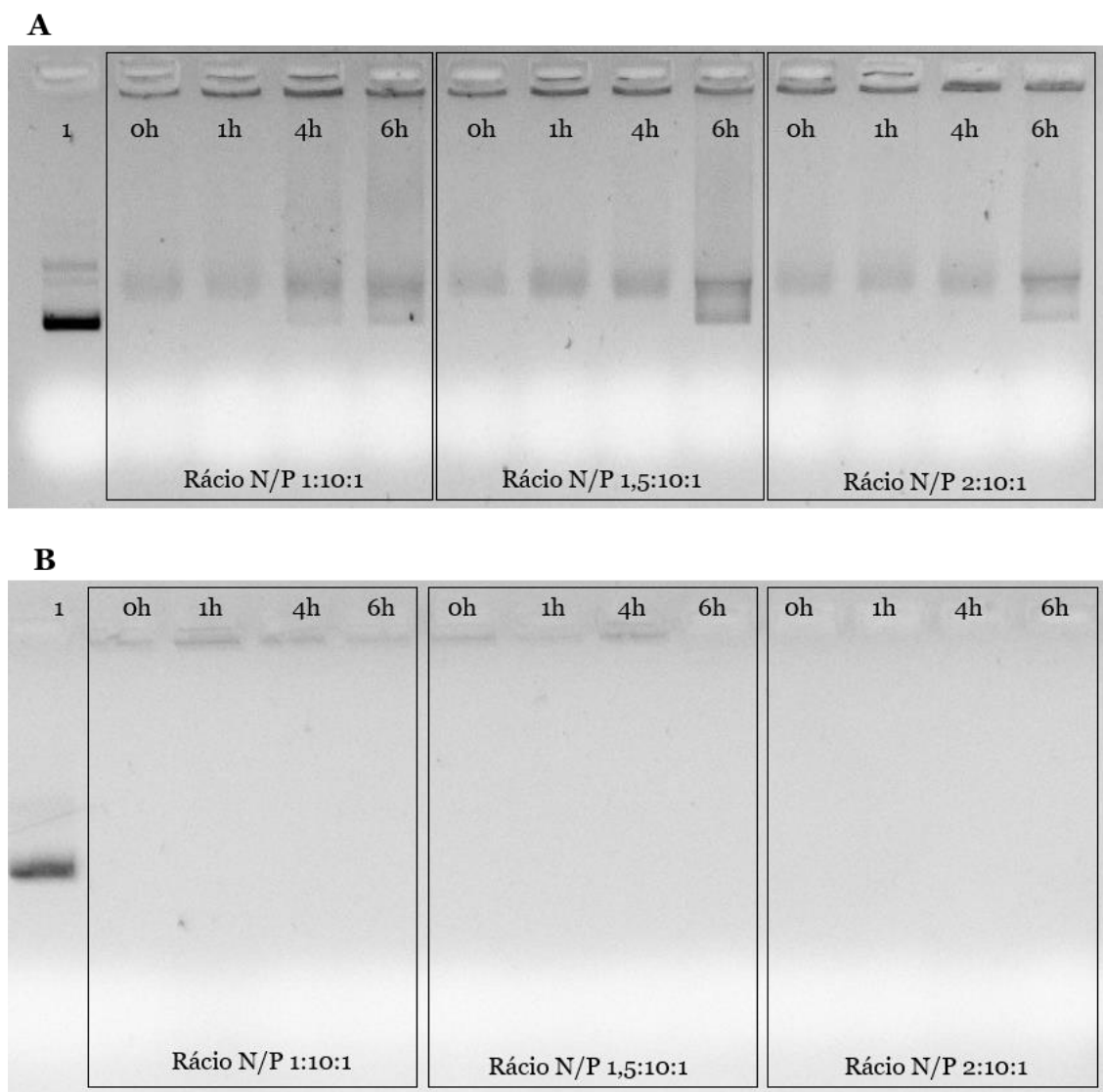


Figura 29: Eletroforese em gel de agarose para analisar a proteção do vetor de mcDNA após a sua incubação com DMEM + 10%FBS (A) e com tripsina (B). 1- Controle mcDNA. Sistemas formulados (R8-mannose/PEI/mcDNA-E7mut) mantendo o rácio 10 de PEI e apenas mudando o rácio de R8.

Os resultados apresentados na figura 28B e 29B revelam que, em ambos os rácios N/P do PEI (5 e de 10), os sistemas incubados com tripsina mostraram ser capazes de condensar eficientemente o mcDNA, já que não há evidência de descomplexação das nanopartículas. As nanopartículas são capazes de garantir a proteção do transgene, pelo menos por um período de 6 h de incubação. Os sistemas preparados em contacto com o meio DMEM (figura 28A e 29A) revelam resultados idênticos aos obtidos com tripsina, havendo, no entanto, sinais de uma degradação pouco relevante que se acentua após 6h de incubação, a um rácio N/P de PEI de 10. Os resultados provam que estes sistemas conseguem conferir maior estabilidade ao vetor do que os sistemas R8-mannose/mcDNA-E7mut.

4.4. Estudos de transfecção *in vitro*

4.4.1. Ensaios de Viabilidade Celular

A biocompatibilidade dos sistemas desenvolvidos foi avaliada através do ensaio com a resazurina. Foram realizados estudos de viabilidade celular nas células Raw 264.7 e nos fibroblastos às 24h e 48h, com diferentes rácios, a fim de verificar se os sistemas descritos induzem toxicidade celular. Os resultados dos ensaios encontram-se representados na figura 30.

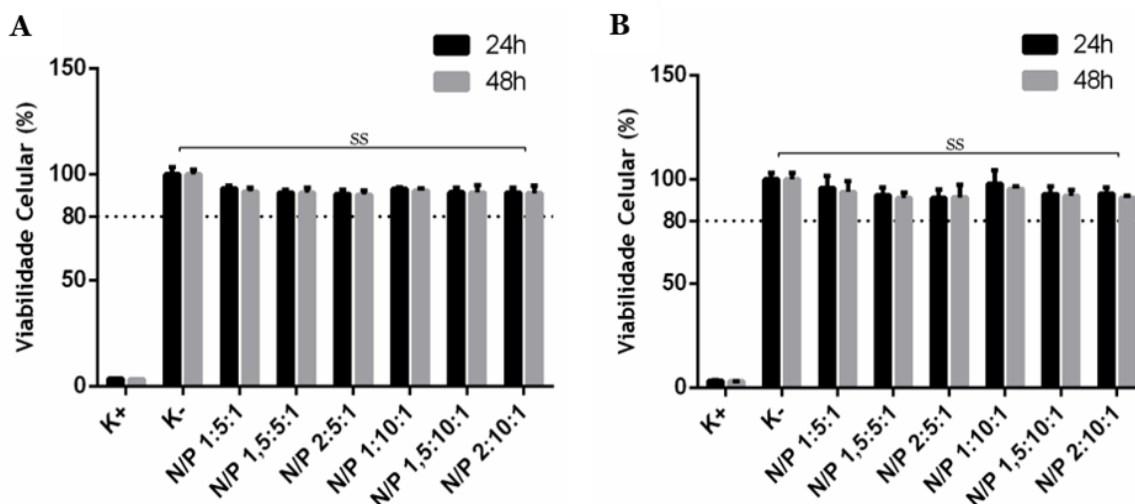


Figura 30: Viabilidade celular dos Fibroblastos (A) e das células Raw 264.7 (B), após 24 e 48 h de incubação com os sistemas de R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut de diferentes rácios N/P. A viabilidade é expressa em relação às células de controlo negativo. As células não transfectadas foram utilizadas como controlo negativo. Dados obtidos a partir de três medições independentes (média \pm D.P., $n = 3$). SS – sem significância.

A representação gráfica das percentagens de viabilidade celular, tanto para as células Raw 264.7 como para os fibroblastos, permite observar que nenhuma das nanopartículas induz citotoxicidade, uma vez que a viabilidade celular apresenta valores superiores a 80% sem alterações significativas, independentemente do período de transfecção e dos rácios N/P considerados.

Apesar dos polímeros PEI ramificados serem conhecidos por condensar o DNA de forma eficiente devido à maior densidade dos seus grupos amina primários, o efeito citotóxico associado a estas estruturas poliméricas deve ser tido em conta, especialmente com polímeros PEI de maior peso molecular (25 kDa), uma vez que pode causar danos na membrana celular e iniciar a apoptose. Como já foi referido em outros estudos, as propriedades dos polímeros são bastante influenciadas por parâmetros como peso molecular, arquitetura do polímero e rácio N/P, que podem influenciar a viabilidade celular. O rácio N/P parece ser um fator preponderante, uma vez que, de um modo geral, verifica-se que o aumento do rácio N/P conduz a uma diminuição da viabilidade celular. Quanto

maior for o rácio N/P usado na etapa de preparação dos sistemas, maior será a citotoxicidade do polímero PEI, possivelmente devido ao aumento das interações com a membrana celular. Porém, a utilização deste polímero continua a ser viável, quando são usados rácios N/P até 15. Para reduzir os efeitos tóxicos do PEI ramificado de 25 kDa, devem ser considerados rácios N/P mais baixos, evitando, desta forma, aumentar o conteúdo de grupos amina livres, que são responsáveis pela citotoxicidade [133]. Considerando que alguns estudos relatam que percentagens de viabilidade celular acima de 80% são considerados não citotóxicos [134], os resultados obtidos confirmam a biocompatibilidade dos sistemas baseados em PEI, provavelmente devido à presença do péptido R8-manose nas formulações.

