



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Construção de um vetor de expressão de Transtirretina

Vera Mónica de Almeida Xistra

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

Orientador: Prof. Doutor Cecília Santos
Co-orientador: Prof. Doutor Fani Sousa

Covilhã, Outubro de 2016

Dedicatória

Ao meu pai Fernando e à minha avó Manuela.

Amo-vos

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero deixar um agradecimento à Universidade da Beira Interior e, principalmente ao Centro de Investigação de Ciências da Saúde que me acolheu nesta etapa e que foi, muitas vezes, a minha segunda casa.

Quero agradecer também às Professoras Doutoras Cecília Santos e Fani Sousa não só pela orientação, mas também pela confiança que depositaram em mim durante o decurso deste trabalho. Foi muito importante ter sido integrada nos seus grupos de investigação que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Não posso deixar de agradecer às minhas colegas de laboratório: Patrícia Pereira, Ana Catarina e Joana Tomás pelos ensinamentos e apoio ao longo deste trabalho. Em especial agradeço à Joana Valente que para além de me transmitir conhecimentos me motivava com o seu positivismo e palavras de apoio e de força.

Quero, ainda, agradecer às minhas amigas: Margarida Santos, Adriana Oliveira e Inês Sousa pelo companheirismo e apoio durante este percurso. Quero deixar um especial agradecimento à Mariana Caetano, Carolina Madaleno e Ricardo Leitão que foram um grande pilar para mim pelo apoio, carinho, compreensão e tempo despendido comigo. Agradeço todos os momentos que passámos juntos, todas as palavras de apoio, todos os sorrisos que partilhámos, sem dúvida que ficarão guardados na minha memória e no meu coração.

Agradeço também à minha mãe Maria e ao meu padasto João que foram sem dúvida os grandes impulsionadores para a concretização dos meus sonhos. Agradeço, ainda, às minhas irmãs Andreia e Mariana, pelo apoio incondicional, por nunca me terem deixado baixar os braços quando as coisas não aconteciam como o esperado, pelos conselhos, por se manterem a meu lado nos bons e nos maus momentos. São o meu maior orgulho e amo-vos com todo o meu coração. Sei que sem vocês este momento não teria o mesmo sentimento, não teria o mesmo gosto de vitória.

Agradeço ao meu cunhado Márcio e aos meus sobrinhos Leonardo, Núria e Fernando, que, cada um à sua maneira, me apoiou e nunca desistiu de acreditar em mim.

E, por último, mas jamais menos essencial, um enorme, importante e especial agradecimento ao meu namorado Rui. Agradeço pelo apoio incondicional, pelas palavras meigas, pela compreensão, pela motivação diária que me dava, pelo tempo que “gastou” a ouvir-me e a aconselhar-me, pelas vezes que suportou o meu “mau-humor” e as minhas más fases, mas sobretudo agradeço por ter ficado ao meu lado quando eu mais precisava e, às vezes, menos merecia.

Resumo

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta, aproximadamente, 48 milhões de pessoas a nível mundial e caracteriza-se por alterações cognitivas, perda de memória e alteração comportamental derivadas da falência progressiva dos neurónios. Esta falência possui diversas causas sendo de evidenciar a agregação de péptido β -amilóide (AB) e a acumulação de agregados neurofibrilares da proteína Tau.

A transtirretina (TTR) é uma proteína cujas principais funções são: transporte, neuroprotecção e modulação, prevenindo a toxicidade do péptido AB. É sintetizada no fígado e no plexus coróide.

A terapia génica tem um potencial relevante para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo a DA. Esta terapia é baseada na utilização de vetores de expressão que são inseridos em sistemas de entrega e introduzidos em hospedeiros que traduzem esses fragmentos de DNA em proteínas promovendo a sua expressão e auxiliando no tratamento das patologias.

Com este projeto pretendeu-se construir um vetor de expressão não-viral que codifique para a TTR para utilização, como terapia génica, na DA. Este vetor foi nanoencapsulado com PEI e transfectado em células neuronais seguida de avaliação da expressão da TTR por Western Blot.

Tendo em conta os objetivos deste projeto, construiu-se o vetor pCAG-hTTR que foi replicado em *E.coli* DH5 α , purificado e inserido em nanopartículas formuladas com polietilenimina (PEI). A eficiência de encapsulação foi superior a 96% e o potencial zeta de $-35,43 \pm 0,38$ a $2,66 \pm 1,19$ mV. Posteriormente, as células N27 que não apresentaram produção endógena de TTR foram transfectadas com o vetor pCAG-hTTR encapsulado com PEI. O ensaio da viabilidade celular efetuado 48h após a transfecção mostrou que esta foi superior a 78% diminuindo significativamente nas 72h subsequentes à transfecção. A proteína total extraída das células transfectadas foi quantificada e analisada por western blot. Os resultados foram inespecíficos com marcação da TTR obtida até nos controlos negativos, sugerindo que o anticorpo utilizado não será o mais adequado ou uma transfecção ineficiente.

Em suma, pela primeira vez foi possível construir um vetor de expressão que codifique para a TTR com a finalidade de promover a sua expressão e criar um sistema de entrega de nanopartículas formuladas com PEI para promover a sua entrega às células alvo. Contudo, não foi possível confirmar a sua expressão nas células transfectadas nem a eficiência de transfecção.

Palavras-chave

Doença de Alzheimer, TTR, Vetores de Expressão, Terapia Génica, Nanopartículas, PEI

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that affects approximately 48 million people worldwide and is characterized by cognitive impairment, memory loss and behavioral changes derived from the progressive failure of neurons. This failure has several causes, highlighting the aggregation of β -amyloid peptide ($A\beta$) and the accumulation of neurofibrillary aggregates of tau protein.

Transthyretin (TTR) is a protein whose main functions are: transportation, neuroprotection and modulation, preventing the toxicity of $A\beta$ peptide. It is synthesized in the liver and choroid plexus.

Gene therapy has a significant potential for treatment of numerous diseases, including AD. This therapy is based on the use of expression vectors that are inserted into delivery systems and introduced into hosts which translate these DNA fragments in protein promoting its expression and aiding in the treatment of diseases.

This project was intended to construct a non-viral expression vector encoding for the TTR to use as gene therapy, against AD. This vector was nanoencapsulated with polyethyleneimine (PEI) and then transfected in neural cells followed by evaluation of the expression of TTR by Western blot.

Taking into account the objectives of this project, the pCAG-hTTR vector was constructed and replicated in *E. coli* DH5 α purified, and inserted into nanoparticles formulated with PEI. The encapsulation efficiency was greater than 96% and the zeta potential range from 35.43 ± 0.38 to 2.66 ± 1.19 mV. Then the N27 cell line which showed no endogenous production of TTR was transfected with the pCAG-hTTR vector encapsulated with PEI. The cell viability assay performed 48 hours after transfection showed that it was greater than 78% significantly decreases the 72h after transfection. Total protein extracted from transfected cells was quantified and analyzed by western blot. The results were nonspecific with TTR labeling obtained even in the negative controls, suggesting that the antibody used was not be the most suitable or that transfection efficiency was very low.

In short, it was possible to construct an expression vector coding for TTR for the first time with the purpose of promoting its expression and creating a delivery system formulated with PEI nanoparticles to target neuronal cells. However, it was not possible to confirm their expression in transfected cells nor its transfection efficiency.

