

Copolímeros POEOMA-*b*-PDPA para complexação de pDNA

Natasha Gomes de Miranda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

(2º ciclo de estudos)

Junho de 2022



Copolímeros POEOMA-*b*-PDPA para complexação de pDNA

Natasha Gomes de Miranda



Copolímeros POEOMA-*b*-PDPA para complexação de pDNA

Natasha Gomes de Miranda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Fani Pereira de Sousa

Co-orientador: Doutora Sandra Cristina da Silva Bernardo

Junho de 2022

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”

(Paulo Beleki)

Agradecimentos

A elaboração e desenvolvimento dessa dissertação contou com dificuldades pelo caminho, desde seu início até o término, mas no fim a persistência e determinação venceu e foi possível realizar todo o trabalho que foi imposto. Gostaria de começar por agradecer a minha orientadora: Professora Doutora Fani Pereira de Sousa pela oportunidade, disponibilidade, paciência e conhecimentos transmitidos ao longo desta viagem, e acima de tudo por ter me aceitado em sua equipa e me auxiliado durante todo o projeto.

Quero agradecer a minha co-orientadora Sandra Bernardo que me acompanhou também da melhor forma, seja na vertente teórica ou na transmissão de conhecimento das práticas laboratoriais, estando sempre disponível para ajudar.

E não podia deixar de mencionar e agradecer ao Bruno Baptista, meu colega de equipa laboratorial que me acompanhou ao longo de todo o processo pratico e teórico, tendo prestado uma ajuda e auxílio sem qualquer obrigação para comigo.

Queria mencionar também toda a equipa laboratorial do CICS, que trabalham junto da professora Fani, sendo eles Pedro, Micaela, Ana e Rita, que me receberam bem e estavam disponíveis para me ajudar sempre que necessário.

Tenho de declarar um grande apoio e agradecimento a equipe do Professor Jorge Coelho, assim como a Doutora Patrícia Mendonça pela preparação e disponibilização dos polímeros utilizados na pesquisa juntamente com a colaboração no projeto realizado.

E tenho de agradecer de forma mais que especial a minha mãe Susie Onofre Miranda e ao meu pai Adilson Gomes de Miranda, que me apoiaram, enxugaram minhas lagrimas, fizeram o possível e o impossível para eu estar onde estou hoje, para ser quem sou hoje, só eu sei o qual difícil é ficar tanto tempo longe da sua casa, da sua cultura, de seus costumes e principalmente longe de meus pais, das diversas noites em que eu dormi chorando de saudades sem mesmo se dar conta, de achar que não seria capaz, que quanto mais lutava parecia que não era suficiente, mas mesmo com um oceano de distancia deles, eles sempre estavam presentes nas dezenas de ligações de vídeos desde de o dia que cheguei em Portugal, no momento de exaustão, de solidão, de saudade, de datas comemorativas, de problemas, posso descrever inúmeros momentos, mas só posso dizer uma coisa, que eles estavam lá comigo e sempre estarão, não dá para medir em palavras o qual grande é meu amor por essas pessoas maravilhosas que tenho a oportunidade de ter e chamar de pais, as pessoas mais fantásticas e amorosas e incríveis que existem. Não posso deixar de mencionar a minha adorável irmã mais nova Thalita Gomes de Miranda,

que não se encontra mais comigo nesse mundo dos vivos, mas que sei que esteja onde estiver está torcendo e orgulhosa da irmã mais velha que ficou por aqui, mas que sabe que ela sempre estará presente em meus pensamentos e coração que não é capaz de esquecê-la nunca.

Tenho de agradecer também as minhas grandes amigas Vitória Rondon, Lídia Dedoni e Pamella Ama, que foram pessoas incríveis, que me apoiaram sempre e me incentivaram a continuar, nas inúmeras mensagens que mandamos umas para as outras durante todo esse período longe do Brasil, mas que nunca me esqueceram, nem por um minuto sequer, que é o significado da palavra amigas pois é aquelas que torcem e vibram pelas suas conquistas e te aconselham não tem outra palavra para dizer que não muito obrigada, por me tirarem da solidão diversas vezes.

Tenho de agradecer também a Universidade da Beira Interior e ao CICS-UBI, que me recebeu de braços abertos durante todo o meu processo de crescimento profissional e acadêmico, e hoje consigo ver o quanto de conhecimento profissional e pessoal adquiri durante todo o meu mestrado aqui em Portugal e na UBI.

Resumo

A terapia génica tem tido um interesse crescente em estudos científicos devido às suas potencialidades no tratamento de doenças, como o cancro, infeções e particularmente doenças genéticas. A eficácia da terapia génica está dependente do desenvolvimento de sistemas de transporte e entrega de material genético, devendo estes promover uma entrega do material genético de forma eficiente e segura. Já foram estudados diferentes tipos de vetores, tanto virais como não virais, sendo sugerido que os vetores não virais são muito mais seguros, devido as suas diversas características, como a versatilidade, grande capacidade de empacotamento, capacidade de funcionalização química e baixa imunogenicidade. No conjunto de vetores não virais, as bases poliméricas se destacam como uns dos mais promissores.

Portanto ao longo desse projeto foi proposto avaliar a utilização de polímeros sensíveis ao pH, que possam proteger e encapsular DNA plasmídico (pDNA) de uma maneira simples e eficaz, para futuramente serem usados em diversas aplicações terapêuticas. Destacam-se neste projeto os diblocos de copolímeros POEOMA-*b*-PDPA, que possuem uma responsividade ao pH, devido à incorporação do PDPA, que permite também a interação eletrostática desses copolímeros com os ácidos nucleicos em pH ácido, como resultado da protonação dos grupos amina terciária deste polímero em valores de pH abaixo de seu pKa (cerca de 6,2).

Esses copolímeros foram utilizados em diversos ensaios visando a caracterização física e química das nanopartículas preparadas, consistindo na avaliação da carga superficial (potencial zeta), morfologia das nanopartículas formuladas em diferentes valores de pH, caracterizada por Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV), e a proteção do pDNA, na presença de DNaseI e meio DMEM. A viabilidade celular foi igualmente determinada por MTS, para verificar a segurança dessas nanopartículas. Os resultados baseados no copolímero POEOMA-*b*-PDPA, mostram que estes copolímeros têm uma boa capacidade de proteção do pDNA, um potencial zeta positivo e um tamanho que pode permitir que as nanopartículas se mantenham em circulação por bastante tempo, sem a presença de citotoxicidade. Globalmente, os resultados indicam um potencial interessante desses copolímeros para aplicações biomédicas. Assim, os resultados demonstram que foi possível desenvolver um método simples, eficiente e prático para a entrega de pDNA.

Palavras-chaves:

Terapia génica; POEOMA-*b*-PDPA; DNA plasmídeo; copolímeros; encapsulamento.

Abstract

Gene therapy has had a growing interest in scientific studies due to its potential in the treatment of diseases such as cancer, infections, and specifically for genetic diseases. The effectiveness of gene therapy is linked to the development of delivery systems for the protection and transport of genetic material, which should promote a competent and safe delivery to target cells. Different types of vectors, both viral and non-viral, have already been studied, being recognized that non-viral vectors are much safer, due to their various characteristics, such as versatility, large packaging capacity, chemical functionalization capacity, and low immunogenicity. In the set of non-viral vectors, the polymeric materials stand out as one of the most promising.

Therefore, throughout this project, it was proposed to evaluate pH-responsive polymers, which can protect and encapsulate plasmid DNA in a simple and effective way, to be used in future therapeutic applications. In this project the diblock copolymers POEOMA-*b*-PDPA, which have a PDPA responsiveness to pH, have been used. The PDPA content is also responsible for the electrostatic interaction of these copolymers with nucleic acids at acidic pH, as a result of the protonation of the tertiary amine groups of this polymer at pH values below its pKa (around 6.2).

These copolymers were used through experiments aiming at the physical and chemical characterization of the studied nanoparticles, consisting of the evaluation of the surface charge (zeta potential), the morphology of the nanoparticles, formulated at different pH values, characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), and pDNA protection, in the presence of DNaseI and DMEM medium. Cell viability was also determined by MTS, to verify the safety profile of these nanoparticles. The results based on the POEOMA-*b*-PDPA copolymer, show that these copolymers promote a good pDNA protection capacity, present a positive zeta potential and a size that can allow the nanoparticles to remain in circulation for a long time, without the presence of cytotoxicity. Overall, this suggests the potential of these copolymers to be used in biomedical applications. Thus, the results demonstrate that it was possible to develop a simple, efficient, and practical method for pDNA delivery.

Keywords:

Gene therapy; POEOMA-*b*-PDPA; plasmid DNA; copolymers; encapsulation

Índice

CAPÍTULO 1	1
1. Introdução.....	3
1.1 Terapia génica.....	3
1.2 DNA plasmídico.....	3
1.3 Sistemas de entrega	5
1.3.1 Vetores virais	5
1.3.2 Vetores não virais	7
1.4 Sistemas poliméricos	10
1.5 Copolímeros.....	12
1.5.1 Poli (oligo (óxido de etileno) metil éter) metacrilato-bloco-poli (2- diisopropilamino metacrilato de etilo) (POEOMA- <i>b</i> -PDPA)	13
CAPÍTULO 2.....	17
2. Objetivos	18
CAPÍTULO 3.....	20
3. Materiais e métodos	22
3.1. Materiais	22
3.2. Métodos	22
3.2.1. Crescimento de <i>E. coli</i> e produção de DNA plasmídeo	22
3.2.2. Extração de DNA de plasmídeo	23
3.2.3. Preparação de complexos de DNA-copolímero de plasmídeo.....	24
3.2.4. Ensaio em gel de agarose.....	24
3.2.5. Eficiência de encapsulação	24
3.2.6 Microscopia eletrónica de varrimento (MEV)	25
3.2.7 . Medições do potencial Zeta/Size	25
3.2.8. Libertação de DNA plasmídico	25
3.2.9. Proteção de pDNA	26
3.2.10. Viabilidade celular	26
CAPÍTULO 4.....	28

4. Resultados e Discussão	30
4.1. Eficiência de encapsulação	30
4.2. MEV (Microscopia Eletrônica de Varrimento).....	31
4.3. Avaliação do potencial Zeta e Tamanho dos políplexos	34
4.4. Libertação de pDNA	36
4.5. Proteção de pDNA complexado nos políplexos	37
4.6. Viabilidade celular	39
CAPÍTULO 5.....	43
5. Conclusão e perspectivas futuras.....	45
CAPÍTULO 6.....	48
6. Referências bibliográficas	50

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo da organização estrutural dos diferentes tipos de copolímeros (a) Alternado, (b) Aleatório, (c) Em blocos e (d) Grafitizado ou enxertado.	12
Figura 2 - Estrutura química do copolímero de bloco POEOMA- <i>b</i> -PDPA.	14
Figura 3 - Resultados de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) no polímero POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇ – A: concentração 0,5 mg/mL; B: concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução acetato (pH:4,5). C: concentração 0,5 mg/mL; D: concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução Fosfato (pH:7,4). As ampliações apresentadas foram escolhidas com base na melhor observação possível das imagens.	32
Figura 4 - Resultados de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) no polímero POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄ – E: concentração: 0,5 mg/mL; F concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução acetato (pH:4,5). G: concentração 0,5 mg/mL; H: concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução Fosfato (pH:7,4). As ampliações apresentadas foram escolhidas com base na melhor observação possível das imagens.	32
Figura 5 – Estudos de proteção de pDNA. A: gel com C: controlo pDNA em água milliQ; C1: pDNA em incubação a 37°C, 30 min; C2:pDNA em incubação a 37°C, 4 horas; D1 – D4: controlo pDNA em contacto com DNase a 37°C, por 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas, respetivamente. PD1- PD4: pDNA complexado com POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄ 0,5 mg/mL em incubação com Dnase por 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas. B: gel com M1 – M4: controlo de pDNA incubado em DMEM a 37°C, durante 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas. PM1 – PM4: pDNA complexado com POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄ 0,5 mg/mL em meio DMEM incubado a 37°C durante 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas.....	38
Figura 6 – Viabilidade celular (MTS em 48 horas). Células não tratadas (C-) e células tratadas com etanol (C+) foram usadas como controlos negativo e positivo, respetivamente. A percentagem de viabilidade é expressa em relação às células de controlo. Os valores foram calculados com os dados obtidos em três medidas independentes (média ± DP, n = 3). A análise estatística foi realizada usando “One-way ANOVA”. (ns = p > 0,05; **** p ≤ 0,0001).....	40

Lista de tabelas

Tabela 1 - Diferentes tipos de vetores virais, vantagens e desvantagens associadas.	6
Tabela 2 - Vantagens, desvantagens e descrição dos métodos químicos para complexação/encapsulação de DNA	8
Tabela 3 - Vantagens, desvantagens e descrição dos métodos físicos para entrega de DNA	9
Tabela 4 - Taxa de libertação do pDNA complexado nos polímeros POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇ e POEOMA ₂₈ - <i>i</i> -PDPA ₇₄ , nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL em pH 4,5 e pH 7,4, após 0h e 30 minutos de incubação, para ambos os polímeros e concentrações.	36

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Eficiência de encapsulação (%) do pDNA pelos polímeros POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇ (a vermelho) e POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄ (a azul), estudados nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,05 mg/mL em tampão acetato pH: 4,5.....	30
Gráfico 2 - Eficiência de encapsulação (%) do pDNA pelos polímeros POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇ (a vermelho) e POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄ (a azul), estudados nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,05 mg/mL em tampão fosfato pH: 7,4	31
Gráfico 3 – Resultados do potencial Zeta (A) e distribuição de tamanhos (B) para os polímeros POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇ e POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄ em pH 4,5 e 7,4.	34

Lista de acrónimos

pDNA	DNA plasmídico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
POEOMA- <i>b</i> -PDPA	Poli (oligo (óxido de etileno) metil éter) metacrilato-bloco-poli (2-diisopropilamino metacrilato de etilo))
RDRP	Polimerização radicalar de desativação reversível
PEG	Polietilenoglicol
RAFT	Agentes de transferência de fragmentação de adição reversível
OEOMA	Oligo (óxido de etileno) metacrilatos de éter metílico
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
E.E	Eficiência de encapsulação
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
PEI	polietilenimina
SARA	Ativador suplementar e agente redutor
ATRP	Polimerização radicalar por transferência de átomos
PMPC	Poli(2-metacrilóiloxietilfosforilcolina)
PEG- <i>b</i> - PDMAEMA	poli (etileno glicol) -bloco-poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]
PDMAEMA	poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]
P β AE	poli (β -amino éster)
UV	Ultravioleta

CAPÍTULO 1

1. Introdução

1.1 Terapia génica

George Mendel foi um monge austríaco que confirmou a existência de características herdadas entre indivíduos. Desde então, diversas descobertas provaram que as funções dos organismos são mantidas e reguladas por intermédio da expressão de genes. A mais proeminente dessas descobertas está relacionada com as doenças genéticas, ou seja, doenças relacionadas com erros genéticos. Posteriormente, surgiu a terapia génica, uma vez que foi estabelecida a ideia de se usar esses genes como agentes ou alvos terapêuticos. Surgindo então o conceito de terapia génica como uma ideia revolucionária na medicina moderna [1].