4.4.2. Eficiência de transfeção

A captação e internalização celular dos sistemas PEI/mcDNA-E7mut e R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut em células Raw 264.7, após 3 h de transfeção, foi avaliada por microscopia confocal de fluorescência. As imagens são apresentadas na figura 31.

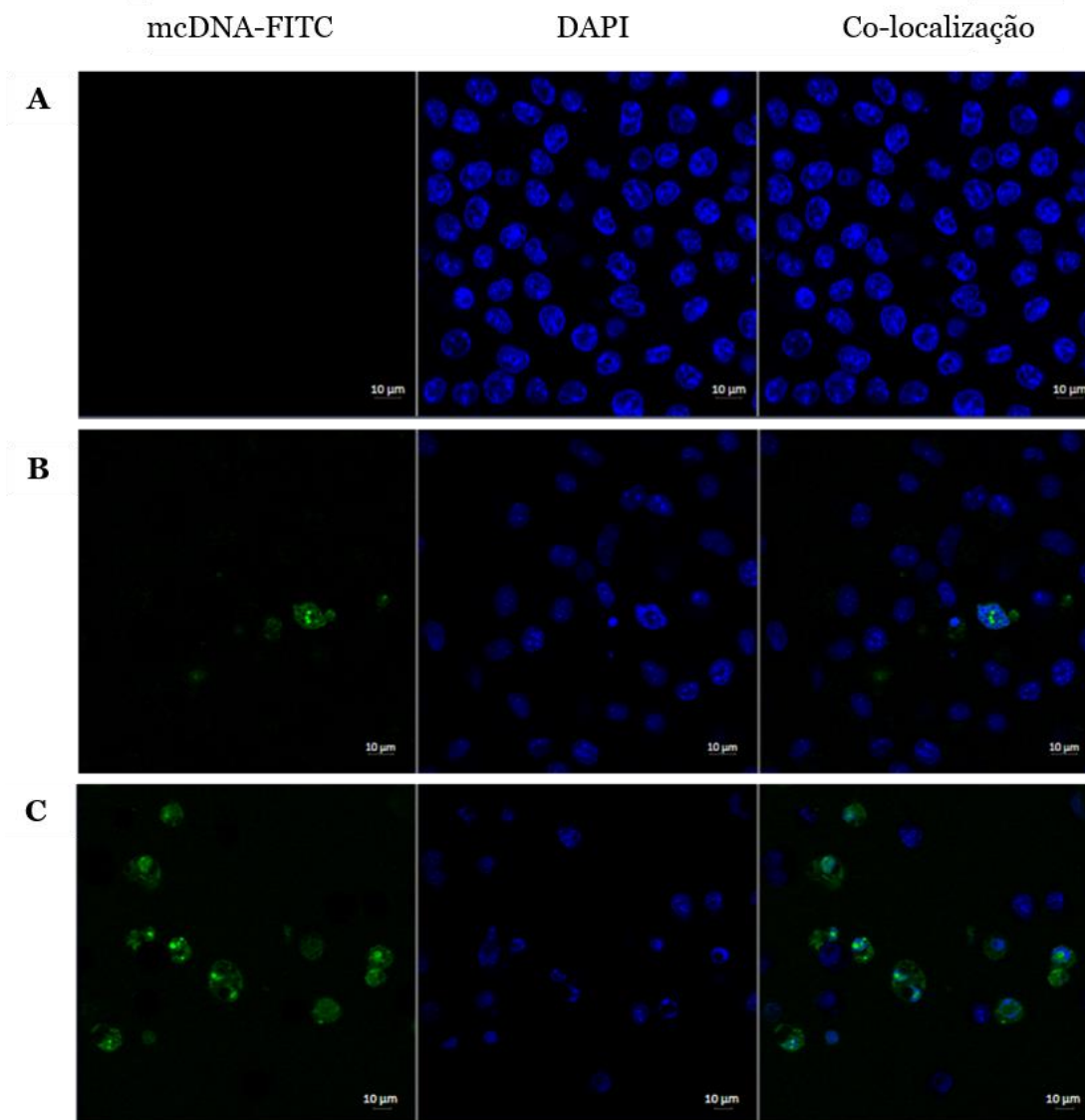


Figura 31: Avaliação da capacidade de transfeção dos sistemas PEI/mcDNA-E7mut (rácio N/P 5:1) e R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut (rácio N/P 2:5:1). Os núcleos foram corados com azul por DAPI e o verde representa o mcDNA marcado com FITC. (A) células Raw não transfetadas; (B) células Raw transfetadas com o sistema PEI/mcDNA-E7mut (rácio 5:1) após 3 horas; (C) células Raw transfetadas com o sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut (rácio 2:5:1) após 3 horas.

O núcleo foi marcado com DAPI, apresentando coloração azul, enquanto o verde representa o mcDNA marcado com FITC. A Figura 31A correspondente a células não transfectadas (controle) e não exibe sinais de fluorescência verde. De acordo com a figura 31B, que corresponde a sistemas binários de PEI/mcDNA-E7mut, na ausência de R8-manose, é visível que as formulações de mcDNA têm menor capacidade de ultrapassar a membrana celular e entrar no citoplasma das células. As células transfetadas com os sistemas ternários R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut evidenciam capacidade de superar as barreiras extracelulares e intracelulares, pois revelam a capacidade de penetrar na membrana celular, ser internalizado pela célula e localizar-se no núcleo. Uma vez dentro do núcleo, espera-se que proceda à transcrição e expressão do gene alvo. A entrada destes sistemas nas células

pode ser explicada pela presença de R8-manose, em especial o CPP R8 que tem sido descrito como responsável por melhorar de forma eficiente a entrada celular, internalização e acumulação da molécula alvo no núcleo [108, 135]. Este resultado pode ser comprovado pela análise da imagem C da figura 31.

4.4.3. RT-PCR

A transfecção celular mediada por sistemas PEI/mcDNA-E7mut foi monitorizada na ausência e presença de R8-manose para avaliar a sua influência na expressão do gene E7. Têm sido relatados resultados satisfatórios dos sistemas PEI/mcDNA quanto à captação e internalização nas células. As características exibidas por estes complexos são, contudo, fortemente dependentes do rácio N/P considerado. Um rácio N/P mais elevado leva a uma forte densidade de grupos amina de polímero que pode condensar com eficiência a molécula de mcDNA e formar sistemas de entrega com uma carga positiva mais elevada, favorecendo a interação com proteoglicanos carregados negativamente presentes na membrana celular e facilitando a sua entrada na célula [136].

Foi utilizada a técnica de RT-PCR para avaliar a eficiência da transcrição do gene E7 em sistemas PEI/mcDNA-E7mut e R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut. As células não transfectadas foram utilizadas como controlo e a amplificação dos transcritos E7 foi realizada utilizando primers específicos. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Os resultados encontram-se apresentados na figura 32.

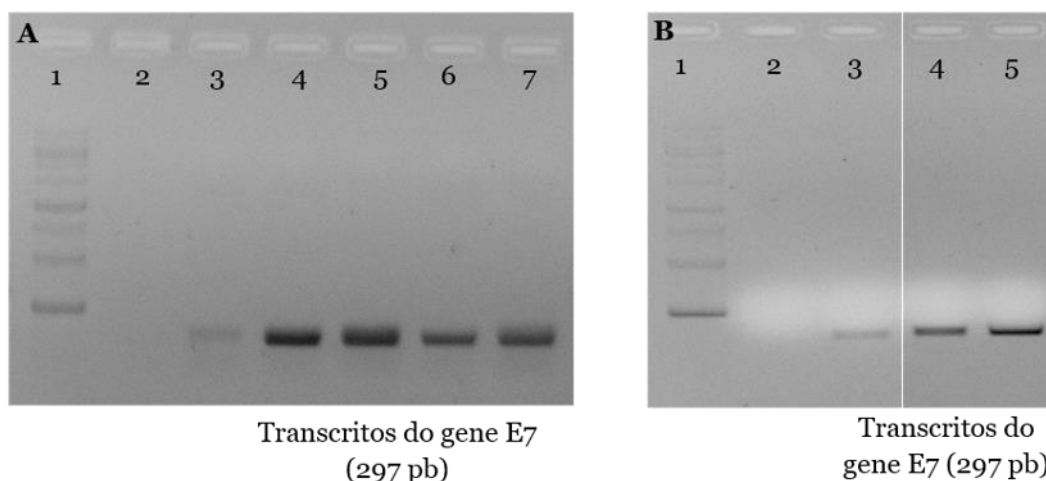


Figura 32: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. Avaliação dos transcritos de E7 após 24 horas de transfeção em células Raw (A) e em fibroblastos (B). 1 – Marcador de peso molecular; 2 - Controlo negativo (todos os reagentes da reação de PCR exceto a amostra); 3 - Células não transfectadas; 4 - Células transfectadas com o sistema PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 5:1; 5 - Células transfectadas com o sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:5:1; 6 - Células transfectadas com o sistema PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 10:1; 6 - Células transfectadas com o sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:10:1.