Keywords

Alzheimer's disease, TTR, Expression Vectors, Gene Therapy, Nanoparticles, PEI

Índice

Capítulo 1- Introdução	24
1.1 Doença de Alzheimer	24
1.1.1 Características da doença de Alzheimer	24
1.1.2 O péptido β -amilóide e suas isoformas.....	24
1.2 Transtirretina	25
1.2.1 Características da Transtirretina	25
1.2.2 Funções e biossíntese da Transtirretina	26
1.3 Diagnóstico e Tratamento da doença de Alzheimer	27
1.4 Terapia Génica: Uma abordagem alternativa no tratamento da doença de Alzheimer	28
1.4.1 Terapia Génica.....	28
1.4.2 Vetores de expressão.....	31
1.4.3 Vetores Virais	31
1.4.4 Vetores não-virais	35
1.4.5 Obstáculos na terapia génica	36
1.4.7 Mecanismo de entrega de vetores de expressão	42
1.4.8 Sistemas de entrega e a doença de Alzheimer	42
1.5 Processo biotecnológico na preparação de vetores para terapia génica	44
Capítulo 2- Objetivos.....	46
Capítulo 3- Materiais e Métodos	47
3.1. Reagentes e equipamento	47
3.2 Construção do vetor de expressão pCAG-hTTR	47
3.3 Replicação do vetor pCAG-hTTR e sua recuperação.....	48
3.4 Fermentação	49
3.5 Recuperação do vetor de expressão pCAG-hTTR.....	49
3.6 Formação dos poliplexos.....	50
3.7 Determinação da eficiência de encapsulação do pCAG-hTTR	50
3.8 Determinação do potencial zeta das nanopartículas com pCAG-hTTR	51
3.8 Screening das linhas celulares.....	51
3.10 Cultura e Transfecção da linha celular N27	51
3.11 Avaliação da viabilidade celular	52
3.12 Avaliação da expressão da TTR	52
Capítulo 4- Resultados e Discussão.....	55
4.1 Construção do vetor de expressão da TTR.....	55

4.2 Produção no hospedeiro <i>E.coli</i> DH5 α	57
4.3 Recuperação do vetor pCAG-hTTR.....	58
4.4 Avaliação da eficiência de encapsulação e do potencial zeta.....	60
4.5 Screening de diferentes linhas celulares.....	65
4.6 Avaliação da viabilidade celular.....	66
4.7 Western Blot.....	68
Capítulo 5- Conclusões e Perspetivas Futuras.....	70
Capítulo 6- Bibliografia.....	73

Lista de Figuras

- Figura 1-** Representação esquemática da clivagem proteolítica que ocorre na DA. Adaptada de [12] 25
- Figura 2 -** Mecanismo de nucleação. Imagem adaptada de [14] 25
- Figura 3 -** Representação esquemática da estrutura tridimensional da Transtirretina (TTR). Adaptada de [17] 26
- Figura 4 -** Representação esquemática da síntese da TTR pelos hepatócitos e pelas células do plexus coróide, com posterior libertação e eventual perda da conformação tridimensional ocasionando a amiloidogénese. Imagem adaptada de [20] 27
- Figura 5 -** Representação do plasmídeo pCAG-GFP, com o local de múltipla restrição (XbaI; EcoRI; KpnI; XmaI; SmaI; AgeI; NotI; MscI; BglII; HindIII; StuI; FspI; SpeI), o gene de resistência à ampicilina, os primers que podem ser usados para a sua sequenciação (pCAG_F_primer; M13_reverse_primer) e ainda um gene que codifica para a EGFP que é uma proteína fluorescente [53] 35
- Figura 6 -** Representação esquemática das barreiras que o vetor tem que ultrapassar até chegar à célula alvo, in vivo. O vetor tem que passar para a corrente sanguínea e evitar a degradação pelas endonucleases e a deteção por parte do sistema imunitário (aqui representado pelo macrófago). Posteriormente, tem que extravasar para a matriz extracelular onde é reconhecido por recetores existentes na superfície celular ocorrendo a endocitose. Entretanto tem que sair do endossoma de modo a alcançar o núcleo da célula onde vai ser sujeito a todos os processos até à obtenção da proteína desejada. Adaptada de [56] 38
- Figura 7 -** Estrutura do quitosano (CS). Adaptada de [58] 39
- Figura 8 -** Representação esquemática da estrutura do polímero polietilenimina (PEI). Adaptada de [58] 40
- Figura 9 -** Processo de produção de um vetor com a finalidade de ser usado em células eucarióticas. Imagem adaptada de [71] 45
- Figura 10 -** Representação do plasmídeo pCAG-GFP, com o local de múltipla restrição (XbaI; EcoRI; KpnI; XmaI; SmaI; AgeI; NotI; MscI; BglII; HindIII; StuI; FspI; SpeI), o gene de resistência à ampicilina, os primers que podem ser usados para a sua sequenciação (pCAG_F_primer; M13_reverse_primer) e ainda um gene que codifica para a EGFP que é uma proteína fluorescente. Adaptada de [53] com ampliação no local da clonagem. 48
- Figura 11 -** Minipreps de pCAG-hTTR (MP). O vetor foi amplificado por PCR seguido de digestão com EcoRI e NotI para verificar a presença do insert. O Marcador de Peso Molecular (M) que foi usado foi o NZY DNALadder VIII (até 5000 pb). 56

Figura 12 - Alinhamento da sequência obtida pela sequenciação com a sequência da TTR humana (hTTR) usando o programa Clustal Omega. 57

Figura 13 - Curva de Crescimento da E.coli DH5 α durante o tempo de fermentação 58

Figura 14 - Maxiprep realizado para obtenção do vetor pCAG-hTTR. A1: amostra recolhida após a segunda centrifugação (lisado); A2: amostra recolhida após eluição do sobrenadante (espécies não retidas); A3: amostra recolhida após a primeira adição de QC (1^a lavagem); A4: amostra recolhida após a segunda adição de QC (2^a lavagem); F: amostra final. oc pDNA (forma circular aberta do pDNA); sc pDNA (forma superenrolada do pDNA) 59

Figura 15 - Amostras do sobrenadante após encapsulação do vetor com CS para os ratios N/P de 30 e 50 e para diferentes concentrações de DNA (5, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), realizando duplicados (A e B). Utilizou-se como negativo (N) uma amostra de vetor que não foi sujeito a encapsulação (5N, 10N e 15N) 61

Figura 16 - Amostras do sobrenadante após encapsulação do vetor com CS para o ratio N/P de 50 e para uma concentração de DNA de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, realizando triplicados (A, B, C). Utilizou-se como negativo (N) uma amostra de vetor que não foi sujeito a encapsulação 62

Figura 17 - Amostras do sobrenadante após encapsulação do vetor para os ratios N/P de 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 7,5 e 12,5. Usando como negativo (N) uma amostra de vetor que não foi sujeito a encapsulação e como marcador de pesos moleculares (M) o HyperLadder 1kb 63

Figura 18 - Eficiência de encapsulação dos poliplexos pDNA-PEI. As médias e desvios-padrão são apresentados (linhas verticais no gráfico) de três medições independentes (foram realizados triplicados) 64