A terapia génica tem potencial para tratar doenças crónicas e genéticas (como imunodeficiência combinada grave, fibrose cística, doença de Parkinson), por isso tem atraído atenção nos campos da medicina, farmácia, biologia e biotecnologia. Na verdade, a investigação em terapia génica tem vindo a ser centrada principalmente na pesquisa do cancro, correspondendo a cerca de 65% dos ensaios clínicos de terapia génica global [2,3].

O conceito de terapia génica pode ser definido como a transferência de material genético para células individuais para conferir benefícios terapêuticos. O princípio da terapia génica é baseado no raciocínio de que um ou mais genes têm defeitos ou mutações. Esse erro genético resulta na produção descontrolada ou inibição de proteínas necessárias para o funcionamento normal da célula [4].

Graças aos avanços da genética e da bioengenharia, a terapia génica tem vindo a tornar-se uma realidade possível. Geralmente, existem dois métodos para este tipo de tratamento: *in vivo* ou *ex vivo*, dependendo se a entrega do gene é feita diretamente ao doente ou entregue às células recolhidas do doente e reimplantadas [4,5]. O sistema de entrega ideal (chamado de vetor) deverá possuir algumas características desejáveis, destacando-se a adaptação do gene de interesse de tamanho ilimitado, baixa imunogenicidade e reduzida citotoxicidade [6].

1.2 DNA plasmídico

O DNA plasmídico é uma molécula de DNA circular, de cadeia dupla, com origem bacteriana e que se replica na célula hospedeira. Tem sido explorado em aplicações terapêuticas, por ser seguro, de baixa toxicidade e fácil de produzir, apresentando tamanhos entre 1 e 1.000 kpb. O seu esqueleto hidrofílico é composto por um grupo fosfato e um açúcar, já no seu interior apresenta bases azotadas e propriedades

hidrofóbicas. A molécula pode existir em três conformações diferentes: a isoforma linear, circular aberta (oc) ou superenrolada (sc), sendo esta última a que apresenta maior significado terapêutico porque é o mais eficaz em termos de expressão do gene de interesse [7,8].

Os plasmídeos são amplamente utilizados como vetores não virais devido à sua capacidade de integrar DNA exógeno e replicar das células alvo, por esse motivo, tem sido amplamente explorado na terapia do DNA por apresentar uma série de vantagens, nomeadamente por ser produzido por cultura bacteriana, o que facilita o controlo da produção e reduz custos, por ser seguro, pouco imunogénico e permitir a inserção de DNA com um tamanho significativo [5].

Existem fundamentalmente duas etapas para o processo de obtenção do pDNA para aplicação terapêutica. A primeira parte consiste na construção do plasmídeo inserindo o gene de interesse, seguido da transformação das células hospedeiras (por exemplo, bactérias *E. coli*), e por último a replicação e amplificação do número de cópias de pDNA, obtidas pelo crescimento de células transformadas por fermentação. A segunda parte é baseado na extração de plasmídeos de células hospedeiras e, em seguida, na separação e purificação de isoformas superenroladas de outros componentes das células hospedeira, como RNA, DNA genómico, endotoxinas e proteínas [9,10].

O pDNA selecionado como um vetor de expressão deve conter certos genes que são essenciais para a obtenção do vetor, tais como um gene de resistência a antibióticos (marca de seleção) para permitir que apenas as células transformadas cresçam. Além dos genes necessários para amplificar o vetor em células procarióticas, o plasmídeo também deve ter uma expressão eucariótica, ou seja, o promotor e a sequência de terminação, para iniciar e completar a expressão do gene alvo na célula alvo. [11,12].

A purificação do pDNA superenrolado tem sido explorada através de várias técnicas cromatográficas, nomeadamente exclusão molecular, troca iónica, interação hidrofóbica e afinidade. A forma estrutural dos suportes cromatográficos também tem evoluído, desde a aplicação de esferas não porosas até as membranas e monólitos. Definindo-se ligandos apropriados, em teoria, quase todos os princípios cromatográficos em qualquer tipo de suporte podem ser explorados para a purificação do plasmídeo [13].

No entanto, a entrega eficaz do material genético às células depende da associação do pDNA a sistemas de entrega que promovam a proteção, encapsulação e posterior libertação do pDNA. Os polímeros catiónicos são das estruturas mais estudadas para entrega de pDNA, pois suas cargas positivas podem complexar com os grupos fosfato carregados negativamente do pDNA, por meio de interações eletrostáticas, para formar

os chamados poliplexos. A composição do polímero bem como seu peso molecular e concentração têm uma grande influência sobre a citotoxicidade e eficiência de transfeção dos vetores não virais [14].

1.3 Sistemas de entrega

Os sistemas de entrega de DNA (vetores) podem ser divididos em vetores virais e vetores não virais, com características distintas como a seguir se detalha.

1.3.1 Vetores virais

Os vírus evoluem desenvolvendo estratégias aprimoradas para entrar em células-alvo específicas, usando posteriormente a maquinaria celular para expressar seus genes e produzir novas partículas virais. Essa capacidade de transferir e expressar seus genes nas células é a base para o uso de vírus como vetores [15].

De todos os sistemas de entrega, os vetores virais para entrega de DNA ainda são os mais usados ao nível laboratorial, no entanto cada vez mais têm vindo a ser substituídos pelos não virais sobretudo na terapia génica, principalmente devido à alta eficiência de transdução desses vetores. Todos os sistemas virais usados funcionam com vírus não replicativos, que são capazes de transferir o material genético desejado para as células-alvo, mas que não são passíveis de se replicarem e continuar seu ciclo de infecção vírico. Esta incapacidade de replicação é alcançada excluindo genes virais essenciais para a propagação do vírus e substituindo-os por genes terapeuticamente significativos. Assim, para construção dos vetores virais, é necessário identificar e remover as sequências virais necessárias para a replicação e empacotamento do genoma viral, e também é importante entender o possível mecanismo de entrega do gene alvo à célula. Portanto algumas características devem ser levadas em conta para a eficaz utilização de vírus na entrega de genes, tais como a produção e eficiência da partícula viral; controlo da toxicidade para as células-alvo; possibilidade de realizar a expressão transgénica a longo prazo, no caso de doenças genéticas e transdução de tipos específicos de células [16].

Muitos tipos de vírus foram adaptados para uso como vetores de transferência de genes. Os vetores virais mais comumente usados em terapia génica são: retrovírus, adenovírus e vírus adenoassociados. A Tabela 1 apresenta algumas vantagens e desvantagens dos principais vírus descritos. Esses vetores têm a capacidade natural de entrar nas células e expressar suas próprias proteínas e apresentam altas taxas de transdução [17,18,19].

Tabela 1 - Diferentes tipos de vetores virais, vantagens e desvantagens associadas (adaptado de Nouri, 2016 [20]).

Vetor	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	Alta eficiência em transdução, <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> Transduz vários tipos de células.	Expressão transitória Necessidade de linha celular de empacotamento Imunotoxicidade Tamanho de inserção limitado a 4-5 kb
Vírus adenoassociados	Expressão prolongada Transdução não precisa de divisão celular Genoma pequeno e sem genes virais	Precisa de linha celular de empacotamento Não é bem caracterizado Potencial mutagênese de inserção Tamanho de inserção limitado a 5 kb.
Retrovírus	Integrar o seu genoma na célula do hospedeiro em forma de DNA de cadeia dupla. Precisa de divisão celular para transdução Permite um maior tamanho do inserto: 9-12 kb.	Mutagênese de inserção Precisa de divisão celular para transfeção Precisa de linha celular de empacotamento.

O genoma viral pode ser reorganizado para eliminar genes necessários para a replicação e patogenicidade do vírus, substituindo-os por genes heterólogos e abrindo espaço para a inserção do gene de interesse e criação do vetor. Esse rearranjo torna o vírus parenteral apenas um portador de material genético, ou seja, um vetor viral. A grande vantagem dos vetores virais é poder-se estudar genes funcionais, corrigir defeitos genéticos, expressar proteínas terapêuticas e desenvolver vacinas contra tumores e agentes infecciosos [15,21].

O uso de vírus como vetores apresenta as maiores vantagens e as maiores desvantagens na terapia gênica. Dessas vantagens, podem-se destacar que são vetores naturais de transferência gênica e resistentes à degradação. No entanto, eles têm maior potencial para induzir respostas imunes e são considerados prejudiciais aos organismos [22].

1.3.2 Vetores não virais

Os vetores não virais são compostos de partículas biológicas produzidas sinteticamente nas quais um plasmídeo de DNA contendo um gene de interesse terapêutico é encapsulado ou ligado a um sistema e, em seguida, tem como objetivo ser entregue nas células alvo. Além do DNA, os vetores não virais também podem transportar outros ácidos nucleicos, como RNA [23].

Os sistemas de entrega de genes não virais ganharam ampla aceitação devido à sua segurança e baixa imunogenicidade. A capacidade de transferir genes grandes, fácil produção e alto potencial de libertação em alvos terapêuticos também levou ao investimento contínuo no desenvolvimento e uso desses vetores. [24].

Para comparação será de destacar que os vetores não virais possuem algumas vantagens sobre os vetores virais, tais como o facto de não serem patogênicos; apresentarem baixo custo; serem de produção mais fácil e estarem associados a uma maior segurança. Como limitação, esses vetores têm uma baixa eficiência de entrega de material genético; dificuldade em manter sua integridade no ambiente extracelular devido à degradação por ação de nucleases e dificuldade em manter a expressão terapêutica do gene. [25,26,27].

Para além de que a existência de várias barreiras extracelulares e intracelulares limita uma entrega eficaz de genes por vetores não virais. Devido à repulsão entre o ácido nucleico e a superfície celular, cruzar a membrana celular é uma das etapas mais críticas desse processo, pois ambos possuem carga negativa. A entrada do ácido nucleico no citoplasma pode ser facilitada por métodos físicos (que resultam na formação de poros que permitem que o ácido nucleico livre entre na membrana celular) ou por métodos químicos (usando portadores de genes). O DNA pode ser encapsulado e concentrado para formar um complexo com uma carga superficial positiva, otimizando assim a captação celular [25,26]. Assim, o sistema de entrega de genes não virais pode ser dividido em físico e químico [23].

Os vetores químicos são sistemas de transporte e entrega de material genético pertencente aos vetores não virais. Por apresentarem vantagens sobre os vetores virais, como segurança, maior capacidade de transportar material genético, baixa toxicidade e facilidade de produção, essas estruturas têm sido intensamente estudadas. Destes, destacam-se alguns sistemas, como os lipossomas, polímeros catiónicos, fosfato de cálcio e nanopartículas híbridas compostas por lipídios e polímeros [28,29,30]. A Tabela 2 lista os principais métodos químicos e suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2 - Vantagens, desvantagens e descrição dos métodos químicos para complexação/encapsulação de DNA (Mellott. et al, 2012 [31]).

Técnica	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Co-precipitação com fosfato de cálcio	Distribuição intracelular de DNA internalizado existindo assim uma maneira de as vesículas intermediárias transferirem DNA exógeno do complexo endolisossomal para o núcleo.	Biocompatibilidade; biodegradabilidade; capacidade de adsorver material genético; eficiência face ao custo.	são bastante exigentes a nível físico-químico; pobre reprodutibilidade.
Lipossomas catiónicos	Interação eletrostática com o material genético carregado negativamente, formando lipoplexos	facilitam o uptake celular; melhoram a entrega dos genes a nível intracelular; protegem o material genético de degradação enzimática.	presença de cargas positivas capazes de interagir inespecificamente com componentes celulares.
Polímeros catiónicos	Através de modificações da sua estrutura, é possível alterarem-se algumas das propriedades dos polímeros, melhorando assim a sua toxicidade e/ou atividade biológica	vetores seguros, biodegradáveis; pouco tóxicos; transporta uma maior quantidade de material genético; capacidade de proteger o material genético contra a ação das nucleases presentes no meio; estabelecer interações	induzem citotoxicidade proveniente da densidade de cargas positivas e do peso molecular.

eletrostáticas com a membrana celular, facilitando o seu uptake que ocorre através de endocitose; promove o escape endolisossomal.

Por seu lado, o método físico de entrega de genes é baseado na entrega direta de material genético às células na tentativa de evitar problemas relacionados com a entrega por meio de endocitose e imunogenicidade [29]. Os métodos físicos mais importantes envolvem microinjeção e eletroporação de vetores de plasmídeo [18].

A Tabela 3 lista os principais métodos físicos e suas vantagens e desvantagens.

Tabela 3 - Vantagens, desvantagens e descrição dos métodos físicos para entrega de DNA (Mellott. et al, 2012 [31]).