O gene E7mut parece ter sido adequadamente transcrito em ambas as linhagens celulares e em todos os sistemas, após 24h de transfecção (figura 32). Os sistemas formulados a um rácio N/P de PEI de 5 exibem bandas mais intensas do que a um rácio N/P de PEI de 10, o que pode corresponder a uma maior internalização celular. Quando comparamos os sistemas de rácio N/P de PEI de 5, a intensidade da banda dos transcritos para o sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut parece ser mais intensa que a banda correspondente às células que foram transfetadas com o sistema PEI/mcDNA-E7mut, sugerindo que a presença de manose e R8 tem influência na internalização dos sistemas, favorecendo os processos subsequentes de direcionamento ao núcleo e de expressão do gene de interesse. Curiosamente, ambos os sistemas, R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut e PEI/mcDNA-E7mut, parecem evidenciar o mesmo nível de transcritos a rácio N/P de PEI de 10. Estes resultados podem indicar que o rácio N/P de PEI de 10 reduz a proporção de R8-manose no sistema, diminuindo o seu efeito positivo no reconhecimento e internalização celular e afetando a transcrição do gene E7. Com base nestes dados, os sistemas PEI/mcDNA-E7mut de rácio N/P 5:1 e R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut de rácio N/P 2:5:1 foram selecionados para avaliar a influência do R8-manose nos fibroblastos, uma vez que foi possível constatar que o mecanismo de internalização nas células Raw 264.7 foi mais eficiente. Nos fibroblastos, também parece existir maior quantidade de transcritos do gene E7 nas células que foram transfetadas com os sistemas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut, o que sugere que o R8 influencia a internalização celular.

A técnica de RT-PCR permitiu verificar que os sistemas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut têm o efeito pretendido, o que conduzirá a um aumento da quantidade de mcDNA no interior das células. A transcrição do gene de interesse, que está presente no mcDNA, revela igualmente que os sistemas formulados protegem o mcDNA ao longo do processo de transfecção e chegada ao núcleo. Estes resultados parecem acompanhar os resultados de microscopia de confocal, isto é, os sistemas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut apresentam maior capacidade de transfecção, levando a uma maior quantidade de mcDNA no interior do núcleo das células e consequentemente maior transcrição do gene E7.

4.4.4. RT-qPCR

Tendo em conta que a avaliação da intensidade das bandas por RT-PCR foi, em alguns casos, pouco precisa, utilizou-se a técnica RT-qPCR para compreender ainda melhor as diferenças de transfecção dos diversos sistemas desenvolvidos, uma vez que se trata de um método que permite uma avaliação mais eficiente. Os resultados obtidos pelos sistemas desenvolvidos nos ensaios de transfecção encontram-se representados na figura 33.

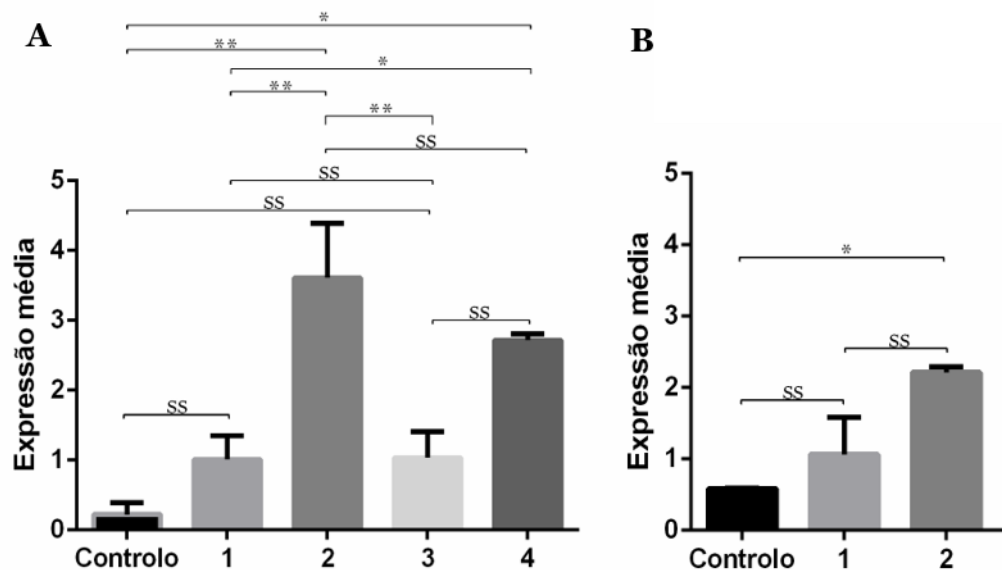


Figura 33: RT-qPCR dos níveis de expressão de E7 em células RAW 264.7 (A) e em fibroblastos (B). Controlo - células não transfectadas; 1 - PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 5:1; 2 - R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:5:1; 3 - PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 10:1; 4 - R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut rácio N/P 2:10:1. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ss - sem significância.

Conforme mostrado na Figura 33, há um aumento geral na expressão dos transcritos de E7 proveniente das células transfectadas com ambos os sistemas, em relação às células não transfectadas (controlo). Nas células Raw 264.7, podemos verificar que o nível de transcritos de E7 obtidos pelos sistemas ternários R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut é significativamente superior ao obtido pelos sistemas binários PEI/mcDNA-E7mut. Estes resultados estão em concordância com a tendência observada anteriormente por microscopia confocal de fluorescência (figura 31), sugerindo que a presença de R8-manose influencia a internalização dos sistemas e favorece os processos subsequentes de direcionamento ao núcleo e expressão do gene de interesse. Na realidade, a presença do péptido R8 tem mostrado resultados bastante satisfatórios em termos de captação pela membrana celular e localização no interior do núcleo [106, 137]. Em relação aos rácios N/P considerados, a expressão do gene E7 é maior em células transfectadas com os sistemas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut de rácio N/P 2:5:1, indicando que a utilização do rácio N/P de PEI de 10 pode reduzir a proporção de R8-manose incluída no sistema ternário, provavelmente devido à repulsão de carga, diminuindo o efeito positivo do conjugado R8-manose no reconhecimento e internalização celular, o que irá afetar a transcrição do gene E7.

Os sistemas PEI/mcDNA-E7mut de rácio N/P 5:1 e R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut de rácio N/P 2:5:1 foram selecionados para avaliar a influência do conjugado R8-manose nos fibroblastos, devido ao potencial evidenciado relativamente às células Raw 264,7 (figura 33B). Os resultados obtidos seguem a mesma tendência das células Raw 264,7, uma vez que

os sistemas ternários apresentam níveis de transcritos do gene E7 mais elevados do que os sistemas binários, sugerindo, mais uma vez, uma influência positiva do R8 na captação celular e na localização no núcleo [105, 108]. No entanto, comparando a transcrição do gene E7 obtida pelo sistema ternário R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut em ambas as linhagens celulares, podemos verificar que o nível de transcritos de E7 é mais elevado nas células Raw 264,7 do que nos fibroblastos. Estes resultados estão provavelmente relacionados com o efeito cumulativo dos ligandos de manose, capazes de melhorar a internalização do sistema por meio do reconhecimento de recetores de manose nas células Raw 264.7.

É bem conhecido que as células Raw 264.7 que expressam recetores moderados de manose constituem uma oportunidade adequada e valiosa na investigação da eficiência de transfecção de sistemas manosilados [135, 138]. Alguns estudos têm relatado sistemas manosilados com uma eficiência de transfecção melhorada, cujos resultados confirmam a sua eficácia na transcrição e expressão génica nas células Raw 264.7 [138]. Mais uma vez, os resultados sugerem que a presença de manose e R8 podem desempenhar um papel crucial ao influenciarem a internalização celular dos sistemas, preferencialmente por APCs, como os macrófagos. Foi possível concluir, através dos ensaios de transfecção realizados, que os sistemas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut apresentam maior capacidade de transfecção, levando a uma maior quantidade de mcDNA no interior do núcleo das células e maior transcrição do gene E7, sendo por isso de interesse para a conceção e desenvolvimento de novos sistemas de entrega não virais no campo das vacinas baseada em DNA.