Figura 19 - Screening dos cDNA pertencentes ao plexus coróide e a diferentes linhas celulares. KN: o PCR foi realizado usando a polimerase KAPA, sendo este o controlo. NN: o PCR foi realizado usando a polimerase Supreme, sendo este o controlo. Amostras 1 e 6: cDNA proveniente do plexus coróide. Amostras 2 e 7: cDNA da linha celular Z310. Amostras 3 e 8: cDNA da linha celular N27. Amostras 4 e 9: cDNA da linha celular N2A695 (48h). Amostras 5 e 10: cDNA da linha celular N2A695 (72h). O marcador de pesos moleculares (M) usado foi o GRS Ladder 50 bp 66

Figura 20 - Viabilidade celular das N27 avaliada 48h e 72h após a transfecção com diferentes ratios N/P de poliplexo: 1,5 (x1); 2 (x2); 2,5 (x3); 3(x4); 3,5 (x5); 7,5 (x6). O K⁻ é o controlo negativo, no qual as células não foram transfectadas e o K⁺ é o controlo positivo no qual as células morreram por adição de etanol a 70%. As médias e desvios-padrão são apresentados (linhas verticais no gráfico) de três medições independentes (foram realizados triplicados). Foi realizado o teste t-student e as diferenças estatísticas significativas entre cada ratio e o controlo negativo para essa hora (48h ou 72h) são apresentadas (* p<0,05; ** p<0,01; p<0,0001 para $\alpha = 0,05$) 67

Figura 21 - Amostras da proteína TTR extraída das células N27. O ratio apresentado é o de 7,5 e os K⁻ representam as células que não foram transfectadas. Foram realizados triplicados tanto para o ratio em estudo como para os controlos e este ensaio foi realizado em duplicado, sendo este resultado representativo de ambos. 68

Figura 22 - Marcação com o anticorpo α - β -actina. O ratio apresentado é o de 7,5 e os K⁻ representam as células que não foram transfectadas. Foram realizados triplicados tanto para o ratio em estudo como para os controlos e este ensaio foi realizado em duplicado, sendo este resultado representativo de ambos. 69

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sumário de estudos de terapia génica na DA. Adaptada de: [23]	29/30
Tabela 2 - Características gerais dos vetores virais [45-49]	32
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens do uso dos vetores virais [43-47]	33/34
Tabela 4 - Tamanhos de fragmento (gene) que podem ser inseridos nos vetores não-virais e respetivas vantagens e desvantagens [50]	36
Tabela 5 - Métodos de transfecção usados in vivo	37
Tabela 6 - Estruturas / tipos de sistemas de entrega disponíveis e respetivas características.	41
Tabela 7 - Potencial zeta médio para vários ratios N/P do poliplexo pCAG-hTTR-PEI. Os valores do potencial zeta foram calculados a partir dos dados obtidos de três medições independentes (média \pm DP, n=3)	65

Lista de Acrónimos

AAV	Vírus adeno-associados
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Protéina Percursora Amilóide
AB	Péptido β -amilóide
BAC	Cromossoma Artificial de Bateria
BBB	Barreira Hemato-Encefálica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
cDNA	DNA complementar
CS	Quitossano
CSF	Líquido Cefalorraquidiano
DA	Doença de Alzheimer
DO ₆₀₀	Densidade Ótica medida a um comprimento de onda de 600 nm
dsDNA	DNA de dupla cadeia
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	Eficiência de Encapsulação
FBS	Soro Fetal Bovino
gDNA	DNA genómico
GFP	Green Fluorescent Protein
HMW	Alto Peso Molecular
HSV	Vírus herpes simplex
hTTR	TTR humana
LB	Meio Luria-Bertani
LMW	Baixo Peso Molecular
MMSE	Mini-mental state examination
NEP	Neprilisina
NGF	Fator de crescimento do nervo
ocDNA	DNA na forma open
pDNA	DNA plasmídico
PEI	Polietilenimina
PET	Positron emission tomography
PLGA	Ácido Poli Láctico-co-Glicólico
PLL	Poli-L-Lisina
PnBCA	Poli n-butilcianoacrilato
RBP	Proteína de Ligação ao retinol
ROCK	Cinase associada à Rho
scDNA	DNA na forma superenrolada
ssDNA	DNA de cadeia simples
T4	Tiroxina
TB	Meio Terrific Broth
TTR	Transtirretina
YAC	Cromossoma Artificial de Levedura

Capítulo 1- Introdução

1.1 Doença de Alzheimer

1.1.1 Características da doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que surge maioritariamente em indivíduos com uma idade superior a 65 anos [1]. Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta patologia afeta, aproximadamente, 48 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo estimado que este número possa triplicar até 2050, afetando cerca de 136 milhões de pessoas. A patologia é mais prevalente na Europa, América e Ásia [2].

A doença de Alzheimer é caracterizada por diversos sintomas sendo de evidenciar as alterações cognitivas, perda de memória e alteração comportamental [3]. Tratando-se de uma doença neurodegenerativa, vai progredindo com a falência dos neurónios e, consequentemente, todas as funções a eles associadas vão regredindo.

Esta degeneração neuronal é caracterizada por danos sinápticos ao nível do neocórtex e do sistema límbico [3]. Como principais alterações, estão identificadas a acumulação de placas amilóides, causada pela agregação de péptido β -amilóide (A β), a acumulação de agregados neurofibrilares associada a alterações da proteína Tau como a hiperfosforilação, alterações conformacionais e clivagem proteolítica [4-6] e alterações da proteína Transtirretina (TTR) tanto ao nível conformacional como ao nível da sua expressão [1,7].

1.1.2 O péptido β -amilóide e suas isoformas

O péptido β -amilóide (A β) resulta da clivagem proteolítica sequencial da proteína precursora amilóide (APP) [8,9]. Este processo é essencialmente realizado por três secretases: α , β , γ que são enzimas que têm como função primordial a clivagem de proteínas que se encontram incorporadas na membrana celular que, neste caso, é a APP.

A clivagem realizada pela α -secretase e γ -secretase induz a formação do péptido P3 que é facilmente degradado no proteossoma. No entanto, se o processo de clivagem ocorrer mediante a atividade da β -secretase e γ -secretase há produção de diferentes isoformas do péptido A β , sendo de destacar as isoformas A β_{40} e A β_{42} (Figura 1) [8,9]. A isoforma A β_{40} é a mais abundante enquanto que a A β_{42} é a mais amiloidogénica devido ao facto de possuir uma taxa de agregação superior [9,10]. Em doentes que apresentam esta doença há um desequilíbrio entre a síntese, a agregação e a remoção deste péptido, ocorrendo no geral uma redução da taxa de remoção enquanto que a taxa de produção se mantém inalterada [3,11].