Técnica	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Microinjeção	Injeção direta de material genético no núcleo celular.	Seguro; Possibilidade de combinação com outras técnicas	Baixa eficiência; Depende do tamanho das células.
Eletroporação	Aplicação de um campo elétrico.	Eficácia; Mantém os tecidos intactos; Células divisíveis e não divisíveis; Transporta um grande número de células.	Limita a viabilidade celular; Inflamação; Deposição de metais; Custo; Invasivo
Injeção hidrodinâmica	Aproveitamento da força física gerada por uma injeção rápida de um grande volume para	Eficiência; Níveis altos de expressão do gene de interesse; Simplicidade do método	Volume injetado é demasiado grande;

	aumentar a permeabilidade celular		
Sonoporação	Ultrassons de alta intensidade; Induz formação de poros, devido ao movimento de um fluido	Não invasiva;	Baixo controlo da entrada do DNA; Eficácia
Irradiação com laser	Perfuração de células através da variação da frequência de um laser.	Seleção e imobilização da célula pretendida.	Custo
Magnetofection	Criação de um campo magnético para direcionar a entrega de material genético	Não invasivo; Precisão. Baixa citotoxicidade; Alta eficiência	Magnetes externos têm de ser fortes;
Gene gun	Precipitação de material genético em partículas de ouro ou tungsténio; Entrega direta no citoplasma ou núcleo celular.	Ultrapassam a camada mais exterior da pele.	Profundidade de acesso das partículas; Lesões no tecido alvo; Falta de especificidade; Poucas células transfetadas.

1.4 Sistemas poliméricos

Os polímeros naturais e sintéticos são uma das categorias de materiais mais utilizados, com aplicações importantes, principalmente nas áreas médica e farmacêutica, nomeadamente na entrega de fármacos. A eficácia de um polímero a ser usado como

sistema de entrega depende da sua capacidade para interagir direta ou indiretamente com outras moléculas por meio de interações físicas e/ou químicas e produzindo por meio delas uma resposta biológica^[32]. Como foi dito anteriormente, os polímeros podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Polímeros naturais são aqueles polímeros que existem na Terra há bilhões de anos, ou seja, sem envolvimento humano, tais como proteínas, carboidratos, DNA, RNA, lipídios, ácidos nucleicos, peptídeos e polissacarídeos. Polímeros sintéticos são aqueles produzidos industrialmente a partir de derivados do petróleo, como por exemplo o nylon, polietileno, poliéster, teflon e epóxi.^[33]

Os polímeros são macromoléculas covalentemente ligadas por uma combinação de unidades estruturais menores, chamadas de monómeros. O desempenho de um polímero é amplamente afetado por seus detalhes estruturais, podendo ser classificados quanto à sua estrutura química como homopolímeros ou copolímeros, onde os homopolímeros são constituídos por um único tipo de monómero e os copolímeros são constituídos por vários^[34].

Adicionalmente, polímeros biodegradáveis podem ser definidos como aqueles que sofrem degradação macromolecular *in vivo*, por ação de enzimas, microrganismos ou células^[35,36]. Por seu lado, polímeros bioadesivos têm capacidade de ligação aos substratos biológicos de duas formas, por adesão à camada de mucosa (mucoadesiva) ou membrana celular (adesão celular)^[37,38].

Alguns dos materiais geralmente obtidos por copolimerização entre monómeros ou polímeros hidrofílicos e co-monómeros multifuncionais que promovem ligações cruzadas são, por exemplo, os hidrogéis, que apresentam uma estrutura tridimensional que contém quantidade elevada de água, permitindo que absorvam grandes quantidades de água sem se dissolverem. Portanto, os hidrogéis podem ser usados para preparar fórmulas de fármacos, permitindo uma resposta aos estímulos fisiológicos, como temperatura, pH, enzimas, biomoléculas (glicose, ureia, insulina), iões e força de oxidação após contato com o meio de dissolução^[39,40].

Os polímeros bioativos e biomiméticos também vêm sendo estudados. O material biomimético é definido como um daqueles que pode interagir seletivamente com o microambiente biológico e mimetizá-lo. Polímeros bioativos são polímeros que podem interagir com recetores celulares por meio do reconhecimento biológico para promover reações específicas^[41, 42].

Por fim, os polímeros terapêuticos são aqueles aos quais são atribuídas propriedades terapêuticas. O controlo da função e estrutura dos polímeros sintéticos permite que eles

se liguem a recetores específicos presentes em células, promovendo o reconhecimento ou a comunicação, desencadeando a regulação da resposta inflamatória, adesão celular ou transdução de sinal [41].

1.5 Copolímeros

Os copolímeros são macromoléculas compostas por duas ou mais unidades estruturais diferentes, que podem ser distribuídas entre elas para gerar segmentos ou blocos. Com base na organização das unidades ao longo da cadeia polimérica, elas podem ser classificadas como formas alternadas, periódicas, estatísticas, aleatórias ou em blocos. De acordo com a disposição das cadeias poliméricas, também podem ser classificadas como lineares ou ramificadas [43]. A reação de copolimerização é uma técnica importante que possibilita moldar o polímero, através de modificações sistemáticas, agregando propriedades específicas, tornando-o comercial e tecnologicamente mais interessante e vantajoso [44].

Os copolímeros são compostos por dois ou mais tipos de monómeros e são classificados de acordo com a forma como são distribuídos apenas ao longo da cadeia (figura 1). Que podem ser divididos nas seguintes categorias [45].

a) Aleatório: os monómeros não apresentam nenhuma regularidade de repetição ao longo da cadeia polimérica.

b) Alternado: os diferentes monómeros estão dispostos de forma alternada ao longo da cadeia polimérica.

c) Em blocos: ocorre a formação de grandes blocos de um dado monómero que se alternam com outros grandes blocos de outro monómero ao longo da cadeia polimérica.

d) Grafizado ou enxertado: em uma cadeia de um homopolímero (A) uma cadeia (B) se liga covalentemente.

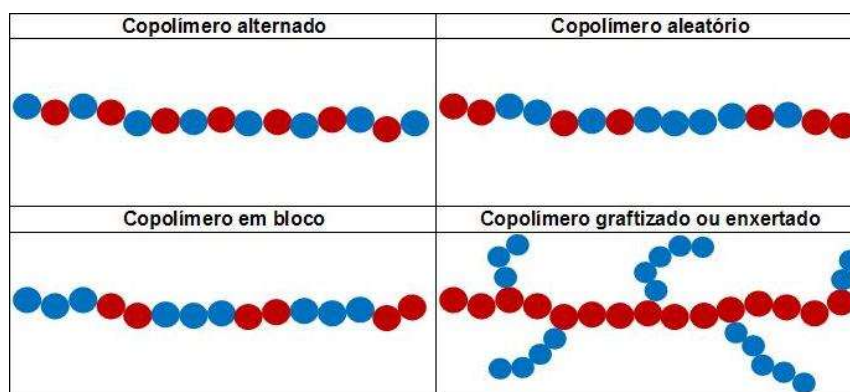


Figura 1 – Esquema representativo da organização estrutural dos diferentes tipos de copolímeros (a) Alternado, (b) Aleatório, (c) Em blocos e (d) Grafizado ou enxertado. (Adaptado de Callister; 2008, [46]).

1.5.1 Poli (oligo (óxido de etileno) metil éter) metacrilato-bloco-poli (2-diisopropilamino metacrilato de etilo) (POEOMA-*b*-PDPA)

Para que seja explicado um pouco sobre o copolímero POEOMA-*b*-PDPA, é preciso perceber como ele funciona. Copolímeros em bloco são geralmente compostos por um segmento que responde ao pH e um segmento hidrofílico permanente, sendo essas estruturas anfífilas para valores de pH acima do pK_a dos fragmentos responsivos ao pH e se auto-organizam em nanoestruturas, o que os tornam insolúveis em água em pH mais baixos. Essa diferença de pH no interior de alguns compartimentos celulares, como endossomos ou lisossomos (pH \approx 5,6), e o pH fisiológico (pH \approx 7,4), é de grande interesse em estudos de nanotransportadores em aplicações biomédicas. Essa variação no pH pode favorecer a interação do polímero com o material a transportar ou induzir a desconstrução/despolimerização do sistema, que faz com que ocorra libertação de compostos encapsulados [47].

Foi estudada, através dos métodos de polimerização radicalar de desativação reversível (RDRP), uma possível síntese de polímeros bem definidos, com peso molecular controlado (MW), composição controlada, arquiteturas complexas e alta funcionalidade de final de cadeia [46,48]. Os métodos RDRP possuem estratégias que podem ser seguidas para incorporar porções de polietilenoglicol (PEG), que é que um polímero altamente hidrofílico, biocompatível e que confere um efeito de blindagem aos nanocarreadores, impedindo que sejam reconhecidos pelo sistema imunológico, ampliando assim o tempo de circulação sistêmica. Para auxiliar estes métodos de polimerização em copolímeros de bloco podem ser usadas estratégias como uso de macroiniciadores lineares de PEG; ou agentes de transferência de fragmentação de adição reversível (RAFT) de PEG; ou através do uso de monómeros à base de PEG, como oligo (óxido de etileno) metacrilatos de éter metílico (OEOMA) [49,50,51,52].

Assim, o POEOMA-*b*-PDPA (figura 2), devido às suas características, pode ser bastante interessante para ser aplicado como sistema de encapsulação e entrega de ácidos nucleicos. Os copolímeros à base de POEOMA têm atraído grande interesse em diversas aplicações biomédicas, incluindo: modificações químicas; revestimentos para nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro; nanogéis biodegradáveis; bioconjugados; e sistemas de entrega de fármacos [53,54,55,56,57].

O POEOMA-*b*-PDPA é um copolímero em dibloco, sensível ao pH que pode auto-organizar-se para formar micelas. Por isso, os copolímeros em blocos anfífilos, podem solubilizar e encapsular genes e outros compostos hidrofóbicos na região hidrofóbica

central. Em ambiente aquoso, dependendo da natureza da solução, espera-se que o bloco hidrofóbico se separe na micela central, enquanto o bloco hidrofílico formará uma coroa externa que funcionará como um estabilizador entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo [58,59]. A sua capacidade para formar diferentes estruturas micelares, dependendo da composição do copolímero em bloco e das características da solução, revela como a sequência de blocos POEOMA pode desempenhar um papel importante no desenho do vetor polimérico [60,61].

Por outro lado, a natureza responsiva ao pH do bloco PDPA resulta do facto de essas cadeias se encontrarem protonadas quando em solução abaixo de seu pKa, e pelo contrário aquando se encontram acima de seu pKa torna-se neutro ficando mais hidrofóbico e insolúvel em água. O POEOMA é o segmento hidrofílico permanente e, portanto, o carácter anfifílico deste copolímero pode ser mais ou menos preponderante via modulação de pH. [59]. Em relação aos copolímeros em blocos anfifílicos, eles podem dissolver e encapsular genes e outros compostos hidrofóbicos no sistema hidrofóbico central. [58]

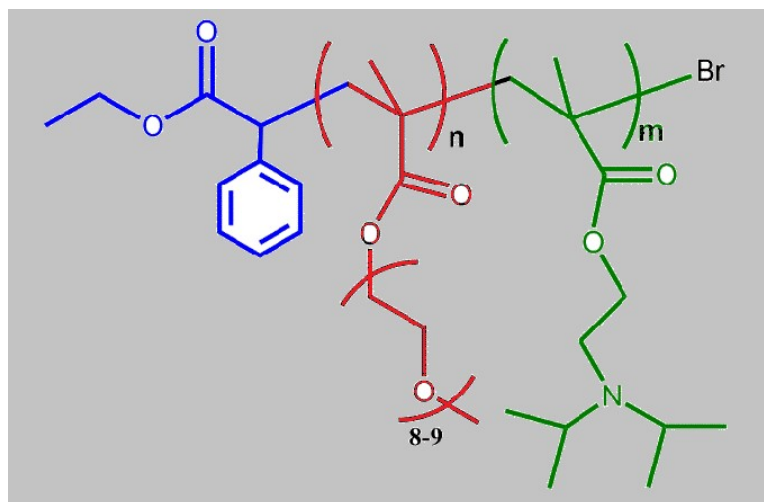


Figura 2 - Estrutura química do copolímero de bloco POEOMA-*b*-PDPA. (Adaptado de Reis [59]).

Os copolímeros em bloco à base de metacrilato de aminas terciárias (PDPA) são um dos mais promissores polímeros responsivos ao pH para aplicações biomédicas, devido à possibilidade de ajuste de sua solução hidrofílica/transição hidrofóbica (pKa) em torno do pH fisiológico [62]. Poli (2- (diisopropilamino) metacrilato de etila (PDPA) nada mais é que uma amina terciária metacrilato com uma transição hidrofílica/hidrofóbica a um pH de cerca de 6,2. Este monómero é hidrofóbico quando o pH é superior ao pKa devido à sua desionização, e torna-se hidrofílico quando ionizado em pH baixo. Os copolímeros baseados em PDPA têm sido usados na preparação de nanoestruturas inteligentes para

controlar a libertação de pequenas moléculas, e a complexação e a entrega de material genético. Sendo que o segmento PDPA, pode ser vinculado ao bloco hidrofílico, como PEG [63,64].

Apesar do enorme potencial do PDPA para aplicações biomédicas, como nanotransportadores para terapia do cancro, sistemas de entrega de genes não viral ou nanopartículas sensíveis ao pH sintonizáveis para ambos estudos *in vitro*, a literatura disponível ainda é escassa, havendo uma necessidade de melhor compreender os mecanismos de encapsulação e libertação para otimizar e melhorar a eficácia dos sistemas de entrega [65,66,67,68].

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho consistiu no desenvolvimento de estratégias para o uso de polímeros responsivos ao pH, de modo a proteger e encapsular DNA plasmídico de uma forma simples e eficaz, podendo este ser usado em futuras aplicações terapêuticas. O trabalho realizado envolveu a síntese de nanopartículas poliméricas baseadas em copolímeros, contendo o poli (oligo (óxido de etileno) metacrilato de éter metílico (POEOMA)) como segmento hidrofílico e copolimerizado com o poli (2-(diisopropilamino) metacrilato de etila) (PDPA), sensível ao pH.

Para alcançar o objetivo pretendido, uma série de etapas laboratoriais foi realizada, tais como:

1. Determinação da eficiência de encapsulação dos polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ para várias concentrações de pDNA e em soluções de diferentes valores de pH, nomeadamente a 4,5 e 7,4, bem como usando diferentes concentrações de polímero (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mg/mL), de modo a identificar a concentração e condições mais adequadas para a encapsulação de pDNA.
2. Análise da morfologia das nanopartículas, formuladas em diferentes valores de pH, por Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV).
3. Determinação do tamanho, diâmetro médio, índice de polidispersividade e carga de superfície dos sistemas de copolímero e pDNA.
4. Análise da capacidade dos complexos de pDNA-copolímeros para proteger o pDNA, na presença de DNase e meio celular DMEM.
5. Avaliação da viabilidade celular determinada por MTS, para verificar a toxicidade e segurança das nanopartículas produzidas.