Capítulo 5 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Embora a probabilidade de cura do cancro do colo do útero seja cada vez maior, este representa ainda um importante problema de saúde pública devido às elevadas taxas de prevalência de infeções por HPV e de mortalidade. A investigação constante, numa área de intervenção tão importante como o cancro do colo do útero é, inquestionavelmente, necessária. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos alternativos de prevenção e tratamento tem vindo a ser explorado no campo da vacinação, nomeadamente no que se refere à investigação de vacinas terapêuticas contra o HPV. As vacinas de DNA têm assumido particular importância pela capacidade de gerar uma resposta imune celular e humoral, a partir da utilização de sequências de material genético do agente patogénico que se pretende combater. O principal desafio associado às vacinas de DNA para aplicação clínica em humanos são as barreiras biológicas extra e intracelulares para a entrega de genes, que obstruem a estimulação de respostas imunes específicas do antígeno e, em última análise, levam a uma reduzida eficácia terapêutica.

No presente trabalho foram desenvolvidos novos sistemas de entrega com o objetivo de adicionar uma contribuição significativa ao campo de vacinas de DNA, tendo como objetivo a prevenção e/ou o tratamento do cancro do colo do útero. Os sistemas binários R8-manose/mcDNA-E7mut e ternários R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut foram desenvolvidos a vários rácios N/P e as suas propriedades físico-químicas avaliadas. Os sistemas apresentaram um conjunto de propriedades quanto à morfologia, tamanho e carga superficial que os torna adequados como veículos de entrega, nomeadamente elevada encapsulação de mcDNA, tamanhos reduzidos, morfologia esférica e carga superficial positiva. Nos estudos de estabilidade, o sistema R8-manose/mcDNA-E7mut, quando incubado com tripsina ou com meio DMEM+soro, não é capaz de proteger o gene terapêutico, o que inviabiliza a sua utilização em futuros estudos *in vitro*. Por outro lado, o sistema R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut, quando incubado com tripsina ou com meio DMEM, foi capaz de condensar eficientemente o mcDNA, uma vez que não houve evidências de descomplexação das nanopartículas. Além disso, a adição de PEI ao sistema R8-manose/mcDNA-E7mut não só reduziu consideravelmente o tamanho das nanopartículas, como também aumentou o potencial zeta. Os sistemas também se revelaram biocompatíveis, tendo a taxa de viabilidade celular apresentado valores superiores a 80%, independentemente do período de transfeção e dos rácios N/P considerados. Por fim, e no que se refere à expressão do gene E7, a transfeção mediada pelos sistemas PEI/mcDNA-E7mut foi monitorizada na ausência e presença de R8-manose com o objetivo de melhor avaliar a sua influência no reconhecimento e internalização da célula alvo e consequente

acesso ao núcleo e expressão do gene de interesse. Foi possível comprovar, através dos ensaios de transfeção realizados, que os sistemas R8-manose/PEI/mcDNA-E7mut apresentam maior capacidade de transfeção, levando a uma maior quantidade de mcDNA no interior do núcleo das células e maior transcrição do gene E7, sendo por isso de interesse para o desenvolvimento de novos sistemas de entrega não virais no campo das vacinas baseadas em DNA.

Apesar dos resultados obtidos neste trabalho serem bastante satisfatórios e constituírem um importante contributo para a evolução e sucesso das vacinas de DNA contra o cancro do colo do útero, será necessário aprofundar a investigação. De forma complementar, e a fim de melhor avaliar a imunidade humoral e celular contra um antígeno específico, seria interessante verificar se as nanopartículas desenvolvidas, quando reconhecidas por outros recetores de reconhecimento de patógenos da família das lectinas do tipo C, poderiam estimular a resposta imune e, assim, servir como adjuvantes de vacinas contra o cancro do colo do útero.

Os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para a continuidade deste projeto, sugerindo-se estudos *in vivo* que avaliem especificamente a ativação do sistema imune, primeiramente em animais com indução prévia de tumor com células infetadas por HPV para posteriormente verificar o efeito terapêutico, ou seja, se há regressão ou persistência/progressão da lesão tumoral. O objetivo será avaliar a resposta imune celular e humoral gerada por esta possível vacina de DNA. Talvez a grande dificuldade para se obter imunidade efetiva contra o HPV seja exatamente pela capacidade deste vírus evadir a vigilância imunológica, retardando a ativação da resposta imune, associado à grande variedade e diversidade dos tipos de HPV.

A biotecnologia tem contribuído de forma decisiva para o aperfeiçoamento de processos relacionados com o desenvolvimento e produção de novas vacinas seguras e eficazes. Os avanços verificados na descoberta de novos antígenos, adjuvantes, vetores ou sistemas de entrega são alguns exemplos reportados na literatura publicada. As vacinas terapêuticas, embora representem um enorme desafio, estão cada vez mais próximas da realidade e, certamente, terão um impacto enorme no tratamento de diversas doenças, como o cancro.

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

1. Crosbie, E.J., Einstein, M.H., Franceschi, S., and Kitchener, H.C. (2013). *Human papillomavirus and cervical cancer*. *The Lancet*. 382(9895): 889-899.
2. Sudhakar, A. (2009). *History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods*. *Journal of Cancer Science & Therapy*. 1(2): 1-4.
3. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Pineros, M., Znaor, A., and Bray, F. (2019). *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. *International Journal of Cancer*. 144(8): 1941-1953.
4. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 68(6): 394-424.
5. Arbyn, M., Weiderpass, E., Bruni, L., de Sanjosé, S., Saraiya, M., Ferlay, J., and Bray, F. (2020). *Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis*. *The Lancet Global Health*. 8(2): e191-e203.
6. Almeida, A.M., Queiroz, J.A., Sousa, F., and Sousa, A. (2019). *Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins*. *Drug Discovery Today*. 24(10): 2044-2057.
7. Pal, A. and Kundu, R. (2020). *Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy*. *Frontiers in Microbiology*. 10.
8. Graham, S.V. (2010). *Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies*. *Future Microbiology*. 5(10): 1493-1506.
9. De Sanjose, S., Brotons, M., and Pavon, M.A. (2018). *The natural history of human papillomavirus infection*. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 47: 2-13.
10. Castellsagué, X. (2008). *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer*. *Gynecologic Oncology*. 110(3): S4-S7.
11. Chan, C.K., Aimagambetova, G., Ukybassova, T., Kongrtay, K., and Azizan, A. (2019). *Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology*,

- Screening, and Vaccination-Review of Current Perspectives.* Journal of Oncology. 2019: 1-11.
12. Burley, M., Roberts, S., and Parish, J.L. (2020). *Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle.* Seminars in Immunopathology. 42: 159–171.
 13. D'Abramo, C.M. and Archambault, J. (2011). *Small molecule inhibitors of human papillomavirus protein - protein interactions.* The Open Virology Journal. 5: 80-95.
 14. Doorbar, J. (2005). *The papillomavirus life cycle.* Journal of Clinical Virology. 32: 7-15.
 15. Best, S.R., Niparko, K.J., and Pai, S.I. (2012). *Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers.* Otolaryngologic Clinics of North America. 45(4): 807-822.
 16. Lee, S.J., Yang, A., Wu, T.C., and Hung, C.F. (2016). *Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research.* Journal of gynecologic oncology. 27(5): 1-17.
 17. Saxena, S.K., Kumar, S., Goel, M., and Brahma Bhatt, M. (2018). *Recent Advances in Human Papillomavirus Infection and Management.* Current Perspectives in Human Papillomavirus.
 18. Araldi, R.P., Sant'Ana, T.A., Modolo, D.G., de Melo, T.C., Spadacci-Morena, D.D., de Cassia Stocco, R., Cerutti, J.M., and de Souza, E.B. (2018). *The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview.* Biomedicine & Pharmacotherapy. 106: 1537-1556.
 19. Ghittoni, R., Accardi, R., Hasan, U., Gheit, T., Sylla, B., and Tommasino, M. (2010). *The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses.* Virus Genes. 40(1): 1-13.
 20. Souza, G.d.C.S., Silva, E.R.d., Macêdo, F.L.d.S., Soares, L.R.C., Rosal, V.M.d.S., and Rocha, M.G.d.L. (2015). *Papilomavírus humano: biologia viral e carcinogênese.* FEMINA. 43(4): 189-192.
 21. Viariso, D., Gissmann, L., and Tommasino, M. (2017). *Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models.* Current Opinion in Virology. 26: 56-62.