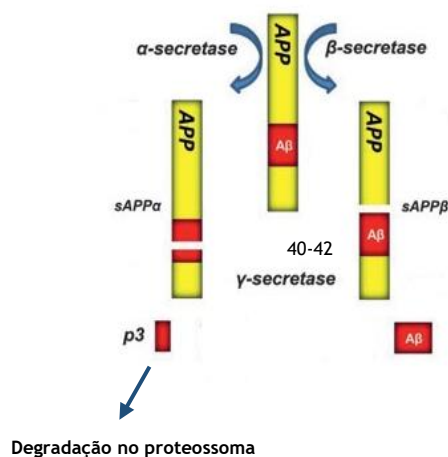


Figura 1: Representação esquemática da clivagem proteolítica que ocorre na DA. Adaptada de [12]

Os monómeros de A β polimerizam formando oligómeros, sendo estes últimos considerados as espécies intermediárias com maior grau de toxicidade [12]. Estes possuem uma morfologia esférica e, por sua vez, originam protofibrilas que se distinguem dos oligómeros pela sua forma alongada e linear, não sendo tão simétricas como as fibrilas às quais irão dar origem [13]. As fibrilas são consideradas biomarcadores desta patologia sendo a espécie final da via fibrilogénica e são caracterizadas por possuírem uma morfologia longa, fina e muito regular [13]. Este mecanismo, denominado mecanismo de nucleação (Figura 2), é influenciado quer pela concentração de monómeros de A β quer pela temperatura [14,15].

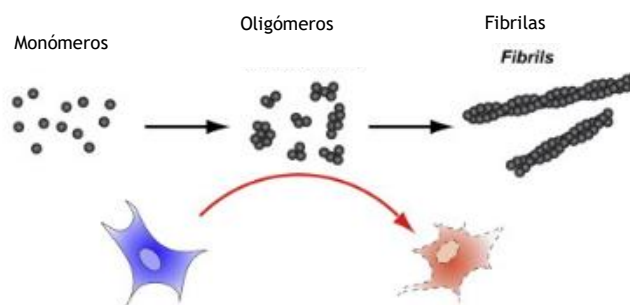


Figura 2: Mecanismo de nucleação. Imagem adaptada de [14]

1.2 Transtirretina

1.2.1 Características da Transtirretina

A transtirretina (TTR) é codificada por um gene localizado no cromossoma 18. É uma proteína homotetramérica, ou seja, é constituída por quatro subunidades iguais, com um peso

molecular global de 55 kDa e cujas subunidades têm um peso molecular de 14 kDa cada. As subunidades têm uma estrutura secundária de β -sandwich com quatro folhas β entrançadas (Figura 3) [7]. Duas folhas β antiparalelas interagem entre si por ligações intermoleculares originando um dímero. Entre dímeros são estabelecidas ligações hidrofóbicas e ligações por pontes de hidrogénio que permitem a formação do tetrâmero [7]. Contudo, o tetrâmero é uma espécie instável podendo dar origem aos monómeros que o constituem ou podendo perder a sua conformação tridimensional tornando a TTR amiloidogénica por si própria [11].

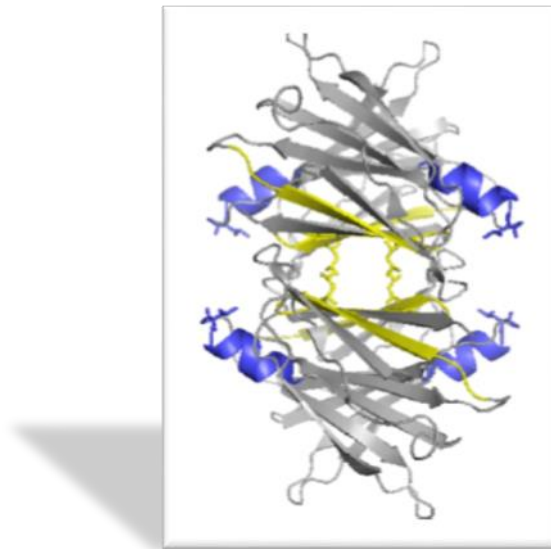


Figura 3: Representação esquemática da estrutura tridimensional da Transtirretina (TTR). Adaptada de [17]

1.2.2 Funções e biossíntese da Transtirretina

A TTR tem como principal função realizar o transporte da tiroxina (T4) e do retinol, sendo este último transportado através da associação com a proteína de ligação ao retinol (RBP). O transporte é executado no plasma e no líquido cefalorraquidiano (CSF) dependendo do local de síntese da TTR [16]

Caso seja sintetizada no fígado, pelos hepatócitos, então pode ser encontrada no plasma, se for sintetizada no plexo coróide do cérebro então a sua função de transporte é exercida no CSF (Figura 4), no qual representa 25% das proteínas que aqui se encontram e onde foi identificada, pela primeira vez, em 1942 [16,17]. A TTR é uma das proteínas mais abundantes do plasma com uma concentração de 160-350 mg/L e possui um tempo de meia-vida no sangue de 48h [18]. Além da sua função de transporte, a TTR tem outras funções nomeadamente como neuroprotetora e moduladora, já que previne a toxicidade do péptido AB e modula os seus níveis nas células neuronais [16]. A TTR tem a capacidade de sequestrar o péptido AB, através da sua ligação a domínios específicos encontrados neste péptido impedindo a sua agregação. No entanto a TTR também consegue quebrar fibrilas já formadas de péptido AB e a inibição da fibrilínogénese é alcançada pela ligação do tetrâmero da TTR

aos monómeros de A β . Tanto o tetrâmero como os monómeros ligam-se, por sua vez, aos oligómeros de A β [19,20]. Assim quando ocorre uma diminuição da concentração da TTR, a quantidade de depósitos de A β aumenta significativamente, enquanto que se a TTR se mantiver em níveis constantes esse aumento não ocorre e, conseqüentemente a formação de fibrilas também sofrerá uma redução [11,21]. Para além disso, em doentes com DA, os níveis da TTR encontram-se significativamente mais baixos em comparação com os níveis de uma pessoa saudável, podendo, assim, também ser considerada um biomarcador desta patologia [20,22,23].

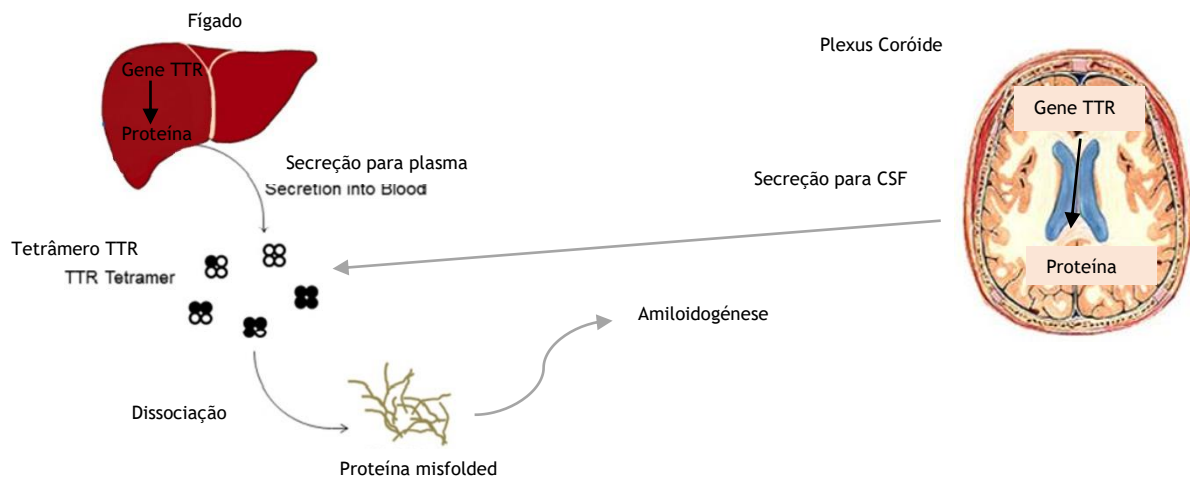


Figura 3: Representação esquemática da síntese da TTR pelos hepatócitos e pelas células do plexus coróide, com posterior libertação e eventual perda da conformação tridimensional ocasionando a amiloidogênese. Imagem adaptada de [20]