CAPÍTULO 3

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

Os reagentes comuns usados ao longo do trabalho experimental foram sulfato de amónio ((NH₄)₂ SO₄), Tween 20 (C₅₈ H₁₁₄ O₂₆), hidróxido de sódio (NaOH), dodecil sulfato de sódio (SDS), cloreto de sódio (NaCl) comercializados por Panreac (Barcelona, Espanha), e tris (hidroximetil) aminometano (Tris) da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para o crescimento da bactéria *E. coli* DH5 α , os reagentes usados foram: agar, meio LB (Luria-Bertani) de Pronalab (Mérida, México), triptona e extrato de levedura da Bioakar (Beauvais, França), glicerol de Himedia, hidrogenofosfato de dipotássio (K₂HPO₄) de Panreac (Barcelona, Espanha), di-hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄) da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) e o antibiótico ampicilina da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA).

Para a extração de DNA de plasmídico, o kit NZYMaxiprep da NZYTech Genes and Enzymes (Lisboa, Portugal) foi usado, assim como isopropanol da Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, EUA). Para a realização das eletroforeses no decorrer do trabalho, foi utilizado GRS agarose LE e reagente Green-Safe da Grisp (Porto, Portugal).

Os polímeros POEOMA22-*b*-PDPA87 e o POEOMA28-*b*-PDPA74 utilizados durante o projeto foram gentilmente cedidos pelo professor Jorge Coelho (Universidade de Coimbra), no âmbito de uma colaboração.

Para o processo de proteção de DNA plasmídico, foi utilizado DNase da PanReac AppliChem e para a realização dos testes de citotoxicidade foram utilizados o meio DMEN-F12 proveniente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e MTS da Promega.

3.2. Métodos

3.2.1. Crescimento de *E. coli* e produção de DNA plasmídeo

O pDNA (pcDNA3-FLAG-p53), de 6,07-kb (Addgene, pDNA 10838) contendo a sequência que codifica a proteína p53 foi replicado a partir de uma cultura celular de *Escherichia coli* DH5 α . Inicialmente, as células de *E. coli* foram inoculadas em meio LB-agar suplementado com 50 μ g/mL de ampicilina, e o crescimento ocorreu a 37 °C durante a noite. A pré-fermentação foi realizada através da transferência de algumas colónias para frascos contendo 125 mL de meio TB (12 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 4 mL/L de glicerol, 0,017 M de KH₂HPO₄, 0,072 M K₂HPO₄), suplementado com ampicilina 50 μ g/mL. O crescimento de *E. coli* ocorreu a 37 °C, 250 rpm, até uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de cerca de 2,6 ser alcançada. A seguinte equação foi

usada para calcular o volume de pré-fermentação necessário para iniciar a fermentação com uma DO₆₀₀ de 0,2:

$$V_{\text{pré-fermentação}} = [(V_{\text{pré-fermentação}} + V_{\text{fermentação}}) \times DO_{\text{fermentação}}] / DO_{\text{pré-fermentação}}$$

Para medir a DO, um espectrofotômetro Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 UV/Visible (Cambridge, Inglaterra) foi usado.

O crescimento bacteriano foi mantido por 16 h e por fim, as células foram recuperadas por centrifugação a 3900 g por 10 minutos a 4 °C, sendo as células (*pellets*) armazenadas a -20 °C.

3.2.2. Extração de DNA de plasmídeo

Para a recuperação e extração do pDNA foi utilizado o kit NZYMaxiprep, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Sendo assim, o sedimento bacteriano correspondente a 100 mL de cultura de *E. coli* foi ressuscitado em 12 mL de tampão M1, contendo RNase A, passado por vigoroso vórtex. Como o pDNA é um produto intracelular, a lise celular teve que ser realizada. Assim, foram adicionados 12 mL de tampão M2, e a homogeneização foi realizada misturando suavemente por inversão do tubo. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a etapa de neutralização foi realizada pela adição de 12 mL de tampão M3 pré-arrefecido, e a resuspensão bacteriana foi cuidadosamente homogeneizada. O lisado foi então centrifugado durante 30 minutos a 20.000 g a 4 °C. Se o sobrenadante ainda apresentasse matéria suspensa, a centrifugação seria repetida durante 15 minutos. Enquanto isso, a coluna NZYTech era equilibrada com 6 mL de tampão MEQ. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para a coluna NZYTech equilibrada. Nesta etapa, ocorreu a ligação do DNA, e os contaminantes são eliminados lavando a coluna com 32 mL de tampão MW. Para a eluição do pDNA puro, foram adicionados 15 mL de tampão ME e o pDNA foi recuperado em novos tubos. O pDNA eluído foi então precipitado com 10,5 mL de isopropanol, seguido por homogeneização cuidadosa e 15 minutos de incubação em gelo. Então uma centrifugação foi realizada a 15.000 g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante era descartado, e o pellet de DNA foi lavado com 5 mL de etanol a 70%. A centrifugação foi repetida a 15.000 g durante 15 minutos, a 4°C. Com cuidado, o etanol foi removido inteiramente, e o sedimento foi deixado secar à temperatura ambiente. Para reconstituição de DNA, o pellet de DNA foi dissolvido em 1 mL de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0). A amostra de pDNA foi quantificada no Nanodrop (IMPLEN, Reino Unido). A integridade e pureza da amostra foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose e para finalizar, as amostras de DNA foram armazenadas a -80 °C.

3.2.3. Preparação de complexos de DNA-copolímero de plasmídeo

Para determinar quais as concentrações mais adequadas para encapsulação de pDNA, foram estudadas cinco concentrações para os polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ (0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL). Ambos os polímeros, foram preparados na concentração de 1 mg/mL dissolvendo-se em tampão de acetato de sódio (0,1 M de acetato de sódio / 0,1 M de ácido acético, pH 4,5), e posteriormente realizadas as diluições subsequentes (0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,5 mg/mL). A solução de pDNA, com uma concentração de 20 µg/mL, foi também preparada em tampão de acetato de sódio, a pH=4,5. Para encapsular o pDNA, um volume fixo de solução de polímero (100 µL) das diferentes concentrações descritas acima foi adicionado gota a gota à solução de pDNA (400 µL) em 60 segundos em um vórtex. Todas as técnicas de caracterização de complexos pDNA-copolímero, foram realizadas mantendo a concentração de pDNA constante (20 µg/mL). Em seguida, todas as partículas preparadas foram equilibradas à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas a 15.000g por 20 minutos, a uma temperatura de 4°C, para recuperar o complexo pDNA-copolímero.

3.2.4. Ensaio em gel de agarose

Cada sistema de pDNA-copolímero foi preparado em diferentes concentrações, conforme descrito anteriormente. As amostras resultantes foram analisadas por eletroforese horizontal com gel de agarose 1% complementado com Greensafe, para marcação dos ácidos nucleicos. A eletroforese foi realizada em tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Tris Base 40 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0) e decorreu a 120 V por 40 minutos. A seguir, o gel de agarose resultante foi visualizado sob luz ultravioleta, através do equipamento UVitec Cambridge (Cambridge, Reino Unido).

3.2.5. Eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação (E.E) dos diferentes polímeros, a concentração de pDNA livre no sobrenadante resultante da centrifugação de partículas (15.000 rpm, 20 minutos, 4°C) foi quantificada. A quantidade de pDNA não ligado foi determinada por absorção de UV a 260 nm num Nanodrop. Três repetições foram realizadas para cada condição. Assim, a EE foi calculada da seguinte forma:

$$E.E (\%) = [(Quantidade\ total\ de\ pDNA - quantidade\ de\ pDNA\ no\ sobrenadante) / Quantidade\ total\ de\ pDNA] \times 100$$

3.2.6 Microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

O microscópio eletrônico de varrimento é uma ferramenta usada na caracterização morfológica dos sistemas preparados, sendo capaz de produzir imagens de alta resolução e ampliação da amostra de interesse, que possibilita avaliar, além da forma e da superfície das nanoestruturas geradas, o tamanho e a sua distribuição quanto à morfologia, permitindo aumentos acima de 50.000 vezes e imagens tridimensionais de alta resolução (>1 nm), o que torna essa técnica bastante versátil. [69,70].

Sendo assim, foi necessária a preparação das amostras com a presença de ouro. Primeiramente cortou-se um pedaço da lamínula com a amostra, colou-se com fita dupla face no stub (porta amostras do SEM) e foi necessário realizar a metalização com ouro (sputtering) anteriormente à análise. Um feixe de elétrons acelerados é focalizado sobre a amostra, e os elétrons refletidos (parte espalhada) são analisados para formar uma imagem.

3.2.7. Medições do potencial Zeta/Size

Para avaliação do tamanho de partícula, o diâmetro médio de partícula formada pela associação do copolímero e pDNA e o índice de polidispersividade foram realizados ensaios por espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando um analisador de partículas Zetasizer NanoZS. Os diâmetros das partículas das amostras recém-preparadas foram medidos a 20 °C. Por outro lado, a carga de superfície (potencial zeta) permite saber a carga superficial das nanopartículas em solução, utilizando-se, para o efeito, uma célula com dois elétrodos. Aplica-se um campo elétrico às partículas e mede-se a mudança de fase na luz dispersa pelas nanopartículas em movimento devido ao campo elétrico aplicado. A mudança de fase é proporcional à mobilidade eletroforética das partículas, parâmetro a partir do qual se calcula o potencial zeta. As medições do potencial zeta foram realizadas sequencialmente às do tamanho, utilizando-se para o efeito o mesmo equipamento Zetasizer Nano-ZS, acoplado a um laser de eletroforese doppler utilizando o modelo de Smoluchovski. Os valores médios das medidas de tamanho e potencial zeta foram calculados com os dados obtidos em três repetições. Os resultados obtidos para o tamanho e para o potencial zeta foram analisados com recurso ao software Zetasizer 6.02.

3.2.8. Liberação de DNA plasmídico

Para os estudos de liberação, foi inicialmente realizada a encapsulação do pDNA pelos polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, nas respectivas concentrações de 0,5 e 0,25 mg/mL. Posteriormente foi retirado o sobrenadante, onde se encontra o

pDNA não encapsulado, e lida a sua absorvância para determinação do pDNA não ligado. Logo depois as amostras de poliplexos são ressuspensas em 100 µL de tampão fosfato pH 8. Após a sua ressuspensão no tampão, são incubadas as amostras durante 30 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente à incubação, voltaram-se a centrifugar as nanopartículas, a 15000 g, 5 minutos, 4 °C, seguido da medição de suas concentrações nos respetivos tempos de incubação (imediatamente após adição do tampão e após 30 minutos).

3.2.9. Proteção de pDNA

O ensaio de proteção de pDNA foi realizado colocando o complexo pDNA-copolímero (100 µL) com DMEM-F12 de alta concentração de glicose suplementado com 10% FBS e DNase (5 U/L). Sendo incubados os complexos pDNA-copolímero em agitação, temperatura de 37 °C, por diferentes tempos (30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas). Em seguida, o complexo pDNA-copolímero foi centrifugado a 20.000 g por 15 minutos para precipitar o complexo, e o pDNA foi liberado no sobrenadante e, em seguida, recuperado e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificar a integridade estrutural do pDNA.

3.2.10. Viabilidade celular

Para a análise dos efeitos citotóxicos do copolímero, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Neste ensaio, foram utilizados fibroblastos humanos, que foram semeados em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação (para permitir adesão das células à placa) o meio de cultura foi substituído por meio de cultura sem soro. Depois, nanopartículas do copolímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ com uma concentração de 0,5 mg/mL (que nos estudos anteriores mostraram melhores resultados), foram adicionadas aos poços. As células foram incubadas por 48 horas onde foi realizado o estudo de citotoxicidade. Uma mistura de MTS, foi adicionada a cada poço e as células foram incubadas a 37 °C durante 1h30, protegida da luz. Por fim, é realizado a análise do MTS metabolizado, por medição de absorvância a 490 nm em um leitor de microplaca. As células não transfectadas incubadas com etanol foram utilizadas como controlo positivo para o nível de citotoxicidade.

CAPÍTULO 4

4. Resultados e Discussão

No presente trabalho pretendeu-se realizar o desenvolvimento de nanopartículas baseadas na utilização dos polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ responsivos ao pH, para se obter uma encapsulação eficaz de pDNA. Os resultados obtidos no decorrer do trabalho experimental e realizados com cada polímero POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ serão apresentados de forma detalhada nos tópicos presentes abaixo.

4.1. Eficiência de encapsulação

Para as análises realizadas na determinação da eficiência de encapsulação (%) de pDNA foram preparados diferentes sistemas, variando a concentração de copolímero em tampão de acetato de sódio a pH 4,5 (gráfico 1) e tampão fosfato a pH 7,4 (gráfico 2). A concentração do material genético foi mantida constante ao longo dos ensaios (20 µg/mL). A capacidade dos copolímeros de ligar e condensar o material genético foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (dados não apresentados).

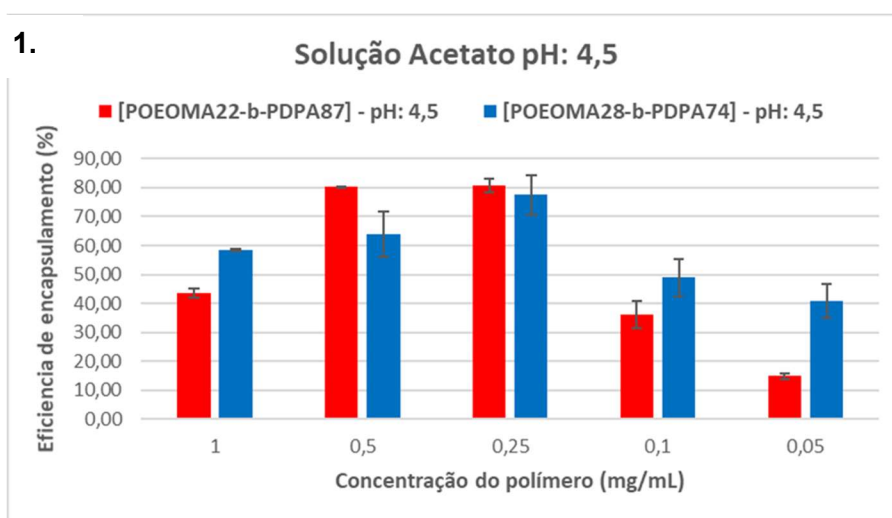


Gráfico 1 - Eficiência de encapsulação (%) do pDNA pelos polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ (a vermelho) e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ (a azul), estudados nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,05 mg/mL em tampão acetato pH: 4,5.