22. Small, W., Bacon, M.A., Bajaj, A., Chuang, L.T., Fisher, B.J., Harkenrider, M.M., Jhingran, A., Kitchener, H.C., Mileskin, L.R., Viswanathan, A.N., and Gaffney, D.K. (2017). *Cervical cancer: A global health crisis*. *Cancer*. 123(13): 2404-2412.
23. Bogani, G., Leone Roberti Maggiore, U., Signorelli, M., Martinelli, F., Ditto, A., Sabatucci, I., Mosca, L., Lorusso, D., and Raspagliesi, F. (2018). *The role of human papillomavirus vaccines in cervical cancer: Prevention and treatment*. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*. 122: 92-97.
24. Lin, K., Doolan, K., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2010). *Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines*. *Journal of the Formosan Medical Association*. 109(1): 4-24.
25. Clark, K.T. and Trimble, C.L. (2020). *Current status of therapeutic HPV vaccines*. *Gynecologic Oncology*. 156(2): 503-510.
26. Wang, R., Pan, W., Jin, L., Huang, W., Li, Y., Wu, D., Gao, C., Ma, D., and Liao, S. (2020). *Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: Opportunity and challenge*. *Cancer Letters*. 471: 88-102.
27. Apostólico, J.d.S., Lunardelli, V.A.S., Coirada, F.C., Boscardin, S.B., and Rosa, D.S. (2016). *Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing*. *Journal of Immunology Research*. 2016: 1-16.
28. Hearnden, C. and Lavelle, E. (2013). *Adjuvant Strategies for Vaccines: The Use of Adjuvants within the Cancer Vaccine Setting*. *Cancer Immunotherapy (Second Edition)*: 333-349.
29. Harden, M.E. and Munger, K. (2017). *Human papillomavirus molecular biology*. *Mutation research. Reviews in mutation research*. 772: 3-12.
30. Peralta-Zaragoza, O., Bermúdez-Morales, V.H., Pérez-Plasencia, C., Salazar-León, J., Gómez-Cerón, C., and Madrid-Marina, V. (2012). *Targeted treatments for cervical cancer: a review*. *OncoTargets and therapy*. 5: 315-328.
31. Sung, Y.K. and Kim, S.W. (2019). *Recent advances in the development of gene delivery systems*. *Biomaterials Research*. 23: 1-7.
32. Ibraheem, D., Elaissari, A., and Fessi, H. (2014). *Gene therapy and DNA delivery systems*. *International Journal of Pharmaceutics*. 459(1-2): 70-83.
33. Wirth, T., Parker, N., and Ylä-Herttuala, S. (2013). *History of gene therapy*. *Gene*. 525(2): 162-169.

34. Sousa, A., Almeida, A.M., Faria, R., Konate, K., Boisguerin, P., Queiroz, J.A., and Costa, D. (2019). *Optimization of peptide-plasmid DNA vectors formulation for gene delivery in cancer therapy exploring design of experiments*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 183: 1-7.
35. Lin, K., Roosinovich, E., Ma, B., Hung, C.F., and Wu, T.C. (2010). *Therapeutic HPV DNA vaccines*. Immunologic Research. 47(1-3): 86-112.
36. Hung, C.-F., Monie, A., Alvarez, R.D., and Wu, T.C. (2007). *DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside*. Experimental & molecular medicine. 39(6): 679-689.
37. Henken, F.E., Oosterhuis, K., Öhlschläger, P., Bosch, L., Hooijberg, E., Haanen, J.B.A.G., and Steenbergen, R.D.M. (2012). *Preclinical safety evaluation of DNA vaccines encoding modified HPV16 E6 and E7*. Vaccine. 30(28): 4259-4266.
38. Foged, C., Sundblad, A., and Hovgaard, L. (2002). *Targeting vaccines to dendritic cells*. Pharmaceutical Research. 19(3): 229-238.
39. Saade, F. and Petrovsky, N. (2012). *Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines*. Expert Review of Vaccines. 11(2): 189-209.
40. Khan, K.H. (2013). *DNA vaccines: roles against diseases*. Germs. 3(1): 26-35.
41. Yang, B., Jeang, J., Yang, A., Wu, T.C., and Hung, C.F. (2014). *DNA vaccine for cancer immunotherapy*. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 10(11): 3153-3164.
42. Lopes, A., Vandermeulen, G., and Pr eat, V. (2019). *Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 38(1): 1-24.
43. Cao, J., Jin, Y., Li, W., Zhang, B., He, Y., Liu, H., Xia, N., Wei, H., and Yan, J. (2013). *DNA vaccines targeting the encoded antigens to dendritic cells induce potent antitumor immunity in mice*. BMC Immunology. 14: 1-14.
44. Cole, G., Ali, A.A., McCrudden, C.M., McBride, J.W., McCaffrey, J., Robson, T., Kett, V.L., Dunne, N.J., Donnelly, R.F., and McCarthy, H.O. (2018). *DNA vaccination for cervical cancer: Strategic optimisation of RALA mediated gene delivery from a biodegradable microneedle system*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 127: 288-297.

45. Jefford, M., Maraskovsky, E., Cebon, J., and Davis, I.D. (2001). *The use of dendritic cells in cancer therapy*. *The Lancet Oncology*. 2(6): 343-353.
46. Loré, K. (2004). *Isolation and Immunophenotyping of Human and Rhesus Macaque Dendritic Cells*. *Methods in Cell Biology*. 75: 623-642.
47. Macri, C., Dumont, C., Johnston, A.P., and Mintern, J.D. (2016). *Targeting dendritic cells: a promising strategy to improve vaccine effectiveness*. *Clinical & Translational Immunology*. 5(3): e66.
48. Kutzler, M.A. and Weiner, D.B. (2004). *Developing DNA vaccines that call to dendritic cells*. *The Journal of clinical investigation*. 114(9): 1241-1244.
49. Ghanem, A., Healey, R., and Adly, F.G. (2013). *Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review*. *Analytica Chimica Acta*. 760: 1-15.
50. Gaspar, V., de Melo-Diogo, D., Costa, E., Moreira, A., Queiroz, J., Pichon, C., Correia, I., and Sousa, F. (2015). *Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications*. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 15(3): 353-379.
51. Abdulrahman, A. and Ghanem, A. (2018). *Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review*. *Analytica Chimica Acta*. 1025: 41-57.
52. Ferreira, G.N.M., Monteiro, G.A., Prazeres, D.M.F., and Cabral, J.M.S. (2000). *Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications*. *Trends Biotechnology*. 18(9): 380-388.
53. Prather, K.J., Sagar, S., Murphy, J., and Chartrain, M. (2003). *Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification*. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(7): 865-883.
54. Schmeer, M., Buchholz, T., and Schleef, M. (2017). *Plasmid DNA Manufacturing for Indirect and Direct Clinical Applications*. *Human Gene Therapy*. 28(10): 856-861.
55. Tejeda-Mansir, A. and Montesinos, R.M. (2008). *Upstream processing of plasmid DNA for vaccine and gene therapy applications*. *Recent Patents Biotechnology*. 2(3): 156-172.
56. Sousa, F., Prazeres, D.M.F., and Queiroz, J.A. (2008). *Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA*. *Trends in Biotechnology*. 26(9): 518-525.

57. Sousa, Â., Sousa, F., and Queiroz, J.A. (2012). *Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification*. *Journal of Separation Science*. 35(22): 3046-3058.
58. Sousa, F., Passarinha, L., and Queiroz, J.A. (2009). *Biomedical application of plasmid DNA in gene therapy: A new challenge for chromatography*. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 26(1): 83-116.
59. Diogo, M.M., Queiroz, J.A., and Prazeres, D.M.F. (2005). *Chromatography of plasmid DNA*. *Journal of Chromatography A*. 1069(1): 3-22.
60. Gaspar, V.M., Maia, C.J., Queiroz, J.A., Pichon, C., Correia, I.J., and Sousa, F. (2014). *Improved minicircle DNA biosynthesis for gene therapy applications*. *Human Gene Therapy Methods*. 25(2): 93-105.
61. Mayrhofer, P., Schleef, M., and Jechlinger, W. (2009). *Use of minicircle plasmids for gene therapy*. *Methods in Molecular Biology*. 542: 87-104.
62. Gaspar, V.M., Cruz, C., Queiroz, J.A., Pichon, C., Correia, I.J., and Sousa, F. (2013). *Sensitive Detection of Peptide-Minicircle DNA Interactions by Surface Plasmon Resonance*. *Analytical chemistry*. 85(4): 2304-2311.
63. Chen, Z.Y., He, C.Y., and Kay, M.A. (2005). *Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo*. *Human Gene Therapy*. 16(1): 126-131.
64. Nafissi, N. and Slavcev, R. (2014). *Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(7): 2841-2851.
65. Almeida, A.M., Queiroz, J.A., Sousa, F., and Sousa, Â. (2019). *Minicircle DNA purification: Performance of chromatographic monoliths bearing lysine and cadaverine ligands*. *Journal of Chromatography B*. 1118-1119: 7-16.
66. Almeida, A.M., Eusébio, D., Queiroz, J.A., Sousa, F., and Sousa, Â. (2020). *The use of size-exclusion chromatography in the isolation of supercoiled minicircle DNA from Escherichia coli lysate*. *Journal of Chromatography A*. 1609.
67. Diamantino, T., Pereira, P., Queiroz, J.A., Sousa, Â., and Sousa, F. (2016). *Minicircle DNA purification using a CIM(R) DEAE-1 monolithic support*. *Journal of Separation Science*. 39(18): 3544-3549.