1.3 Diagnóstico e Tratamento da doença de Alzheimer

A DA pode ser diagnosticada através de alguns métodos, apesar de não serem totalmente rigorosos, como a realização de um exame do estado mental (Mini-mental state examination - MMSE) que se trata de um questionário que permite avaliar os danos cognitivos; a deteção da proteína Tau e do péptido A β no CSF através do teste de ELISA; ou a tomografia por emissão de positrões (Positron emission tomography - PET) para avaliar a existência de placas amilóides no cérebro do paciente [24]

Em relação ao tratamento, existem duas classes de fármacos disponíveis para o tratamento da DA: inibidores da acetilcolinesterase e a memantina (inibidor de receptores glutamatérgicos), mas estes fármacos só promovem o melhoramento dos sintomas por um curto período de tempo (6-8 meses) [2]. Por este motivo, estão em desenvolvimento estratégias terapêuticas para a doença em modelos animais como a administração de anticorpos específicos para os oligómeros de A β de modo a evitar a sua agregação; utilização de compostos que modulam ou interferem na produção do péptido A β [21,24] administração de compostos que promovem um aumento da concentração de TTR no plasma [25]. Contudo desconhece-se ainda a sua

viabilidade ao nível do cérebro humano. A maioria destes compostos utilizados nas terapias anteriormente descritas, são péptidos de tamanho reduzido, com uma elevada especificidade e afinidade e uma reduzida toxicidade [21,24]. Todavia, a utilização destes péptidos apresenta algumas desvantagens como o seu curto tempo de meia-vida; a dificuldade ao nível da entrega às células [21] e apenas têm a capacidade de aliviar os sintomas não estagnando a progressão da doença [26].

1.4 Terapia Génica: Uma abordagem alternativa no tratamento da doença de Alzheimer

1.4.1 Terapia Génica

A terapia génica é considerada uma estratégia promissora quer para o tratamento de doenças causadas por deficiências genéticas, quer no tratamento e prevenção de outros tipos de doenças, incluindo doenças neurodegenerativas como a DA [26].

A terapia génica tem sido exaustivamente estudada para avaliar a sua aplicabilidade a diversas patologias, sendo de destacar as doenças neurodegenerativas e, principalmente, na doença de Alzheimer com quatro tipos de alvos: neurotrofinas que promovem a atividade sináptica neuronal; enzimas responsáveis pela degradação do A β ; proteínas transportadoras do A β e proteínas envolvidas na síntese do A β (Tabela 1) [26].

Tabela 1: Sumário de estudos de terapia génica na DA. Adaptada de: [23]

Proteína	Função na DA	Terapia	Local de expressão	Efeito verificado após a expressão da proteína codificada no gene inserido no vetor	Referência
Fator de crescimento do nervo (NGF)	Neurotrófica e promoção da atividade sináptica	Construção de vetores retrovirais com o cDNA do NGF e transfeção de fibroblastos que são, posteriormente, inseridos no cérebro de animais, promovendo a expressão da proteína diretamente no local	Fibroblastos	Melhorias Cognitivas	[27]
				Proteção contra a atrofia do cérebro	[28]
				Proteção contra a degeneração das inervações colinérgicas	[29]
				Recuperação após lesões	[30]
				Melhorias Cognitivas	[31]
			Melhorias na memória	[32]	
		Construção de um plasmídeo tendo como <i>insert</i> o gene que codifica para o NGF. Como vetor foi usado um vírus adeno-associado, que foi seguidamente, injetado no cérebro dos animais.	Septo	Aumento da atividade sináptica	[33]
Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)	Neurotrófica e promoção da atividade sináptica	Construção de um lentivírus com o gene que codifica para o BDNF e, posterior injeção no cérebro de animais.	Córtex	Melhorias Cognitivas	[34]
Cinase associada à Rho (ROCK)	Efector da GTPase Rho responsável pela	Utilização de RNA de interferência (siRNA) para a proteína ROCK. Este	Neurónios corticais	Diminuição da neurotoxicidade do AB ₄₂	[35]

	promoção da sobrevivência celular e Regeneração Axonal	foi nanoencapsulado em PEI e injetado no cérebro de animais.			
Neprilisina (NEP)	Degradação do A β e Neuprotetora	Construção de um plasmídeo que inclui o cDNA da NEP e inserção num vírus adeno-associado. Este foi injetado no cérebro de animais.	Hipocampo	Redução de A β solúvel e o seu transporte	[36]
				Redução do transporte de A β e melhoria comportamental	[37]
				Redução de A β solúvel e o seu transporte e melhoria da memória	[38]
		Corrente Sanguínea	Redução do transporte de A β	[39]	
Apolipoproteína E (ApoE)	Metabolismo de lipoproteínas e transporte do A β	Utilização de lentivírus como vetor de expressão da ApoE injetado diretamente no cérebro dos animais	Hipocampo	Redução dos níveis de A β e do seu transporte	[40]
APP	Síntese de A β	Construção de um short hairpin RNA (shRNA) com o gene que codifica para a APP utilizando como vetor o Vírus Herpes Simplex e injeção no cérebro dos animais.	Hipocampo	Redução do transporte de A β	[41]

1.4.2 Vetores de expressão

Vetores de expressão são biomoléculas ou vírus que têm a capacidade de transportar DNA exógeno que codifica para uma determinada proteína. Estes vetores são inseridos em hospedeiros que replicam, transcrevem e traduzem esses fragmentos de DNA em proteínas promovendo a sua expressão, por este motivo são muito usados na terapia génica, pois essa expressão pode auxiliar no tratamento de determinadas patologias [42]. Os vetores são subdivididos em dois grupos principais: virais e não-virais [43].

1.4.3 Vetores Virais

Vetores virais são aqueles cuja construção tem por base um vírus. Existem cinco grupos principais: adenovírus, adeno-associados (AAV), retrovírus, lentivírus e vírus herpes simplex (HSV) [44]. Estes vetores têm sido os mais usados na terapia génica devido ao facto de possuírem uma elevada eficiência de transfecção e promoverem uma expressão mais duradoura. No entanto possuem algumas desvantagens como o transporte de uma quantidade reduzida de material genético e efeitos indesejáveis como toxicidade, imunogenicidade e mutagénese [43]. As características destes vetores estão sumariadas na tabela 2 bem como as vantagens e desvantagens associadas ao seu uso na tabela 3.