Os resultados apresentados no gráfico 1 (em tampão acetato pH: 4,5) sugerem eficiências consideravelmente elevadas, sendo as mais elevadas de cerca de 80,28%, para a concentração 0,5 mg/mL e cerca de 80,73%, na concentração de 0,25 mg/mL, ambos no polímero POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇. Já para a encapsulação com o polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, este apresentou eficiências menores, sendo as mais elevadas de cerca de 63,83% na concentração 0,25 mg/mL e de 77,49% na concentração de 0,5 mg/mL.

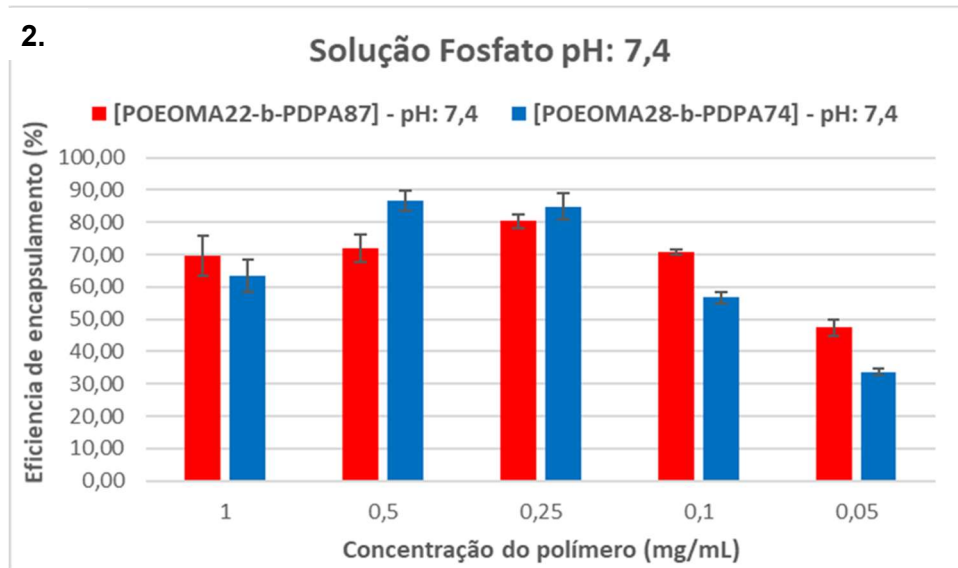


Gráfico 2 - Eficiência de encapsulação (%) do pDNA pelos polímeros POEOMA22-*b*-PDPA87 (a vermelho) e POEOMA28-*b*-PDPA74 (a azul), estudados nas concentrações de 1; 0,5; 0,25; 0,1 e 0,05 mg/mL em tampão fosfato pH: 7,4.

Os resultados apresentados no gráfico 2, resultaram dos estudos realizados com os mesmos polímeros, com a diferença de se ter utilizado uma solução com pH 7,4, ou seja, um pH mais elevado quando comparado aos estudos anteriores. Num modo geral pode-se verificar que as eficiências de encapsulação para este pH são superiores comparando ao que foi verificado para um pH mais baixo (gráfico 1). Observando-se aqui (gráfico 2), que as concentrações que apresentaram elevadas eficiências de encapsulação do pDNA foram a de 0,25 mg/mL, com eficiência de cerca de 80,45% e a 0,5 mg/mL, com cerca de 71,94%, ambos com o polímero POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇. No polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, as concentrações que mostraram os melhores resultados na encapsulação do pDNA foram a 0,25 e 0,5 mg/mL, com cerca de 84,91% e 86,84% de eficiência, respetivamente. As restantes concentrações estudadas (1; 0,1 e 0,05 mg/mL) para os dois polímeros e nas condições de pH 4,5 e 7,4, não apresentaram resultados vantajosos para a complexação do pDNA. Pelo que nos estudos subsequentes foram usadas apenas as concentrações de polímeros cuja eficiência de encapsulação foi superior, isto é, a 0,25 e 0,5 mg/mL de cada um dos polímeros.

4.2. MEV (Microscopia Eletrónica de Varrimento)

A morfologia de um nanosistema pode ser definida como o estudo da sua forma, configuração e aparência. A topografia do material pode ser descrita detalhadamente através da análise precisa da sua superfície, podendo ser utilizado o Microscópio Eletrónico de Varrimento (MEV) para caracterização morfológica e topográfica de um material. Sendo assim, esta técnica pode revelar-se muito importante na caracterização

morfológica e de tamanho das nanopartículas [70]. Os resultados obtidos na caracterização dos sistemas preparados anteriormente são apresentados nas figuras 3 e 4.

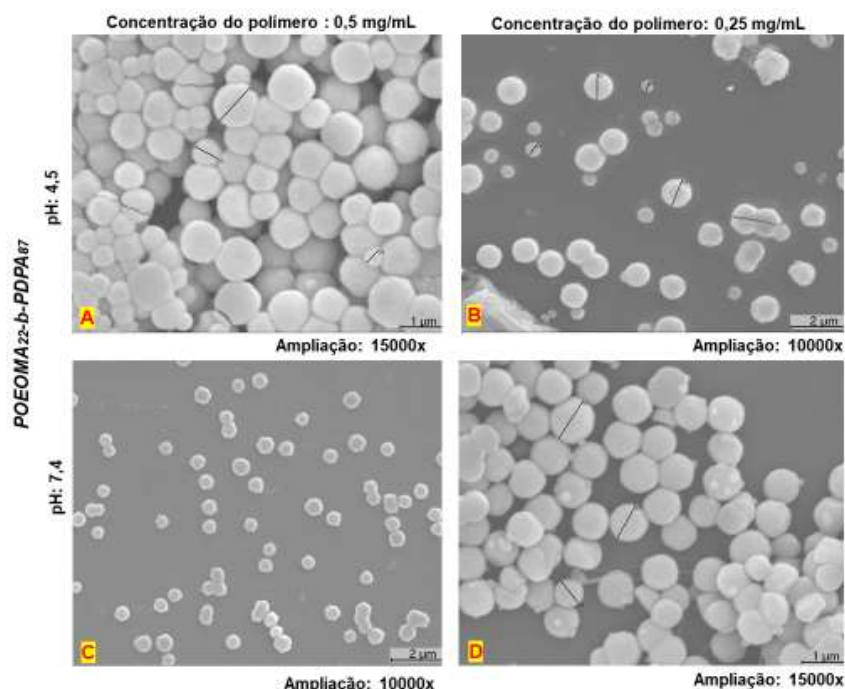


Figura 3 - Resultados de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) no polímero POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ – A: concentração 0,5 mg/mL; B: concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução acetato (pH:4,5). C: concentração 0,5 mg/mL; D: concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução Fosfato (pH:7,4). As ampliações apresentadas foram escolhidas com base na melhor observação possível das imagens.

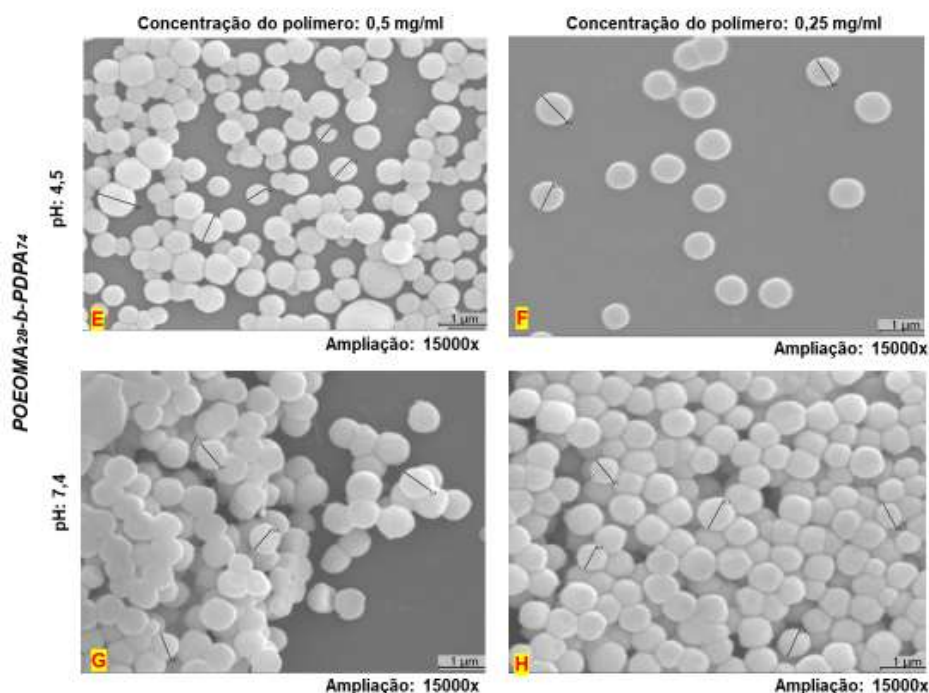


Figura 4 - Resultados de Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) no polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ – E: concentração: 0,5 mg/mL; F concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução acetato (pH:4,5). G: concentração 0,5 mg/mL; H: concentração 0,25 mg/mL, ambos em solução Fosfato (pH:7,4). As ampliações apresentadas foram escolhidas com base na melhor observação possível das imagens.

Os resultados apresentados nas figuras 3 e 4 permitiram analisar a morfologia e estrutura das amostras com os polímeros o POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ (figura 3) e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ (figura 4), nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL ambos em tampão acetato e fosfato. Estes resultados foram obtidos com uma ampliação entre 10000 e 15000 vezes.

É possível observar na figura 3, com o polímero POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇, a pH 4,5 na figura 3.A, para a concentração de 0,5 mg/mL, que as nanopartículas apresentam tamanhos diferenciados entre 951 nm e 369 nm, enquanto na figura 3.B obtida para a concentração de 0,25 mg/mL de polímero, que os tamanhos variaram entre 338 nm e 795 nm. Já na figura 3.C e 3.D as nanopartículas foram preparadas a pH 7,4. Na figura 3.C, com uma concentração de polímero de 0,5 mg/mL os tamanhos das partículas apresentaram-se entre 319 nm e 456 nm. Já, na figura 3.D, para a concentração de 0,25 mg/mL, os tamanhos variam entre 540 nm e 895 nm. Os resultados apresentados na figura 4, com o polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, mostram que para pH 4,5 temos tamanhos de 383 nm; 515 nm; 439 nm e 627 nm na figura 4.E para uma concentração de 0,5 mg/mL, enquanto na figura 4.F (0,25 mg/mL) encontram-se tamanhos de 540 nm; 666 nm e 581 nm. Já as nanopartículas da figura 4.G e 4.H, preparadas a pH 7,4, verificou-se que para a concentração de 0,5 mg/mL (figura 4.G) os seus tamanhos são de 572 nm; 491 nm e 646 nm, e na concentração de 0,25 mg/mL (figura 4.H) os tamanhos estão entre 519 nm; 520 nm; 651 nm e 585 nm.

Verifica-se globalmente, através dos resultados apresentados, que as nanopartículas preparadas em pH 4,5 para ambos os polímeros, POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, se apresentam com o formato mais característico, sendo estas arredondadas, o que também será mais vantajoso para utilização na entrega de material genético às células. Para o pH 7,4, as nanopartículas apresentam morfologia que não é tão esférica e sim uma morfologia mais oval, apresentando-se também com maior agregação, o que torna a medição de tamanho da partícula individual um pouco difícil e imprecisa. Portanto, a preparação da amostra deve garantir menor aglomeração e boa distribuição das nanopartículas. Referir, no entanto, que a aglomeração da amostra pode estar relacionada ao processo de secagem ou a um processo ineficiente no espalhamento de partículas sobre a superfície.

Os resultados obtidos no presente projeto de pesquisa são consistentes com os obtidos por Dunlap *et al.* 1997 e Chithrani e Chan 2007, que demonstraram que a morfologia das partículas formadas com pDNA (de tamanho a variara entre 100 e 600 nm), apresentando em sua maioria formas esféricas e ovais, poderia ser modificada em resposta a alterações de pH. Foi ainda descrito que as formas esféricas das

nanopartículas são mais facilmente envolvidas pela membrana celular, facilitando a sua captação, quando comparadas com as formas ovais [71,72,73].

4.3. Avaliação do potencial Zeta e Tamanho dos políplexos

As propriedades de carga à superfície e tamanho das nanopartículas formadas pelos polímeros em estudo POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ e pDNA encapsulado, foram determinadas por medições de potencial zeta/size (gráfico 3).

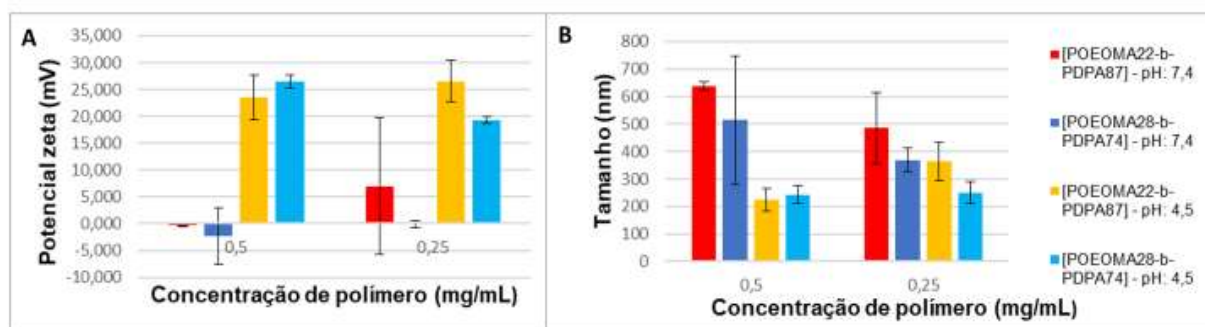


Gráfico 3 – Resultados do potencial Zeta (A) e distribuição de tamanhos (B) para os polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ em pH 4,5 e 7,4.