68. Luo, D. and Saltzman, W.M. (2000). *Synthetic DNA delivery systems*. Nature Biotechnology. 18(1): 33-37.
69. Nguyen, D.N., Green, J.J., Chan, J.M., Langer, R., and Anderson, D.G. (2009). *Polymeric Materials for Gene Delivery and DNA Vaccination*. Advanced Materials 21(8): 847-867.
70. Kamimura, K., Suda, T., Zhang, G., and Liu, D. (2011). *Advances in Gene Delivery Systems*. Pharmaceut Medicine. 25(5): 293-306.
71. Chira, S., Jackson, C.S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M.S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L.-Z., Calin, G.A., and Berindan-Neagoe, I. (2015). *Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors*. Oncotarget. 6(31): 30675-30703.
72. Nayerossadat, N., Maedeh, T., and Ali, P.A. (2012). *Viral and nonviral delivery systems for gene delivery*. Advanced biomedical research. 1(2): 1-11.
73. Yin, H., Kanasty, R.L., Eltoukhy, A.A., Vegas, A.J., Dorkin, J.R., and Anderson, D.G. (2014). *Non-viral vectors for gene-based therapy*. Nature Reviews Genetics. 15(8): 541-555.
74. Pettitt, D., Smith, J., Fuerstenau-Sharp, M., Bure, K., Holländer, G., Predki, P., Slade, A., Jones, P., Mitrophanous, K., and Brindley, D.A. (2016). *Emerging platform bioprocesses for viral vectors and gene therapies*. BioProcess International. 14: 8-17.
75. Chamcheu, J.C., Adhami, V., Siddiqui, I., and Mukhtar, H. (2015). *Cutaneous Cell- and Gene-Based Therapies for Inherited and Acquired Skin Disorders*. Gene and Cell Therapy: Therapeutic Mechanisms and Strategies. 1091-1122.
76. Hatefi, A. and Canine, B.F. (2009). *Perspectives in vector development for systemic cancer gene therapy*. Gene Therapy & Molecular Biology. 13(A): 15-19.
77. Manjila, S.B., Baby, J.N., Bijin, E.N., Constantine, I., Pramod, K., and Valsalakumari, J. (2013). *Novel gene delivery systems*. International Journal of Pharmaceutical Investigation. 3(1): 1-7.
78. Goodwin, T. and Huang, L. (2014). *Nonviral vectors: we have come a long way*. Advances in Genetics. 88: 1-12.
79. Dizaj, S.M., Jafari, S., and Khosroushahi, A.Y. (2014). *A sight on the current nanoparticle-based gene delivery vectors*. Nanoscale Research Letters. 9(1): 1-9.

80. Ditto, A.J., Shah, P.N., and Yun, Y.H. (2009). *Non-viral gene delivery using nanoparticles*. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 6(11): 1149-1160.
81. Ruseska, I. and Zimmer, A. (2020). *Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides*. *Beilstein journal of nanotechnology*. 11: 101-123.
82. Akhter, S., Ahmad, M.Z., Ahmad, F.J., Storm, G., and Kok, R.J. (2012). *Gold nanoparticles in theranostic oncology: current state-of-the-art*. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 9(10): 1225-1243.
83. Singh, K.P., Panwar, P., Kohli, P., and Sanjesh. (2011). *Liposome-mesoporous silica nanoparticles fused cores: a safer mode of drug carrier*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 7(1): 60-62.
84. Xiang, L., Bin, W., Huali, J., Wei, J., Jiesheng, T., Feng, G., and Ying, L. (2007). *Bacterial magnetic particles (BMPs)-PEI as a novel and efficient non-viral gene delivery system*. *The Journal of Gene Medicine*. 9(8): 679-690.
85. Lim, M., Badruddoza, A.Z.M., Firdous, J., Azad, M., Mannan, A., Al-Hilal, T.A., Cho, C.S., and Islam, M.A. (2020). *Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies*. *Pharmaceutics*. 12(1): 1-29.
86. Xiao, Y., Shi, K., Qu, Y., Chu, B., and Qian, Z. (2019). *Engineering Nanoparticles for Targeted Delivery of Nucleic Acid Therapeutics in Tumor*. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 12: 1-18.
87. Li, L., Wei, Y., and Gong, C. (2015). *Polymeric Nanocarriers for Non-Viral Gene Delivery*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 11(5): 739-770.
88. Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., and He, N. (2014). *Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers*. *Theranostics*. 4(3): 240-255.
89. Nam, J.P. and Nah, J.W. (2016). *Target gene delivery from targeting ligand conjugated chitosan-PEI copolymer for cancer therapy*. *Carbohydrate Polymers*. 135: 153-161.
90. Medina-Alarcon, K.P., Voltan, A.R., Fonseca-Santos, B., Moro, I.J., de Oliveira Souza, F., Chorilli, M., Soares, C.P., Dos Santos, A.G., Mendes-Giannini, M.J.S., and Fusco-Almeida, A.M. (2017). *Highlights in nanocarriers for the treatment against cervical cancer*. *Materials Science and Engineering: C*. 80: 748-759.

91. Caffery, B., Lee, J.S., and Alexander-Bryant, A.A. (2019). *Vectors for Glioblastoma Gene Therapy: Viral & Non-Viral Delivery Strategies*. *Nanomaterials (Basel)*. 9(1): 1-16.
92. Simeoni, F., Morris, M.C., Heitz, F., and Divita, G. (2003). *Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells*. *Nucleic Acids Research*. 31(11): 2717-2724.
93. Miyamoto, T., Tsuchiya, K., and Numata, K. (2020). *Dual Peptide-Based Gene Delivery System for the Efficient Transfection of Plant Callus Cells*. *Biomacromolecules*. 21(7): 2735-2744.
94. Parhiz, H., Shier, W.T., and Ramezani, M. (2013). *From rationally designed polymeric and peptidic systems to sophisticated gene delivery nano-vectors*. *International Journal of Pharmaceutics*. 457(1): 237-259.
95. Gigante, A., Li, M., Junghanel, S., Hirschhauser, C., Knauer, S., and Schmuck, C. (2019). *Non-viral transfection vectors: are hybrid materials the way forward?* *Medchemcomm*. 10(10): 1692-1718.
96. Zhang, I. and Zhang, L. (2010). *Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis, characterization and applications*. *Nano LIFE*. 01: 163-173.
97. Pahle, J. and Walther, W. (2016). *Vectors and strategies for nonviral cancer gene therapy*. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 16(4): 443-461.
98. Lehto, T., Kurrikoff, K., and Langel, Ü. (2012). *Cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids*. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 9(7): 823-836.
99. Neves, A.R., Sousa, A., Faria, R., Albuquerque, T., Queiroz, J.A., and Costa, D. (2020). *Cancer gene therapy mediated by RALA/plasmid DNA vectors: Nitrogen to phosphate groups ratio (N/P) as a tool for tunable transfection efficiency and apoptosis*. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 185: 1-9.
100. Váňová, J., Hejtmánková, A., Kalbáčová, M.H., and Španielová, H. (2019). *The Utilization of Cell-Penetrating Peptides in the Intracellular Delivery of Viral Nanoparticles*. *Materials (Basel)*. 12(17): 1-22.
101. Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D. (2017). *Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics*. *Trends in Pharmacological Sciences*. 38(4): 406-424.

102. Koshkaryev, A., Piroyan, A., and Torchilin, V.P. (2013). *Bleomycin in octaarginine-modified fusogenic liposomes results in improved tumor growth inhibition*. *Cancer Letters*. 334(2): 293-301.
103. Futaki, S., Ohashi, W., Suzuki, T., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Harashima, H., and Sugiura, Y. (2001). *Stearylated arginine-rich peptides: a new class of transfection systems*. *Bioconjugate Chemistry*. 12(6): 1005-1011.
104. Futaki, S. (2002). *Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms*. *International Journal of Pharmaceutics*. 245(1-2): 1-7.
105. Futaki, S. (2005). *Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57(4): 547-558.
106. Zhang, X., Wang, H., Coulter, J.A., and Yang, R. (2018). *Octaarginine-modified gold nanoparticles enhance the radiosensitivity of human colorectal cancer cell line LS180 to megavoltage radiation*. *International Journal of Nanomedicine*. 13: 3541-3552.
107. Melikov, K. and Chernomordik, L.V. (2005). *Arginine-rich cell penetrating peptides: from endosomal uptake to nuclear delivery*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(23): 2739-2749.
108. Biswas, S., Dodwadkar, N.S., Deshpande, P.P., Parab, S., and Torchilin, V.P. (2013). *Surface functionalization of doxorubicin-loaded liposomes with octa-arginine for enhanced anticancer activity*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 84(3): 517-525.
109. Mishra, N., Pant, P., Porwal, A., Jaiswal, J., Samad, M., and Tiwari, S. (2016). *Targeted Drug Delivery: A Review*. *American Journal Of PharmTech Research*. 6(1).
110. Daftarian, P., Serafini, P., Perez, V., and Lemmon, V. (2014). *APC-Targeted (DNA) Vaccine Delivery Platforms: Nanoparticle Aided*. *Molecular Vaccines*. 753-766.
111. Irache, J.M., Salman, H.H., Gamazo, C., and Espuelas, S. (2008). *Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics*. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 5(6): 703-724.
112. Apostolopoulos, V., Thalhammer, T., Tzakos, A.G., and Stojanovska, L. (2013). *Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development*. *Journal of Advanced Drug Delivery*. 2013: 1-22.