Tabela 2: Características gerais dos vetores virais [45-49]

	Tipo de Vetores Virais				
	Adenovírus	AAV	Retrovírus	Lentivírus	HSV
Material Genético	dsDNA	ssDNA	RNA	RNA	dsDNA
Tipo de Células que infeta	Células em divisão ou não	Células em divisão ou não	Só células em divisão	Células em divisão ou não	Células em divisão ou não incluindo neurónios
Tamanho do fragmento (gene) que pode ser inserido (kb)	7-8	< 5	8	8	30-50
Integração no genoma do hospedeiro ou Epissomal	Epissomal	Epissomal ou Integrado	Integrado	Integrado	Epissomal
Duração da expressão	Baixa	Elevada	Elevada	Elevada	Elevada
Problemas Imunológicos	Sim	Não	Não	Não	Sim

Tabela 3: Vantagens e desvantagens do uso dos vetores virais [43-47]

Tipos de Vírus	Vantagens	Desvantagens
Adenovírus	<p>Elevada eficiência de transfecção já que algumas proteínas à sua superfície se conseguem ligar a recetores existentes na superfície da célula</p> <p>Indicados para o tratamento de doenças que só necessitam de uma expressão mais transiente e não tão prolongada</p>	<p>Não há integração no genoma do hospedeiro o que origina uma expressão génica transiente</p> <p>Desencadeia respostas imunológicas o que contribui para a expressão génica de curta duração</p>
AAV	<p>Não é patogénico nem desencadeia respostas imunológicas</p> <p>Tem a capacidade de produzir uma expressão eficiente e duradoura em diferentes tipos de células</p>	<p>Produção em larga escala não é possível</p> <p>A integração no genoma do hospedeiro pode ser aleatória podendo originar problemas mutagénicos</p> <p>Pode não apresentar ação se os doentes sujeitos ao tratamento já tiveram contato prévio com o vírus</p> <p>Necessita de outro vírus (vírus helper) para se conseguir replicar</p>

Tabela 3: Continuação

Tipos de Vírus	Vantagens	Desvantagens
Retrovírus	Elevada eficiência de transfecção já que ocorrem interações entre o seu envelope e recetores existentes na superfície da célula	<p>Não consegue infetar células que não se encontrem em divisão, por esse motivo o seu uso em neurónios não é possível</p> <p>A sua integração no genoma do hospedeiro pode ser aleatória podendo causar mutações indesejadas</p>
Lentivírus	<p>Não produz uma resposta imunológica significativa</p> <p>Possui uma elevada expressão em muitos tecidos</p>	<p>Risco de imunogenicidade</p> <p>Baixa segurança</p> <p>A integração aleatória no genoma do hospedeiro pode causar mutagénese</p>
HSV	Consegue estabelecer um período de latência em alguns tipos de células o que é vantajoso se se pretender uma expressão mais duradoura	Possui citotoxicidade para alguns tipos de células

1.4.4 Vetores não-virais

Os vetores não-virais são vetores que, em oposição aos anteriores, não baseiam a sua estrutura em vírus. Neste grupo incluem-se os cosmídeos, cromossomas artificiais e os plasmídeos [50].

Os cosmídeos são vetores híbridos provenientes da junção de plasmídeos e fagos, ou seja, tratam-se de plasmídeos aos quais se juntou a sequência cos do fago λ . Esta sequência permite a inserção de um *insert* com um tamanho maior. O seu manuseamento e comportamento no interior da célula é igual ao do plasmídeo mas com a capacidade de infecção do fago [50].

Relativamente aos cromossomas artificiais, são vetores que mimetizam a construção natural dos cromossomas possuindo telómeros, centrómeros além de terem uma origem de replicação e marcadores de seleção. Existem dois tipos de cromossomas artificiais: BAC (Bacterial Artificial Chromosome) e YAC (Yeast Artificial Chromosome) [50].

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares extracromossomais que não são essenciais à sobrevivência e viabilidade da célula, mas que lhe podem conferir características vantajosas. Estes são os vetores mais utilizados na engenharia genética, devido às suas características e vantagens (Tabela 4) [51]. Estrutural e funcionalmente, os plasmídeos são constituídos por duas regiões: a região bacteriana onde se inclui a origem de replicação, um gene de resistência a antibiótico denominado marcador de seleção, e a região ou unidade transcripcional na qual estão inseridos um promotor eucariótico e um local de múltipla restrição que permite a inserção do gene de interesse, através da utilização de enzimas de restrição (Figura 5) [50,52].

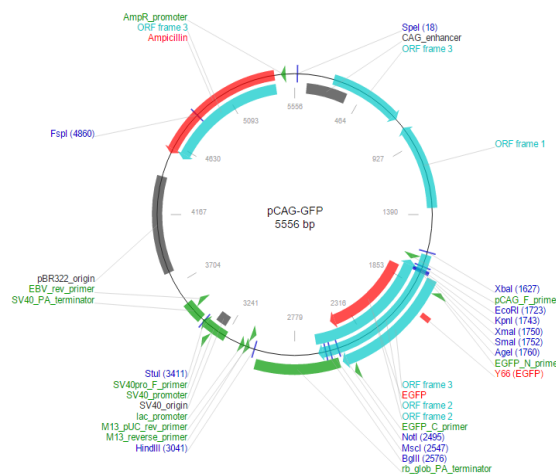


Figura 4: Representação do plasmídeo pCAG-GFP, com o local de múltipla restrição (XbaI; EcoRI; KpnI; XmaI; SmaI; AgeI; NotI; MscI; BglIII; HindIII; StuI; FspI; SpeI), o gene de resistência à ampicilina, os primers que podem ser usados para a sua sequenciação (pCAG_F_primer; M13_reverse_primer) e ainda um gene que codifica para a EGFP que é uma proteína fluorescente [53]

Tabela 4: Tamanhos de fragmento (gene) que podem ser inseridos nos vetores não-virais e respectivas vantagens e desvantagens [50]

	Tipo de Vetores Não-Virais			
	Cosmídeos	Cromossomas artificiais		Plasmídeos
		BAC	YAC	
Tamanho do fragmento (gene) que pode ser inserido (kb)	47 kb	300 kb	40 - 50 kb	< 10 kb
Vantagens	Eficientes Específicos	Mimetizam a construção natural dos cromossomas		O seu manuseamento é simples A sua construção é económica Rapidez na obtenção do produto final
Desvantagens	A sua construção é dispendiosa Dificuldade no processamento das sequências clonadas	Dificuldade na sua construção Díficeis de manusear já que são instáveis A sua construção é dispendiosa		Não possuem uma grande capacidade para a inserção de fragmentos longos

1.4.5 Obstáculos na terapia génica

Apesar da terapia génica ser bastante estudada existem certos aspetos que ainda dificultam a sua utilização e aplicação, nomeadamente a forma de entrega da molécula terapêutica ao alvo.

Para ultrapassar o obstáculo da entrega da molécula alvo é necessário ter em conta algumas premissas, como a escolha do mecanismo de distribuição já que este influenciará o tipo, a duração e, inclusive, o efeito que um determinado tratamento terá no organismo [43]. Então, como descrito anteriormente, nesta etapa recorre-se ao uso dos vetores de expressão que possuem na sua constituição o gene de interesse. Estes vetores conseguem entrar para a célula com auxílio de técnicas físicas. No caso de o estudo ser realizado *in vitro* os métodos mais usados são a eletroporação ou choque térmico. Ambos têm a capacidade de desestabilizar a membrana abrindo poros que permitem a entrada do material genético que se pretende na célula [43]. No caso de o estudo ser realizado *in vivo*, as técnicas mais usadas são injeção, a eletroporação e a sonoporação/transfecção ultrassónica (Tabela 5).