A carga à superfície das nanopartículas é uma característica do sistema de entrega de genes que é muito importante avaliar, pois não afeta apenas a interação entre o complexo e a membrana celular, mas também afeta a estabilidade coloidal do sistema [74]. O gráfico 3.A mostra o potencial zeta dos polímeros preparados para as duas concentrações de polímero que resultaram em maiores eficiências de encapsulação do pDNA. Os sistemas preparados a pH 4,5 apresentaram na sua maioria uma carga superficial positiva, sendo que particularmente, o POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇, na concentração de 0,5 mg/mL conduziu à formação de partículas com carga de 23,53 mV e na concentração de 0,25 mg/mL uma carga à superfície de 26,56 mV. Já o polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, na concentração de 0,5 mg/mL produziu partículas com carga de 26,42 mV e na concentração de 0,25 mg/mL, carga de 19,21 mV. No caso dos sistemas preparados a pH superior, cerca de 7,4, o polímero POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇, na concentração de 0,5 mg/mL formou partículas de carga de -0,295 mV e na concentração de 0,25 mg/mL carga de 7,0 mV. No caso, das partículas formadas com o polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ na concentração de 0,5 mg/mL, estas apresentaram carga de -2,4 mV e de -0,052 mV na concentração de 0,25 mg/mL, sendo por isso sempre negativas. Com base nos resultados apresentados, é possível notar que os sistemas estão menos carregados positivamente com o aumento do pH, o que segundo investigadores, se deve ao facto de sob condições ácidas o PDPA, anteriormente hidrofóbico, acaba por tornar-se hidrofílico após protonação. Contudo a

carga positiva do polímero POEOMA-*b*-PDPA em pH 4,5, indica que o polímero é solúvel e que não forma agregados, o que pode estabelecer fragmentos de PDPA carregados positivamente e, neste pH, tanto os fragmentos de POEOMA quanto o PDPA são hidrofílicos. [74,75]. Possuindo uma carga superficial positiva, estes sistemas podem facilitar a transferência de material genético para as células, uma vez que favorecem a interação com as membranas celulares, facilitando a entrada dos políplexos.[76].

Já os resultados obtidos no gráfico 3.B evidencia os tamanhos (Size) das partículas preparadas para ambas concentrações de polímeros que obtiveram maiores eficiências de encapsulação (0,5 e 0,25 mg/mL). É possível observar que para a concentração de 0,5 mg/mL nos polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, é quando se obtém uma maior variabilidade de tamanhos dos sistemas. Também se verifica que os sistemas preparados a pH 7,4 apresentam tamanho superior às partículas obtidas a pH 4,5.

Todos estes resultados de avaliação da dimensão dos sistemas formados é igualmente relevantes, uma vez que sistemas de entrega de dimensão elevada podem limitar a entrada e entrega do DNA às células. A interação eletrostática entre o polímero e o pDNA é estabelecida durante a preparação do complexo. Nesse processo, o pDNA é condensado pelos polímeros para formar nanoestruturas. Sendo que elevados tamanhos das partículas, podem estar associados à aglomeração de partículas devido à falta de qualquer mecanismo de estabilização esférica [76].

De notar que os investigadores Rungsardthong *et al.*, 2001 e Badi, 2017, descreveram resultados semelhantes aos descritos no presente trabalho, com nanopartículas de tamanhos entre 216 nm e 673 nm, se comparado a composição e concentração dos polímeros [77,78]. Relativamente à carga superficial das partículas, os resultados dos autores Morille *et al.*, 2008; Gaspar *et al.*, 2011 e Góis *et al.*, 2018, demonstram a síntese de partículas para encapsulação de pDNA, com cargas positivas de cerca de 20 a 30 mV. Esta é uma característica importante, que influencia não apenas as interações partícula-membrana celular, mas também a estabilidade da partícula. De facto, não apenas o tamanho da partícula, mas a densidade de carga, influencia a entrega do gene, uma vez que as nanopartículas também devem conseguir interagir com a membrana celular para serem internalizadas, o que pode ocorrer devido a algumas interações eletrostáticas envolvendo proteoglicanos carregados negativamente na membrana celular e partículas carregadas positivamente [73,76,79].

4.4. Liberação de pDNA

Para determinar o perfil de liberação do material genético complexado nos políplexos, foram realizados ensaios de liberação de pDNA, com os polímeros, concentrações e condições que conduziram às melhores eficiências de encapsulação, sendo eles o POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL, ambos em pH 4,5 e 7,4. Os resultados obtidos são esquematicamente apresentados na tabela 4, abaixo:

	mg/mL	Polímero	Condição	Taxa de recuperação (%)	
Solução Fosfato - pH: 7,4	0,5	[POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇]	0 horas	13,40	± 1,79
			30 minutos (rolo)	11,88	±0,48
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	10,75	±0,64
			0 horas	3,02	±0,78
			30 min (rolo)	7,80	±1,06
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	19,51	±2,46
	0,25	[POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄]	0 horas	9,34	±0,86
			30 minutos (rolo)	14,42	±4,22
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	19,53	±0,88
			0 horas	2,75	±0,62
			30 minutos (rolo)	12,70	±4,88
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	7,12	±3,60
Solução Acetato de sódio - pH: 4,5	0,5	[POEOMA ₂₂ - <i>b</i> -PDPA ₈₇]	0 horas	13,16	±2,38
			30 minutos (rolo)	12,23	±0,73
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	10,95	±1,69
			0 horas	11,90	±2,17
			30 minutos (rolo)	15,82	±5,63
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	8,24	±1,48
	0,25	[POEOMA ₂₈ - <i>b</i> -PDPA ₇₄]	0 horas	4,76	±2,23
			30 minutos (rolo)	7,97	±0,51
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	7,97	±0,51
			0 horas	4,25	±0,72
			30 minutos (rolo)	7,34	±1,60
			30 minutos (Temperatura Ambiente)	9,89	±0,63

Tabela 4 - Taxa de liberação do pDNA complexado nos polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL em pH 4,5 e pH 7,4, após 0h e 30 minutos de incubação, para ambos os polímeros e concentrações.

Ao observar os resultados dos ensaios de liberação (Tabela 4), compreende-se que os polímeros não apresentam taxas de liberação de pDNA significativas, variando entre 2,75% e 19,53%, para as condições testadas, nomeadamente após incubação das

nanopartículas em solução de pH 8. Assim, é possível concluir que existe uma libertação do material genético das nanopartículas, ainda que não tenha sido muito elevada nestas condições. Assim, se comprova que os polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e o POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ serão eficientes a proteger o pDNA, mas a sua libertação requer ainda estudos adicionais.

Alguns autores, como Cheng-Liang, *et al.*, 2010; Pearson, *et al.*, 2013, descreveram valores de libertação entre 5,83 - 5,96 % para POEOMA-*b*-PDPA, sugerindo que para um pH abaixo do pKa dos polímeros, os grupos amina estarão protonados, o que pode induzir o transporte do material genético para o citoplasma. Para valores de pH maiores que seu pKa, os polímeros tornam-se hidrofóbicos [80,81,82]. Também estes resultados de outros autores reforçam a necessidade de otimizar as condições de libertação do pDNA complexado pelos copolímeros.

4.5. Proteção de pDNA complexado nos poliplexos

O sucesso de um vetor de entrega de material genético depende da sua capacidade para proteger a sua carga. No caso em estudo, o pDNA complexa com os polímeros catiónicos por via de interações eletrostáticas entre os grupos amina presentes nos polímeros e os grupos fosfato constituintes do DNA. A formação de poliplexos permite assim estabelecer proteção e minimiza a degradação do material genético [83].

Sendo assim os complexos de pDNA – copolímeros devem proteger o pDNA condensado da ação de nucleases, e para obter essa confirmação foi realizado um estudo que envolve a incubação dos complexos em meio DMEM-F12 e DNase I. A justificação deste estudo é que as nanopartículas preparadas deverão ser capazes de resistir à atividade das nucleases que poderão estar presentes e que degradam o pDNA [76]. O resultado deste estudo é apresentado na figura 5.

Como referido anteriormente, para garantir que as nanopartículas preparadas protejam o pDNA encapsulado, é feita uma incubação com uma nucleasse específica (Dnase I) que tem uma alta capacidade de induzir a clivagem de DNA. No caso do controlo de pDNA em presença de DNase (Figura 5, poços D1, D2, D3 e D4) ocorre degradação do pDNA em todos os tempos de incubação estudados (30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas, respetivamente). No entanto, observou-se que o pDNA encapsulado com POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ (Figura 5, poços PD1, PD2, PD3 e PD4), não mostrou sinais de degradação pela Dnase, o que poderá indicar uma proteção eficaz e de longa duração do pDNA encapsulado.

Pelo contrário, no caso do controlo de pDNA em presença de meio DMEM (Figura 5, poços M1, M2, M3 e M4) a degradação do pDNA não é tão extensa como verificado na presença duma solução de DNase, apesar de aparentemente haver uma diminuição da intensidade da banda correspondente à isoforma superenrolada do pDNA (de notar que foi impossibilitado medir-se as concentrações do pDNA com e sem o meio DMEM devido à interferência deste nas leituras por Absorvância a 260nm nestas amostras). Na Figura 5 observa-se ainda no gel a degradação de pDNA das nanopartículas com POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ na presença do meio DMEM (poços PM1, PM2, PM3 e PM4), visualizado pelo arrastamento das bandas do pDNA. Assim, o meio DMEM parece induzir alguma libertação do pDNA das partículas que não acontecia anteriormente, no entanto o pDNA libertado não se encontra na sua isoforma superenrolada, que é biologicamente ativa. Os resultados permitem assim concluir que o polímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ é capaz de manter o pDNA encapsulado e protegido da ação de nucleases em solução, no entanto na presença de meio DMEM este é libertado para o exterior das nanopartículas sofrendo alguma degradação.

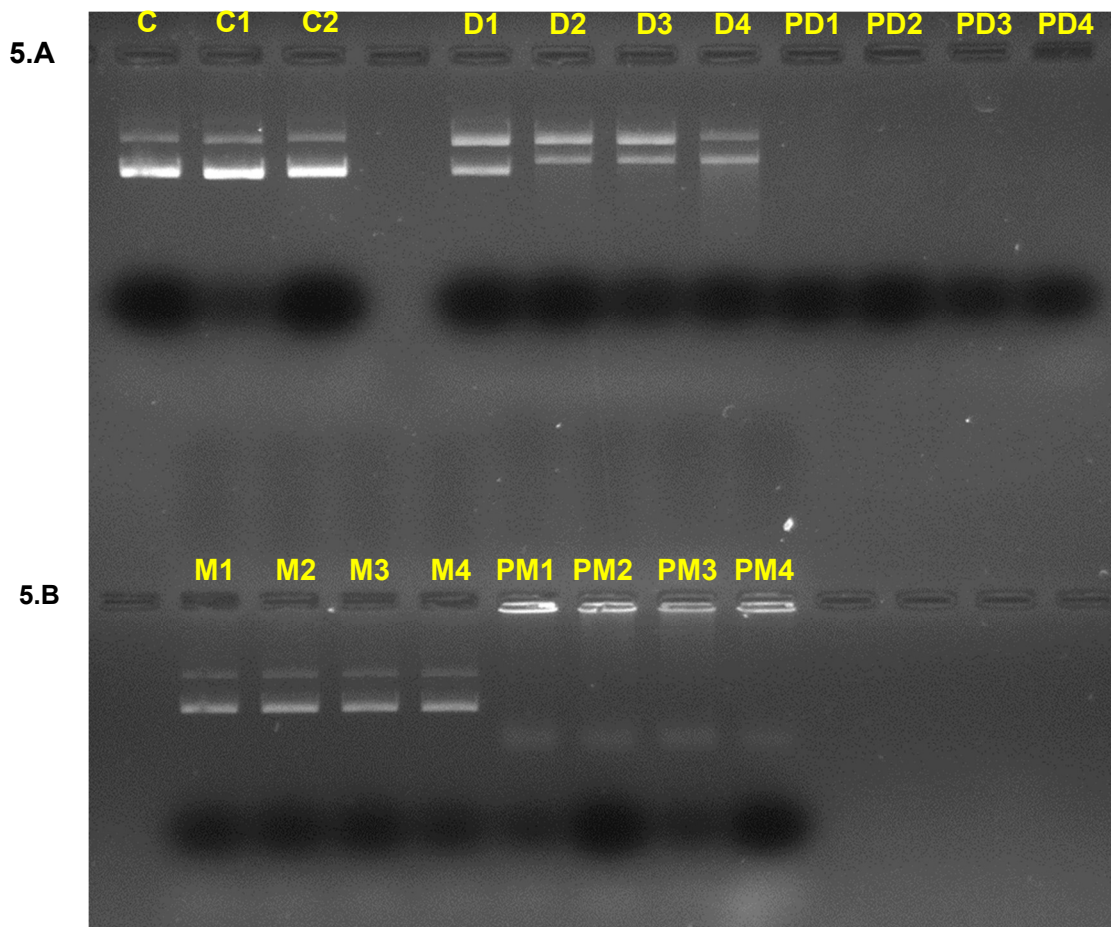


Figura 5 – Estudos de proteção de pDNA. **A:** gel com C: controlo pDNA em água milliQ; C1: pDNA em incubação a 37°C, 30 min; C2: pDNA em incubação a 37°C, 4 horas; D1 – D4: controlo pDNA em contacto com DNase a 37°C, por 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas, respetivamente. PD1- PD4: pDNA complexado com POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ 0,5 mg/mL em incubação com Dnase por 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas. **B:** gel com M1 – M4: controlo de pDNA incubado em DMEM a 37°C, durante 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas.

PM1 – PM4: pDNA complexado com POEOMA₂₈-b-PDPA₇₄ 0,5 mg/mL em meio DMEM incubado a 37°C durante 30 min, 1 hora, 2 horas e 4 horas.

4.6. Viabilidade celular

Este ensaio permite medir o potencial redutor das células, decorrente da produção de metabolitos durante o crescimento celular e, conseqüentemente, determinar a viabilidade celular. O uso de polímeros catiónicos, como sistemas de entrega de pDNA, pode representar alguma citotoxicidade, sendo esta uma das suas principais limitações. Por exemplo, a citotoxicidade induzida pelo polímero polietilenimina (PEI), *in vivo*, é devida à destabilização da membrana celular dos glóbulos vermelhos, que conduz à ativação de processos necróticos, apoptóticos e de autofagia, sendo influenciada por várias propriedades do polímero, tais como o peso molecular, a densidade de carga, e a estrutura. [84,85,86]. Portanto a avaliação da viabilidade celular após transfeção de células usando o pDNA encapsulado pelos copolímeros é de extrema importância, permitindo inferir sobre a segurança dos sistemas em estudo.