113. Hossain, M.K. and Wall, K.A. (2019). *Use of Dendritic Cell Receptors as Targets for Enhancing Anti-Cancer Immune Responses*. *Cancers* 11(3): 1-17.
114. Tang, C.K., Sheng, K.C., Apostolopoulos, V., and Pietersz, G.A. (2008). *Protein/peptide and DNA vaccine delivery by targeting C-type lectin receptors*. *Expert Review of Vaccines*. 7(7): 1005-1018.
115. Phanse, Y., Carrillo-Conde, B.R., Ramer-Tait, A.E., Roychoudhury, R., Broderick, S., Pohl, N., Rajan, K., Narasimhan, B., Wannemuehler, M.J., and Bellaire, B.H. (2017). *Functionalization promotes pathogen-mimicking characteristics of polyanhydride nanoparticle adjuvants*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 105(10): 2762-2771.
116. Kay, M.A., He, C.-Y., and Chen, Z.-Y. (2010). *A robust system for production of minicircle DNA vectors*. *Nature Biotechnology*. 28(12): 1287-1289.
117. Costa, D., Albuquerque, T., Queiroz, J.A., and Valente, A.J.M. (2019). *A co-delivery platform based on plasmid DNA peptide-surfactant complexes: formation, characterization and release behavior*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 178: 430-438.
118. Mady, M., Awad, W., El-Guendy, N., and Elsayed, A. (2011). *Interaction of DNA and Polyethylenimine: FTIR and DSC Studies*. *International journal of physical sciences*. 6(32): 7328-7334.
119. Imani, R., Hojjati Emami, S., and Faghihi, S. (2015). *Synthesis and Characterization of Octaarginine Functionalized Graphene Oxide Nano-carrier for Gene Delivery Applications*. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 17(9): 6328-6339.
120. Wang, X., Sun, Q., Cui, C., Li, J., and Wang, Y. (2018). *Anti-HER2 functionalized graphene oxide as survivin-siRNA delivery carrier inhibits breast carcinoma growth in vitro and in vivo*. *Drug Design, Development and Therapy*. 12: 2841-2855.
121. Costa, A., Sarmiento, B., and Seabra, V. (2018). *Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 114: 103-113.
122. Horak, D., Babic, M., Jendelová, P., Herynek, V., Trchová, M., Pientka, Z., Pollert, E., Hájek, M., and Syková, E. (2007). *D-mannose-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling*. *Bioconjugate Chemistry*. 18(3): 635-644.

123. Gaspar, V.M., Sousa, F., Queiroz, J.A., and Correia, I.J. (2011). *Formulation of chitosan-TPP-pDNA nanocapsules for gene therapy applications*. *Nanotechnology*. 22(1): 1-12.
124. Chithrani, B.D. and Chan, W.C.W. (2007). *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. *Nano Letters*. 7(6): 1542-1550.
125. Marcucci, F. and Lefoulon, F. (2004). *Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress*. *Drug Discovery Today*. 9(5): 219-228.
126. Prabha, S., Arya, G., Chandra, R., Ahmed, B., and Nimesh, S. (2016). *Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 44(1): 83-91.
127. Silva, J.M., Vandermeulen, G., Oliveira, V.G., Pinto, S.N., Rodrigues, C., Salgado, A., Afonso, C.A., Viana, A.S., Jérôme, C., Silva, L.C., Graca, L., Pr eat, V., and Florindo, H.F. (2014). *Development of functionalized nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells: a mechanistic approach*. *Nanomedicine* 9(17): 2639-2656.
128. Choosakoonkriang, S., Lobo, B.A., Koe, G.S., Koe, J.G., and Middaugh, C.R. (2003). *Biophysical characterization of PEI/DNA complexes*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 92(8): 1710-1722.
129. Ibrahim, A., El-Lat, M., and Selim, M. (2016). *Effect of Polyethyleneimine Stabilizer on Size and Morphology of Gold Nanoparticles*. *Asian Journal of Applied Sciences*. 9(4): 178-184.
130. Bayramođlu, G. and Yakup Arica, M. (2008). *Adsorption of Cr(VI) onto PEI Immobilized Acrylate-Based Magnetic Beads: Isotherms, Kinetics and Thermodynamics Study*. *Chemical Engineering Journal*. 139(1): 20-28.
131. Liu, S. and Guo, T. (2015). *Polycation-Based Ternary Gene Delivery System*. *Current Drug Metabolism*. 16(2): 152-165.
132. Song, L., Liang, X., Yang, S., Wang, N., He, T., Wang, Y., Zhang, L., Wu, Q., and Gong, C. (2018). *Novel polyethyleneimine-R8-heparin nanogel for high-efficiency gene delivery in vitro and in vivo*. *Drug Delivery*. 25(1): 122-131.
133. Costa, D., Valente, A.J.M., Queiroz, J.A., and Sousa,  . (2018). *Finding the ideal polyethylenimine-plasmid DNA system for co-delivery of payloads in cancer therapy*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 170: 627-636.

134. López-García, J., Lehocný, M., Humpolíček, P., and Sába, P. (2014). *HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation*. *Journal of Functional Biomaterials*. 5(2): 43-57.
135. Conriot, J., Scomparin, A., Peres, C., Yeini, E., Pozzi, S., Matos, A.I., Kleiner, R., Moura, L.I.F., Zupančič, E., Viana, A.S., Doron, H., Gois, P.M.P., Erez, N., Jung, S., Satchi-Fainaro, R., and Florindo, H.F. (2019). *Immunization with mannosylated nanovaccines and inhibition of the immune-suppressing microenvironment sensitizes melanoma to immune checkpoint modulators*. *Nature Nanotechnology*. 14(9): 891-901.
136. Salatin, S., Maleki Dizaj, S., and Yari Khosroushahi, A. (2015). *Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles*. *Cell Biology International*. 39(8): 881-890.
137. Bhatt, H., Ghosh, B., and Biswas, S. (2020). *Cell-Penetrating Peptide and α -Tocopherol-Conjugated Poly(amidoamine) Dendrimers for Improved Delivery and Anticancer Activity of Loaded Paclitaxel*. *ACS Applied Bio Materials*. 3(5): 3157-3169.
138. Shilakari Asthana, G., Asthana, A., Kohli, D.V., and Vyas, S.P. (2014). *Mannosylated Chitosan Nanoparticles for Delivery of Antisense Oligonucleotides for Macrophage Targeting*. *BioMed Research International*. 2014: 1-17.

Formulation of R8-based nanosystems to delivery a minicircle DNA vaccine to dendritic cells

Ana Sofia Serra*, Dalinda Eusébio, Ana Raquel Neves, Diana Costa, Ângela Sousa

CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal
*Email: anasofiamms@gmail.com

Introduction

Cervical cancer is the most relevant disease associated with HPV infection and a major cause of death in women.

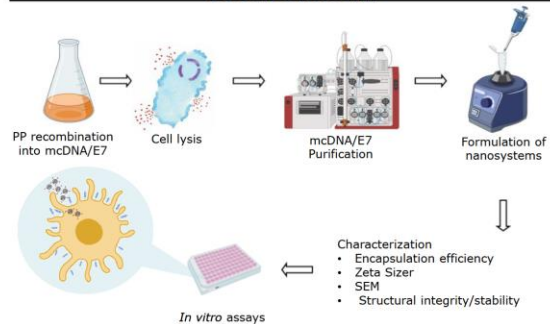
DNA vaccines have emerged as an effective strategy for the treatment of cervical cancer, associated to HPV infection, due to the ability of generating a cellular and humoral immune response.

The minicircle DNA (mcDNA) vector has been considered a promising technology because it does not contain bacterial genes due to an *in vivo* site-specific recombination process, in which a parental plasmid (PP) leads to the formation of a mini-plasmid (mP) and mcDNA.