Tabela 5: Métodos de transfecção usados *in vivo*

Método	Vantagens	Desvantagens	Referências
Injeção	<p>Simples e seguro</p> <p>Expressão da proteína por um longo período de tempo</p>	Níveis de expressão do gene demasiado baixos para ser aplicado em humanos	[54]
Eletroporação	Aumenta significativamente a expressão do gene	O campo elétrico pode causar danos no tecido	[54]
Sonoporação/ transfecção ultrasónica		A energia libertada pelos ultrassons pode causar danos no tecido	[55]

Porém, as técnicas físicas nem sempre são eficazes já que tanto o DNA como a célula têm cargas negativas na sua superfície repelindo-se. No caso do DNA essas cargas negativas são conferidas pelos grupos fosfato enquanto que na célula são conferidas devido à presença de peptidoglicanos. Além desta barreira de entrada na célula, que dificulta a real aplicação terapêutica da terapia génica, *in vivo* existem outros obstáculos relacionados com a estabilidade, manutenção da integridade e função do DNA, uma vez que há a possibilidade de degradação do material genético por endonucleases ou por deteção pelo sistema imunitário, pode ocorrer a sua eliminação rápida por excreção renal e deve ser considerada a saída da corrente sanguínea para os tecidos-alvo e o escape dos endossomas (Figura 6). Assim sendo para facilitar a entrega do vetor à célula-alvo e aumentar a sua biodisponibilidade foram adotadas algumas estratégias, como a associação do DNA com determinados compostos [56].

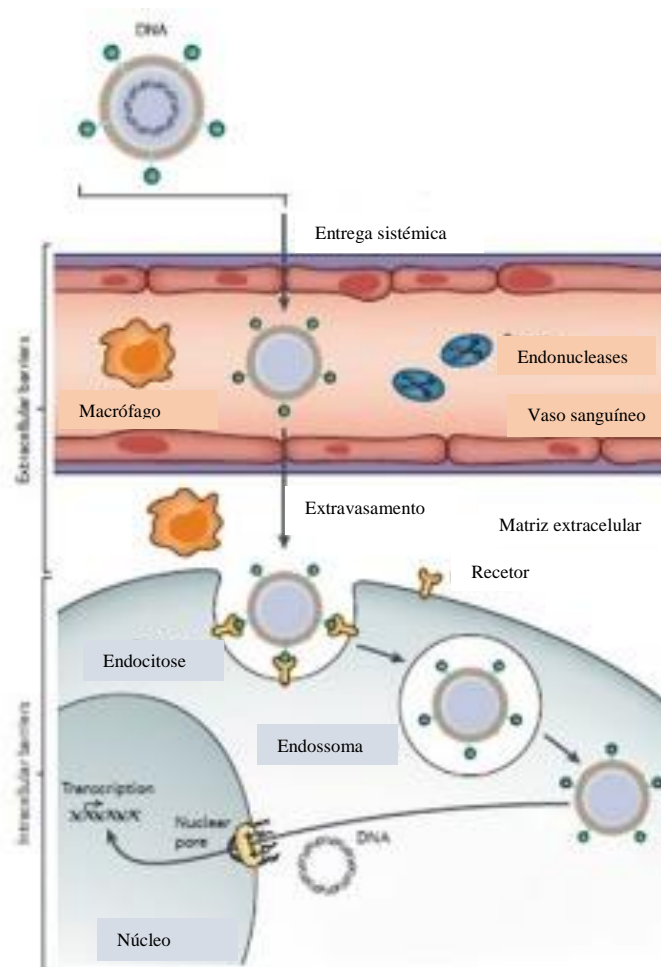


Figura 6: Representação esquemática das barreiras que o vetor tem que ultrapassar até chegar à célula alvo, *in vivo*. O vetor tem que passar para a corrente sanguínea e evitar a degradação pelas endonucleases e a detecção por parte do sistema imunitário (aqui representado pelo macrófago). Posteriormente, tem que extravasar para a matriz extracelular onde é reconhecido por recetores existentes na superfície celular ocorrendo a endocitose. Entretanto tem que sair do endossoma de modo a alcançar o núcleo da célula onde vai ser sujeito a todos os processos até à obtenção da proteína desejada. Adaptada de [56].

Os compostos usados na preparação de sistemas de entrega de ácidos nucleicos podem incluir péptidos, lípidos ou polímeros [57]. Como o DNA é uma molécula carregada negativamente devido aos grupos fosfato que o constituem, os compostos aos quais ele vai ser associado devem possuir carga oposta fornecida pelas aminas e, por esse motivo, tratam-se de compostos catiónicos. Esta junção de cargas opostas irá condensar, aumentar o tempo de circulação e proteger o DNA da degradação por nucleases, já que o DNA está fortemente ligado ao polímero permitindo uma rápida movimentação até à célula-alvo [44,56,58].

Os lípidos catiónicos são caracterizados por três componentes: um grupo catiónico, uma cauda hidrofóbica e um grupo ligado entre estes domínios. Estes lípidos conseguem interagir espontaneamente com o DNA formando lipoplexos. Existem diversos lípidos que são usados sendo os mais comuns: DOTMA, DOSPA, DOTAP e DMRIE [47,54,56,59,60].

A formação destes complexos tem algumas vantagens como uma produção simples e económica, elevada capacidade de transporte de ácidos nucleicos e uma elevada eficiência

de transfecção *in vitro*. Contudo também possuem muitas limitações como uma reduzida eficiência de transfecção *in vivo*, já que a sua carga positiva pode promover interações com proteínas existentes no soro levando à sua opsonização, uma reduzida estabilidade que provoca uma rápida excreção e o facto de promoverem respostas imunológicas, uma vez que são citotóxicos [47,54,56,59,60].

Os polímeros catiónicos são também alvo de estudo devido à enorme diversidade química e ao seu potencial de funcionamento. Estes compostos formam complexos eletrostáticos com o DNA, denominados poliplexos, que podem ser entregues às células e subdividem-se em dois grupos: naturais e sintéticos [47,54,56,59,60]. Entre os diversos compostos catiónicos naturais é de evidenciar, o quitosano (CS). Nos compostos catiónicos sintéticos incluem-se a poli-L-Lisina (PLL), os dendrímeros e o polietilenimina (PEI) [47,54,56,58-60].

O CS é um composto obtido por desacetilação da quitina existente no exoesqueleto dos artrópodes, sendo insolúvel a pH neutro ou básico. Em ambiente ácido os grupos amina ficam carregados positivamente conferindo uma elevada densidade de carga ao composto, por esse motivo a eficiência de transfecção irá ser dependente quer da sua carga quer do pH do meio [47,54,56,57,59,60].

Existem dois tipos de CS (Figura 7) que diferem o peso molecular, sendo por isso designados de elevado peso molecular (HMW) e de baixo peso molecular (LMW). O primeiro promove um aumento da ligação ao DNA e da expressão do gene, originando uma transfecção mais eficaz. No caso do LMW CS ocorre uma rápida dissociação do complexo catiónico entre o polímero e o DNA, não permitindo a resistência aos lisossomas que se encontram no citoplasma [58].