Sendo assim, é possível observar através da análise dos resultados representados na figura 6, a viabilidade celular associada à exposição de uma linha de fibroblastos humanos ao polímero POEOMA₂₈-b-PDPA₇₄.

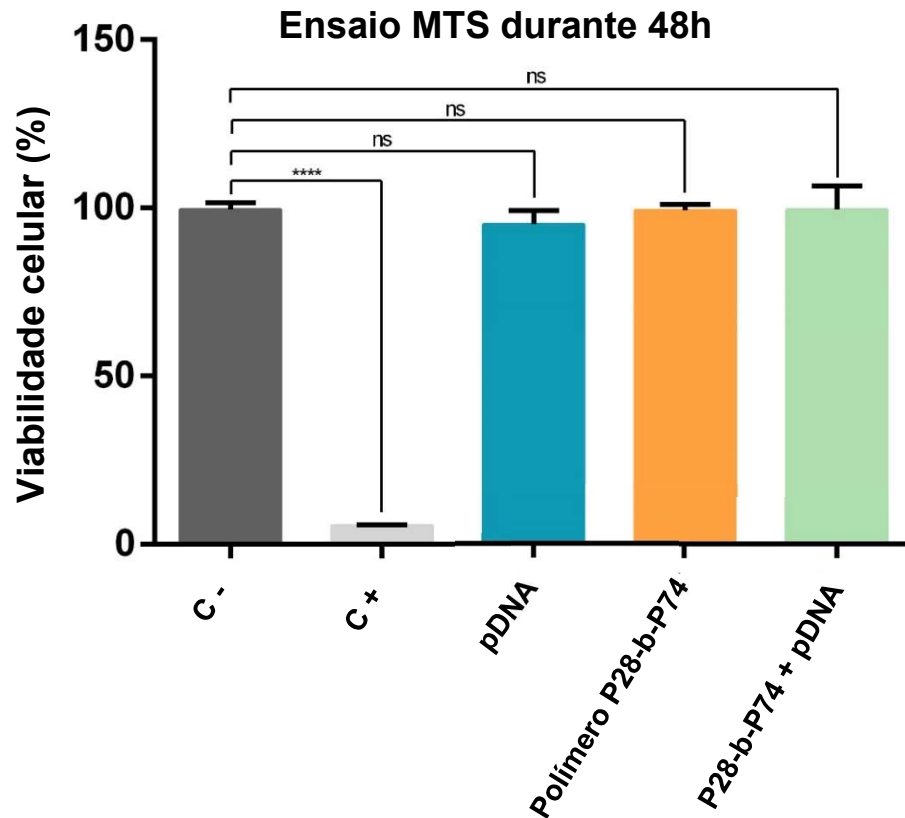


Figura 6 – Viabilidade celular (MTS em 48 horas). Células não tratadas (C-) e células tratadas com etanol (C+) foram usadas como controlos negativo e positivo, respetivamente. A percentagem de viabilidade é expressa em relação às células de controlo. Os valores foram calculados com os dados obtidos em três medidas independentes (média \pm DP, n = 3). A análise estatística foi realizada usando “One-way ANOVA”. (ns = $p > 0,05$; **** $p \leq 0,0001$).

Segundo os resultados obtidos, não se verificou uma citotoxicidade significativa para o pDNA simples, para o POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, nem para o políplexo de POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ e pDNA, na linha celular de fibroblastos humano, obtendo-se uma viabilidade de 95%, 99% e 99,5%, respetivamente. Os resultados revelam alta viabilidade celular para o pDNA e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, independentemente se adicionados de forma isolada ou complexada. Portanto, ao contrário do que se poderia esperar, dado o uso de polímeros catiónicos, o copolímero POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, não obtiveram aumento da citotoxicidade, o que pode indicar que, além da capacidade de complexação do pDNA muito eficiente, as condições empregadas para sintetizar esses copolímeros em bloco garantem menor contaminação por cobre.

Estudos de viabilidade celular para sistemas de encapsulação de pDNA, como os descritos pelos autores Oh, K.J, *et al.*, 2007, revelaram resultados próximos dos valores aqui apresentados. Apesar de os sistemas serem diferentes, basearam-se na utilização de nanogéis do polímero POEOMA, sendo obtidos valores de viabilidade de 95%, corroborando a segurança dos sistemas encontrada no presente trabalho. Também

estudos anteriores do nosso grupo de investigação, revelaram resultados de viabilidade entre 95% a 100%, para pDNA complexado com POEOMA ^[55,76].

CAPÍTULO 5

5. Conclusão e perspectivas futuras

A terapia génica é reconhecida como um grande avanço da medicina molecular, por permitir o tratamento da doença ao nível genético. Seu objetivo principal é inserir material genético exógeno em células ou tecidos específicos do paciente a fim de tratar doenças genéticas. Neste contexto, o desenvolvimento de sistemas de entrega de genes surge como o principal desafio para sua aplicação clínica. Os sistemas não-virais de base polimérica para a entrega de material genético são considerados uma excelente opção dada a sua segurança, e facilidade com que a sua estrutura pode ser alterada, através da engenharia de polímeros.

O presente trabalho introduz um sistema de entrega de material genético, através da síntese de nanopartículas poliméricas baseadas em copolímeros de diblocos anfífilos, sendo abordados e estudados os polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄, com o objetivo de encontrar a melhor opção para proteger e encapsular DNA plasmídico de uma forma simples e eficaz, podendo assim ser usado em futuras aplicações terapêuticas. Para isso se concretizar, os polímeros foram submetidos a diferentes estudos, com o objetivo de avaliar o seu potencial de utilização através da determinação da eficiência de encapsulação de pDNA, a viabilidade celular, determinação do tamanho e carga superficial, e a libertação e proteção conferida ao pDNA pelas nanopartículas desenvolvidas.

Os polímeros POEOMA₂₂-*b*-PDPA₈₇ e POEOMA₂₈-*b*-PDPA₇₄ em concentrações de 0,25 e 0,5 mg/mL, foram os que mais se destacaram durante o estudo da eficiência de encapsulação, sendo obtidos valores de cerca de 80%, dependendo de seu peso molecular, sua composição e concentração. As nanopartículas apresentaram, na sua grande maioria, cargas positivas, mas os polímeros ficam menos carregados positivamente com o aumento do pH, no caso pH 7,4, usado em estudo. Notou-se ainda que a morfologia das nanopartículas em pH de 4,5 se apresentaram mais esféricas e uniformemente distribuídas se comparadas com pH 7,4 em que se encontraram menos esféricas e com aparência mais oval. Os resultados mostraram ainda que os polímeros de POEOMA-*b*-PDPA, forneceram alguma proteção ao pDNA contra constituintes do ambiente celular, e não revelaram citotoxicidade. Globalmente, os estudos realizados com os polímeros POEOMA-*b*-PDPA, descritos nessa dissertação, demonstraram o potencial dos sistemas para a encapsulação e proteção de pDNA, de forma mais fácil e eficaz.

Para o melhor desenvolvimento dos trabalhos futuros com polímeros, alguns estudos já exploraram a possibilidade de usar iniciadores terminados em alcino para SARA

(Ativador suplementar e agente redutor) ATRP (Polimerização radicalar por transferência de átomos ^[87,88]), que permitirá a funcionalização das nanopartículas preparadas com copolímeros POEOMA-*b*-PDPA, para promoverem o direcionamento ativo do pDNA e aumentar a eficiência da terapêutica, algo relevante para os estudos biomédicos.

Considerando os resultados obtidos, de futuro será igualmente importante compreender melhor o mecanismo de adsorção e liberação do pDNA pelos políplexos, de forma a otimizar as condições, garantindo a proteção do material genético, mas também a sua liberação eficaz na célula. Dado o caráter sensível ao pH destes sistemas, será igualmente relevante estudar a sua aplicação em ambientes que variam no pH (intra e extracelular) para averiguar o comportamento dos sistemas nestas condições biológicas. Estes estudos implicam a realização de ensaios *in vitro* em linhas celulares de diferentes tipos, que permitam analisar a eficiência da transfeção dos sistemas. Os ensaios celulares futuros devem igualmente basear-se na avaliação da bioatividade do pDNA. Assim, devem realizar-se estudos que verifiquem a expressão da proteína codificada no pDNA, após transfeção. No geral, estes estudos permitirão concluir acerca do propósito da produção de sistemas de entrega, confirmando a proteção, e entrega do pDNA às células, garantindo a manutenção da sua atividade biológica ^[83,89,90,91].

Uma outra perspetiva futura, e de forma a ampliar a aplicabilidade dos sistemas, seria também a avaliação da eficiência dos sistemas baseados em POEOMA-*b*-PDPA no transporte de outros ácidos nucleicos (como RNA, siRNA, entre outros), além do estudo realizado com pDNA, abordado no presente trabalho.

CAPÍTULO 6

6. Referências bibliográficas

- [1] Tebas P. et al., “Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV”. *N Engl J Med*, vol.370, no 10. p.901-10, 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1300662.
- [2] Ginn S.L. et al., “Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—an update”, *J. Gene Med*, vol.15, no 2. p.65–77, 2013, doi: 10.1002/jgm.2698.
- [3] Mintzer M.A. e Simanek, E.E. “Nonviral Vectors for Gene Delivery”. *Chemical Reviews*, vol.109, no 2. p. 259-302, 2009, doi: 10.1021/cr800409e.
- [4] Moss, J.A. “Gene therapy review”. *Radiol Technol*. Vol. 82, no 3. p.155-80-4, 2014, doi:10.1038/nrmicro2882.
- [5] Ibraheem, D. et al., “Gene therapy and DNA delivery systems”. *Int J Pharm*, vol. 459, no 1-2, p.70-83, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.
- [6] Harrington, J.J et al., “Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes”. *Nature Genetics*, vol.15, no 4, p. 345-355, 1997, doi: 10.1038/ng0497-345.
- [7] Han, Y. et al., “Using DNA as a drug - Bioprocessing and delivery strategies”. *Chemical Engineering Research and Design*, vol.87, no 3. p.343–348, 2009, doi: 10.1016/j.cherd.2008.09.010
- [8] Sousa, F. et al., “Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA”. *Trends in Biotechnology*, vol.26, no 9. p. 518–525, 2008, doi: 10.1016/j.tibtech.2008.05. 005.1b
- [9] M. M., Diogo. et al., “Chromatography of plasmid DNA”. *Journal of Chromatography A*, vol. 1069, no 1, p.3-22, 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2004.09.050.
- [10] Ferreira, G. N. M et al., “Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications”, *Trends Biotechnology*, vol.18, no 9, p. 380– 388, 2008, doi: 10.1016/s0167-7799(00)01475-x.
- [11] Prather, K. J. et al., “Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification”. *Enzyme and Microbial Technology*, vol.33, p. 865–883, 2008, doi:10.1016/S0141-0229(03)00205-9
- [12] Liu M. A e Ulmer.J. B. “Human Clinical Trials of Plasmid DNA Vaccines”. *Advances in Genetics*, vol.55, p.25–40, 2005, doi: 10.1016/S0065-2660(05)55002-8.

- [13] Sousa, Â. et al., “Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification”. *Journal of Separation Science*, vol.35, no 22, p.3046-58, 2012, doi: 10.1002/jssc.201200307.
- [14] Pereira, P. et al., “Smart micelleplexes as a new therapeutic approach for RNA delivery”, *Expert Opin.Drug Deliv.*, vol. 14, no 3, p.353–371, 2017, doi: doi.org/10.1080/17425247.2016.1214567
- [15] Vannucci, L. et al., “Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology”. *New Microbiol*, vol.36, no 1, p.1-22, 2013.
- [16] Coura, R., “Viral vectors in neurobiology: therapeutic and research applications”. In: Adoga MP, editor. *Molecular virology*. Shanghai: InTech. Capítulo 5; p. 75-93, 2012.
- [17] Miller, AD. “Nonviral delivery systems for gene therapy”. In: Lemoine NR, editor. *Understanding gene therapy*. London: Bios Scientific Publishers; p. 172, 2001.
- [18] Romano, G et al., “Latest development in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications”. *Stem Cells*, vol.18, no. 1, p.19-39, 2000, doi: 10.1634/stemcells.18-1-19.
- [19] Kamimura, K. et al., “Advances in Gene Delivery Systems”. *Pharm Med*. Vol. 25, no 5, p.293–306, 2011, doi: 10.2165/11594020-000000000-00000.
- [20] Nouri Nayerossadat, T.M., et al., “Viral and nonviral delivery systems for gene delivery”. *Advanced Biomedical Research*, vol.1, p.27, 2016, doi: 10.4103/2277-9175.98152
- [21] Coune, PG. et al., “Parkinson's disease: gene therapies”. *Cold Spring Harb Perspect*, vol. 2, no.4, 2012, doi: 10.1101/cshperspect. a009431
- [22] Larrick, JW. e Burck, KL. “Gene Therapy”. New York: Elsevier, p. 281, 1991.
- [23] Chira, S. et al., “Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors”. *Oncotarget*. Vol.6, no 31, p.30675-703, 2015, doi: 10.18632/oncotarget.5169.
- [24] MacRae, E. J et al., “Gene therapy for Prostate Cancer: Current strategies and new cell-based Approaches”. *Human Therapy*, vol. 10, no 7, p. 470-494, 2006, doi: doi.org/10.1089/10430349950018229
- [25] Ramamoorth, M. e Narvekar, A. “Non viral vectors in gene therapy - an overview”. *J Clin Diagn Res*. vol. 9, no 1 p.1-6. doi: 10.7860/JCDR/2015/10443.5394
- [26] Naim, C. et al., “Gene therapy for heart failure: where do we stand?”. *Curr Cardiol Rep*. vol.15, no 2, p. 333, 2013, doi: 10.1007/s11886-012-0333-3