Cell-penetrating peptides (CPPs) have shown to be able to enter cells non-invasively. Several arginine-rich peptides have been used successfully in the delivery of proteins, oligonucleotides, plasmid DNA and even spheres and liposomes, with the octa-arginine (R8) peptide showing high internalization and localization efficiency in the nucleus.

Therefore, the present work aims to develop a delivery system, based on R8 peptide functionalized with mannose ligands, to specifically deliver the mcDNA encoding HPV E7 antigen to dendritic cells.

Methodology



Results

Nanoparticles characterization

R8-mannose/mcDNA nanosystems

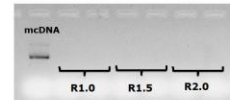


Fig. 1: R8-Mannose/mcDNA complexation behavior at various N/P ratios investigated by agarose gel electrophoresis.

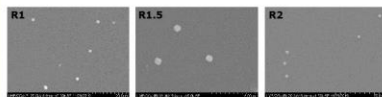


Fig. 2: Scanning electron micrographs (SEM) images of R8-Mannose/mcDNA nanoparticles at different N/P ratios.

N/P ratio	Size (nm)	Zeta Potencial (mV)
1	432.44 ± 0.96	-0.67 ± 0.74
1.5	410.33 ± 0.74	+1.78 ± 0.31
2	365.78 ± 0.94	+6.11 ± 0.63

Table 1: Mean size and average zeta potential for complexes R8-Mannose/mcDNA formulated at several N/P ratios.

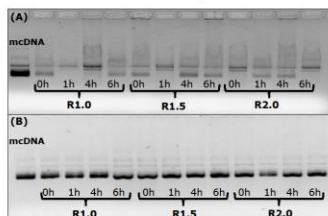


Fig. 3: Electrophoretic analysis of the vector's protection of mcDNA with the systems of Table 1 at different incubation times with (A) DMEM supplemented with 10% FBS; (B) trypsin.

✓ Spherical/oval morphology	✗ Low encapsulation protection
✓ Size < 500 nm	✗ Potencial Zeta

Nanoparticles characterization

R8-mannose/polyethylenimine (PEI)/mcDNA nanosystems

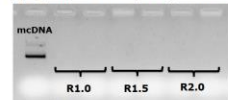


Fig. 4: R8-Mannose/PEI/mcDNA complexation behavior at various N/P ratios investigated by agarose gel electrophoresis.

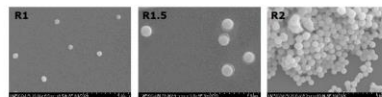


Fig. 5: Scanning electron micrographs (SEM) images of R8-mannose/PEI/mcDNA nanoparticles at different N/P ratio for R8/mcDNA and maintaining the PEI at R10.

N/P ratio	Size (nm)	Zeta Potencial (mV)
R8-PEI (rácio 1/10)	281.7 ± 1.40	+11.44 ± 0.79
R8-PEI (rácio 1.5/10)	270.00 ± 0.74	+13.22 ± 0.90
R8-PEI (rácio 2/10)	234.56 ± 0.96	+14.67 ± 0.59

Table 2: Mean size and average zeta potential for complexes R8-Mannose/PEI/mcDNA formulated at several N/P ratios.

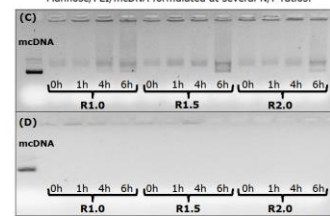


Fig. 6: Electrophoretic analysis of the vector's protection of mcDNA with the systems of Table 2 at different incubation times with (C) DMEM supplemented with 10% FBS; (D) trypsin.

✓ Spherical/oval morphology	✓ Potencial Zeta
✓ Size < 500nm	✓ Good encapsulation protection

Cell viability

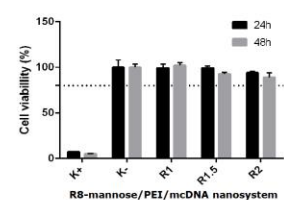


Fig. 7: Cell viability on raw 264.7 after transfection with R8-mannose/PEI/mcDNA nanosystems - resazurin method.

Good cell viability after transfection

Conclusions


Both nanosystems, R8-mannose/mcDNA and R8-mannose/PEI/mcDNA, demonstrated the ability to efficiently encapsulate mcDNA. However, the last one revealed to be more stable, being the most suitable for the following *in vitro* assays in order to confirm intracellular localization and the specifically targeting to dendritic cells.

Acknowledgments

This work was supported by FEDER funds through the POCI - COMPETE 2020 - Operational Programme Competitiveness and Internationalization in Axis I - Strengthening research, technological development and innovation (Project POCI-01-0145-FEDER-007491) and National Funds by FCT - Foundation for Science and Technology (Project UID/Multi/00709/2019). D. Eusébio and A. Neves acknowledge the Ph.D. Incentive Grants from Banco Santander Totta/UBI (BID/FCS/2019).

Article

Synthesis and Characterization of Mannosylated Formulations to Deliver a Minicircle DNA Vaccine

Ana Sofia Serra ¹, Dalinda Eusébio ¹, Ana Raquel Neves ¹, Tânia Albuquerque ¹, Himanshu Bhatt ², Swati Biswas ² , Diana Costa ^{1,*} and Ângela Sousa ^{1,*}

- ¹ CICS-UBI—Health Sciences Research Centre, Universidade da Beira Interior, Avenida Infante D. Henrique, 6200-906 Covilhã, Portugal; anasofiamms@gmail.com (A.S.S.); dalinda-21@hotmail.com (D.E.); ana_raquel_bastos_neves@hotmail.com (A.R.N.); t_albuquerque@live.com.pt (T.A.)
- ² Department of Pharmacy, Nanomedicine Research Laboratory, Birla Institute of Technology & Science—Pilani, Hyderabad Campus, Jawahar Nagar, Medchal, Hyderabad, Telangana 500078, India; bhattrx@yahoo.com (H.B.); swati.biswas@hyderabad.bits-pilani.ac.in (S.B.)
- * Correspondence: dcosta@fcsaude.ubi.pt (D.C.); angela@fcsaude.ubi.pt (Â.S.);
Tel.: +351-275-329-002 (D.C. & Â.S.)

Abstract: DNA vaccines still represent an emergent area of research, giving rise to continuous progress towards several biomedicine demands. The formulation of delivery systems to specifically target mannose receptors, which are overexpressed on antigen presenting cells (APCs), is considered a suitable strategy to improve the DNA vaccine immunogenicity. The present study developed binary and ternary carriers, based on polyethylenimine (PEI), octa-arginine peptide (R8), and mannose ligands, to specifically deliver a minicircle DNA (mcDNA) vaccine to APCs. Systems were prepared at various nitrogen to phosphate group (N/P) ratios and characterized in terms of their morphology, size, surface charge, and complexation capacity. In vitro studies were conducted to assess the biocompatibility, cell internalization ability, and gene expression of formulated carriers. The high charge density and condensing capacity of both PEI and R8 enhance the interaction with the mcDNA, leading to the formation of smaller particles. The addition of PEI polymer to the R8-mannose/mcDNA binary system reduces the size and increases the zeta potential and system stability. Confocal microscopy studies confirmed intracellular localization of targeting systems, resulting in sustained mcDNA uptake. Furthermore, the efficiency of in vitro transfection can be influenced by the presence of R8-mannose, with great implications for gene expression. R8-mannose/PEI/mcDNA ternary systems can be considered valuable tools to instigate further research, aiming for advances in the DNA vaccine field.

Keywords: HPV infection; mannose ligands; minicircle DNA vaccine; polyethyleneimine; R8 peptide



Citation: Serra, A.S.; Eusébio, D.; Neves, A.R.; Albuquerque, T.; Bhatt, H.; Biswas, S.; Costa, D.; Sousa, Â. Synthesis and Characterization of Mannosylated Formulations to Deliver a Minicircle DNA Vaccine. *Pharmaceutics* 2021, 13, 673. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050673>

Academic Editor: Satoshi Uchida

Received: 7 April 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 7 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is a disease that continues to proliferate worldwide and is a major cause of mortality, however the probability of finding a cure is increasing. Cervical cancer is the most relevant disease associated with human papillomavirus (HPV) infection, especially when it is not detected early, evolving to invasive forms [1]. The overexpression of HPV E6 and E7 oncoproteins interferes with cell cycle regulation and proliferation through the impairment of p53 and pRb tumor suppressor proteins, respectively [2]. Although prophylactic HPV vaccination is currently the best strategy for preventing cervical cancer, this type of vaccine induces only humoral immunity (producing neutralizing antibodies) to prevent future infections, however it is not effective in treating pre-existing infections. To fill this gap, several types of therapeutic vaccines against HPV are being studied [3]. In this context, DNA vaccines have particular importance due to their ability to generate cellular and humoral immune responses, based on the use of genetic material sequences from the pathogen that is intended to be fought [4]. Among the different DNA vaccines,