- [27] Wang, W. et al., “Non-viral gene delivery methods”. *Curr Pharm Biotechnology*. Vol.14, no 1, p.46–60, 2013, doi: 10.2174/1389201011314010008.
- [28] Li, L. et al., “Polymeric Nanocarriers for Non-Viral Gene Delivery”. *J Biomed Nanotechnology*. vol.11, no 5, p.739–70, 2015, doi: 10.1166/jbn.2015.2069
- [29] Kobayashi, N. et al., “Gene delivery to embryonic stem cells”. *Birth Defects Res Part C Embryo Today*. Vol 75, no 1, p.10-18, 2005.
- [30] Goodwin, T. e Huang, L., “Nonviral vectors: we have come a long way”. *Advances in Genetics*, vol. 88, p.1-12, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-800148-6.00001-8.
- [31] Mellott, A. et al., “Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering”. *Ann Biomed Eng.*, vol. 41, no 3, p. 446-468, 2012, doi: 10.1007/s10439-012-0678-1
- [32] Santos et al., “Síntese e caracterização de novos copolímeros fosforilados”, *polímeros 25 (spe)*, vol. 25, p. 19-24, 2015, doi: dx.doi.org/10.1590/0104-1428.1636.
- [33] Barros, W. M., “Síntese e análise de copolímeros de 2-ciano-3-fenil-prop-2-enamida com estireno”, Instituto de química, 2018.
- [34] Cowie, J. M. G. e Arrighi, V, et al., “Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials”, Third Edition. CRC Press, p.520, 2007.
- [35] Nair, L. S. e Laurencin, C. T., “Biodegradable Polymers as Biomaterials”. *Progress in Polymer Science*, vol. 9, no 9, p. 762-798, 2007, doi: dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [36] Kotwal, V. B., et al., “Biodegradable Polymers: Which, When and Why?” *Indian J. Pharmaceut. Sci.*, vol. 69, no 5, p.616, 2007, doi: 10.4103/0250-474X.38465.
- [37] Asane, G. S., et al., “Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status”, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 34, no.11, p.1246, 2008, doi: 10.1080/03639040802026012.
- [38] Andrews, G. P., et al., “Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery”, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no 3, p.505, 2009, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.09.028.
- [39] Cunha., et al., “Aplicação farmacêutica de polímeros”, *Ciência e tecnologia*, vol. 20, no 1, p. 51-64, 2010, doi: dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009.

- [40] Lin, C. e Metters, A. T, “Drug Delivery: An Integrated Clinical and Engineering Approach”, *Adv. Drug Delivery*, p.1379, 2008.
- [41] Vilanova, J.C.O e Oréface, R. L. “Aplicações Farmacêuticas de Polímeros”, *Ciência e tecnologia*, vol. 20, no 1, p. 51-64, 2010, doi: [dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009](https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009)
- [42] Börner, H. G. e Schlaad, H., “Bioinspired functional block copolymers *Soft Matter*”, vol. 3, p.394, 2007, doi: doi.org/10.1039/B615985K
- [43] Coelho. M. R. G., et al., “Síntese de copolímeros em bloco com propriedades líquido cristalinas”, *Quim. Nova*, vol. 30, no.3, 2007, doi: doi.org/10.1590/S0100-40422007000300025.
- [44] Kumar, G., et al., “Synthesis of thermo-responsive glycopolymers via copper catalysed azide–alkyne ‘click’ chemistry for inhibition of ricin: the effect of spacer between polymer backbone and galactose”, *J. Polym. Vol.* 2, no 18, p. 1879-1886, 2011, doi: [10.1039/C1PY00048A](https://doi.org/10.1039/C1PY00048A).
- [45] Canevarolo, S. V., “Ciência dos Polímeros – Um Texto Básico para Tecnólogos e Engenheiros”. Artliber Editora, 2010.
- [46] Callister, W. D. *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*. 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
- [47] Brewer, E., et al., “Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery”. *Journal of Nanomaterials*, vol. 201, 2011. doi: [doi:10.1155/2011/408675](https://doi.org/10.1155/2011/408675)
- [48] Kamigaito, M., “Recent developments in metal-catalyzed living radical polymerization”. *Polym J*, vol. 43, no. 2, p.105-120, 2011, doi: doi.org/10.1038/pj.2010.113
- [49] Sant, V.P., et al., “Novel pH-sensitive supramolecular assemblies for oral delivery of poorly water-soluble drugs: preparation and characterization”. *Journal of Controlled Release*, vol.97, no.2, p.301-312, 2004, doi: [10.1016/j.jconrel.2004.03.026](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.03.026).
- [50] Yusa, S., et al., “Preparation and characterization of a pH-responsive nanogel based on a photo-cross-linked micelle formed from block copolymers with controlled structure”. *Langmuir*, vol.25, no.9, p.5258-65, 2009, doi: [10.1021/la803878s](https://doi.org/10.1021/la803878s)
- [51] Hu, Y.Q., et al., “Synthesis and pH-dependent micellization of 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate based amphiphilic diblock copolymers via RAFT polymerization”. *Polymer*, vol. 48, no.12, p.3437-3443, 2007, doi: doi.org/10.1016/j.polymer.2007.04.011

- [52] Wang, Z.-K., et al., "Preparation of biocompatible nanocapsules with temperature-responsive and bioreducible properties". *Journal of Materials Chemistry*, vol.2, no. 40, p.15950-15956, doi: doi.org/10.1039/C1JM12570B.
- [53] Hyun, J., et al., "Universal Route to Cell Micropatterning Using an Amphiphilic Comb Polymer". *Advanced Materials*, vol.15, no.7, p.576-579, 2003, doi: 10.1002/adma.200304496.
- [54] Chen, Y., et al., "Atom transfer radical polymerization directly from poly (vinylidene fluoride): Surface and antifouling properties". *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol.44, no.11, p.3434-3443, 2006, doi: doi.org/10.1002/pola.21456
- [55] Oh, J.K., et al., "Biodegradable Nanogels Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization as Potential Drug Delivery Carriers: Synthesis, Biodegradation, in Vitro Release, and Bioconjugation". *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no.18, p.5939-5945, 2007, doi: 10.1021/ja069150l.
- [56] Tao, L., et al., "α-Aldehyde Terminally Functional Methacrylic Polymers from Living Radical Polymerization: Application in Protein Conjugation "Pegylation". *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no.41, p. 13220-13221, 2004, doi: 10.1021/ja0456454.
- [57] Reyes-Ortega, F., et al., "Smart heparin-based bioconjugates synthesized by a combination of ATRP and click chemistry". *Polymer Chemistry*, vol. 4, no. 9, p.2800-2814, 2013, doi: doi.org/10.1039/C3PY00055A.
- [58] Adams, M.L., et al., "Amphiphilic block copolymers for drug delivery". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 92, no.7, p. 1343-1355, 2003, doi: doi.org/10.1002/jps.10397.
- [59] Reis., "Development of amphiphilic block copolymers for gene delivery applications", Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2016.
- [60] Yao, Y., et al., "Influence of block sequences in polymer vectors for gene transfection in vitro and toxicity assessment of zebrafish embryos in vivo". *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no.12, p.4538-4545, 2011, doi: doi.org/10.1039/CoJM03728A.
- [61] Topuzogullari, M., et al., "pH- and temperature-responsive amphiphilic diblock copolymers of 4-vinylpyridine and oligoethyleneglycol methacrylate synthesized by RAFT polymerization". *Polymer*, vol. 55, no.2, p. 525-534, 2014, doi: doi.org/10.1016/j.polymer.2013.12.040

- [62] Hu, J., et al., “Stimuli-responsive tertiary amine methacrylate-based block copolymers: Synthesis, supramolecular self-assembly and functional applications”. *Progress in Polymer Science*, vol. 39, no.6, p.1096-1143, 2014, doi: doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.10.006
- [63] Gois, J.R., et al., “Improvement of the control over SARA ATRP of 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate by slow and continuous addition of sodium dithionite”. *Polymer Chemistry*, 2014, vol. 5, no. 16 p. 4617-4626, 2014, doi: doi.org/10.1039/C4PY00561A
- [64] Yu, H., et al., “Intracellular pH-activated PEG-*b*-PDPA wormlike micelles for hydrophobic drug delivery”. *Polymer Chemistry*, vol. 4, no. 19, p. 5052-5055, 2013, doi: doi.org/10.1039/C3PY00849E.
- [65] Zhou, K., et al., Tunable, “Ultrasensitive pH-Responsive Nanoparticles Targeting Specific Endocytic Organelles in Living Cells”. *Angewandte Chemie-International Edition*, vol, 50, no. 27, p. 6109-6114, 2011, doi: 10.1002/anie.201100884.
- [66] Zhou, K., et al., “Multicolored pH-Tunable and Activatable Fluorescence Nanoplatfrom Responsive to Physiologic pH Stimuli”. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 18, p. 7803-7811, 2012, doi: 10.1021/ja300176w.
- [67] Wang, Y., et al., “A nanoparticle-based strategy for the imaging of a broad range of tumours by nonlinear amplification of microenvironment signals”. *Nat Mater*, vol. 13, no. 2, p. 204-212, 2014, doi: doi.org/10.1021/ja300176w
- [68] Jager, A., et al., “Nanoparticles of the poly([N-(2-hydroxypropyl)] methacrylamide)-*b*-poly [2 (diisopropylamino)ethylmethacrylate] diblock copolymer for pH-triggered release of paclitaxel”. *Polymer Chemistry*, vol. 6, no. 27, p.4946-4954, 2015, doi: doi.org/10.1039/C5PY00567A.
- [69] Canuto, K.M., et al., “Preparação de Nanocápsulas Poliméricas para Visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura”. *Comunicado Técnico* 212, p. 1679-6535, 2015.
- [70] Ferrari et al., “Microscopia eletrônica aplicada em nanomateriais: catalisador sol-gel CUO/ZNO/AL₂O₃”, *Braz. Ap. Sci. Rev.Curitiba*, vol. 3, no. 6, p. 2718-2738, 2019, doi: 10.34115/basrv3n6-036
- [71] Dunlap D, et al., “Nanosopic structure of DNA condensed for gene delivery”, *Nucleic Acids Res.* vol. 25, no.15, p. 3095–3101, 1997, doi: 10.1093/nar/gkm165
- [72] Chithrani, B., Chan, W., “Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and

- shapes”, *Nano Lett.* vol. 7, p. 1542–1550, 2007, doi: doi.org/10.1021/nl070363y
- [73] Gaspar, V.M., et al., “Nanoparticle mediated delivery of pure P53 supercoiled plasmid DNA for gene therapy”. *Journal of Controlled Release*, vol. 156, no. 2, p. 212-222, 2011, doi://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.007
- [74] Park, T.G., et al., “Current status of polymeric gene delivery systems”. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, no. 4, p. 467-486, 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.03.007
- [75] Guo, S., et al., “Poly(ϵ -caprolactone)-graft-poly (2- (N, N-dimethylamino) ethyl methacrylate) nanoparticles: pH dependent thermo-sensitive multifunctional carriers for gene and drug delivery”. *Journal of Materials Chemistry*, vol. 20, no. 33, p. 6935-6941, 2010, doi: doi.org/10.1039/CoJM00506A.
- [76] Góis, R. J et al., “Preparation of well-defined brush-like block copolymers for gene delivery applications under biorelevant reaction conditions”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 169, p. 107-117, 2018, doi: doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.05.004.
- [77] Rungsardthong, U., et al., “Copolymers of amine methacrylate with poly(ethyleneglycol) as vectors for gene therapy”, *Controlled Release*, vol. 73, no. 2-3, p. 359–380, 2001, doi: 10.1016/S0168-3659(01)00295-4
- [78] Badi, N., “Non-linear PEG-based thermoresponsive polymer systems”, *Prog.Polym. Sci.*, vol. 66, p. 54–79, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.006
- [79] Morille, M. et al., “Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer”, *Biomaterials*, vol. 29, no.23-24, p. 3477–3496, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.036
- [80] Cheng-Liang, P., et al., “Development of pH sensitive 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate-based nanoparticles for photodynamic therapy”. *Nanotechnology*, vol. 21, no. 15, p. 155-103, 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/15/155103
- [81] Pearson, R.T., et al., “Effect of pH and Temperature on PMPC–PDPA Copolymer Self-Assembly”. *Macromolecules*, vol. 46, no. 4, p. 1400-1407, 2013, doi: https://doi.org/10.1021/ma302228m.
- [82] Lomas. H., et al., “Biomimetic pH Sensitive Polymersomes for Efficient DNA Encapsulation and Delivery”, *Advanced materials*, vol. 19, p. 4238-4246, 2008, doi: DOI: 10.1002/adma.200700941

- [83] Prabhu, R.H., et al., “Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights”. *Int.J.Nanomedicine*, vol. 2, no.10, p.1001-1018, 2015, doi:10.2147/IJN.S56932.
- [84] Aied, A., et al., “Polymer gene delivery: Overcoming the obstacles”. *Drug Discov.* vol.18, no.21-22, p.1090–1098, 2013, doi: 10.1016/j.drudis.2013.06.014
- [85] Fischer, D., et al., “In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis”. *Biomaterials*, vol. 24, no.7, p.1121–31, 2003, doi: doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00445-3.
- [86] Moghimi, S. M. et al., “A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/therapy”. *Mol. Ther.*, vol. 11, no.6, p. 990–995, 2005, doi: 10.1016/j.ymthe.2005.02.010.
- [87] Braunecker, W.A. e Matyjaszewski, K. “Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives”. *Progress in Polymer Science*, vol. 32, no.1, p.93-146, 2007, doi: doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.11.002.
- [88] Mendonça, P. V, et al., “Ambient temperature rapid ATRP of methyl acrylate, methyl methacrylate and styrene in polar solvents with mixed transition metal catalyst system”. *European Polymer Journal*, vol. 47, no.7, p. 1460-1466, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.03.014>
- [89] Massignani, M., et al., “cellular uptake by surface chemistry, size, and surface topology at the nanoscale”, *Small*, vol. 5, no. 24, p. 24-32, 2009, doi: 10.1002/smll.200900578.
- [90] Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [91] Cordeiro, R. A., et al., “Novel cationic triblock copolymer of poly[2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]- block-poly (beta-amino ester)-block-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]: a promising non-viral gene delivery system”. *Macromolecular Bioscience*, vol. 15, no.2, p. 215- 228, 2015, doi: 10.1002/mabi.201400424