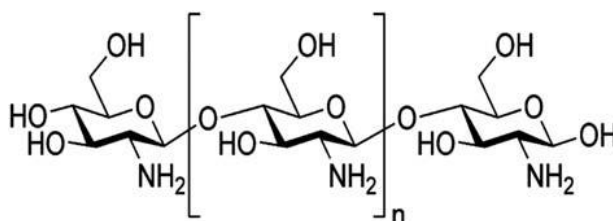


Figura 7: Estrutura do quitosano (CS). Adaptada de [58]

O PLL é um homopolipéptido do aminoácido lisina. Contudo na ausência de um composto disruptor lisossomal, o PLL tem uma baixa atividade de transfecção já que a pH fisiológico os seus grupos amina encontram-se carregados positivamente e por esse motivo tem uma baixa capacidade de tamponar o endossoma e, conseqüentemente, de promover lise para induzir a libertação do material genético [56]. No caso dos dendrímeros, estes são compostos de tamanho reduzido, ramificados e simétricos. São constituídos por três segmentos distintos: núcleo central, unidades ramificadas e os grupos terminais, em que os dois primeiros vão definir a sua solubilidade [54].

O PEI (Figura 8) é um polímero sintético com uma elevada densidade de carga a pH baixos o que facilita a condensação do DNA e escape do endossoma. Este polímero também existe sob duas formas: elevado peso molecular (HMW) e baixo peso molecular (LMW) [56]. O HMW-PEI possui a vantagem de ter uma elevada eficiência de transfecção se for usado numa proporção

mediana, mas devido à sua elevada densidade de carga desestabiliza, por despolarização, as membranas mitocondriais. O LMW-PEI, por outro lado, possui uma reduzida densidade de carga o que é benéfico mas devido a esse facto tem uma eficiência de transfecção reduzida [58].

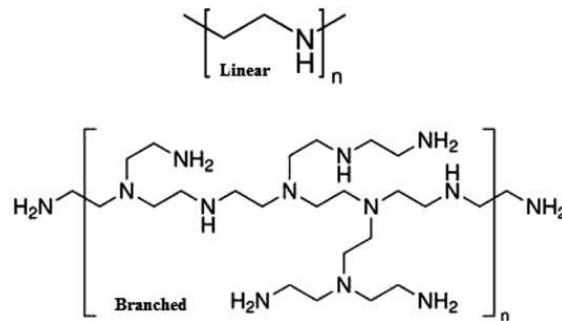


Figura 5: Representação esquemática da estrutura do polímero polietilenimina (PEI). Adaptada de [58].

Como os polímeros são formados a partir da repetição de uma certa unidade estrutural, podem ser facilmente manipulados de modo a alcançar uma eficiência maior e uma melhor entrega sem perda de atividade nem estabilidade. Muitos polímeros têm uma eficiência de transfecção e sensibilidade superior aos lipídeos [47,54,56,59,60]. De facto, este tipo de sistemas possui diversas vantagens, nomeadamente a maior capacidade de condensação do DNA, protegendo-o da degradação por nucleases, a facilidade de manipulação de modo a transfectar um tipo de célula específico de uma maneira rápida e promovendo uma expressão génica mais duradoura e a reduzida imunogenicidade. Porém possui também desvantagens significativas. À semelhança dos lipídeos a sua eficiência de transfecção *in vivo* é reduzida devido à sua carga superficial positiva e são compostos citotóxicos [47,54,56,59,60].

A complexação dos ácidos nucleicos tanto com os lipídeos como com os polímeros pode resultar na formação de nanopartículas [44,56]. Porém, além das nanopartículas existem outros tipos de sistemas de entrega como as nanoesferas, nanogéis, nanosuspensões, nanomicelas e nanotubos de carbono (Tabela 6) [61].

Tabela 6: Estruturas / tipos de sistemas de entrega disponíveis e respectivas características.

Sistemas de entrega	de	Características
Nanoesferas		Matrizes poliméricas densas nas quais o composto (fármaco ou vetores) é disperso e são preparadas por polimerização de emulsão. Constituídas por um núcleo sólido com uma matriz polimérica densa
Nanogéis		Redes de polímeros cruzados que combinam cadeias poliméricas iônicas e não-iônicas. São preparados usando um método de evaporação do solvente emulsificador. Dilatam em água e têm a capacidade de incorporar biomoléculas (oligonucleótidos, DNA) ou fármacos de baixo peso molecular.
Nanosuspensões		Partículas transportadoras de fármacos ou vetores, estabilizadas por misturas de lípidos
Nanomicelas		Estrutura com um núcleo hidrofóbico e superfície hidrofílica. O núcleo transporta uma quantidade significativa de compostos (vetor, fármacos) prevenindo a sua liberação prematura ou degradação. A superfície estabiliza a nanomicela e impede que os compostos que transporta criem ligações com as proteínas do soro ou células que não as células alvo. Assim que atinge a célula alvo os compostos são libertados por difusão
Nanotubos de Carbono		Partículas que transportam tanto fármacos como vetores. Interagem facilmente com células eucarióticas e conseguem entrar por translocação citoplasmática.

1.4.7 Mecanismo de entrega de vetores de expressão

Após a administração, as nanopartículas vão interagir com a superfície das membranas celulares devido à existência de cargas opostas. Após a adsorção ocorre o processo de endocitose onde ocorre a internalização das nanopartículas [58]. Todo o processo de transfecção depende não só das cargas como também da estrutura, tamanho e peso molecular das nanopartículas [58]. A estrutura do polímero que origina a nanopartícula vai influenciar a sua migração na corrente sanguínea e a especificidade para a célula-alvo já que pode ser modificada de modo a evitar interações com as proteínas existentes no soro ou serem adicionados componentes (ligandos) que permitem um reconhecimento específico da célula-alvo, interagindo com os receptores existentes na sua superfície. Relativamente ao tamanho e peso molecular, ambos influenciam a entrada na célula visto que a endocitose só ocorre para compostos com um reduzido tamanho, por esse motivo, é aconselhável que o tamanho das nanopartículas seja aproximadamente entre 100 nm-300 nm [56,59,62].

Depois da endocitose, a célula redireciona as partículas endocitadas para os lisossomas para serem degradadas. Os endossomas têm a capacidade de se fundir com estes organelos, o que implica que quando o polímero se encontra no interior do endossoma pode ser degradado, sendo por isso crucial que este se consiga libertar. Uma das formas de promover essa libertação é usando um polímero que seja parcialmente protonado a pH neutro, como o PEI. Este composto possui azotos que só são protonados aquando a redução do pH promovendo um influxo de iões cloreto que, seguido de inchaço osmótico, irão provocar a rutura do endossoma [59,62]. As nanopartículas libertam-se do endossoma para o citosol, rico em nucleases, iniciando-se o transporte para o núcleo. Caso o polímero possua um peso molecular de, aproximadamente, 40 kDa ou 9 nm de diâmetro consegue atravessar o envelope nuclear através dos complexos de poros nucleares por difusão passiva. Caso sejam maiores então a estrutura do polímero terá que ser alterada de modo a conter péptidos sinalizadores que permitam essa entrada [62]. A dissociação do vetor do polímero pode ocorrer tanto no citosol como no núcleo, sendo mais seguro neste último visto que o polímero protege o DNA da degradação por nucleases [62].

1.4.8 Sistemas de entrega e a doença de Alzheimer

O tratamento da DA terá que incidir no órgão que é mais afetado por esta patologia, o cérebro. No entanto, existe uma grande dificuldade em fazer com que qualquer tipo de terapia o alcance facilmente e exerça a sua função devido à existência da Barreira Hemato-Encefálica (BBB) [63].

A BBB localiza-se entre a corrente sanguínea e o cérebro e tem como funções principais a manutenção da homeostasia no cérebro e a sua proteção contra agentes patogénicos e toxinas. Esta barreira é muito complexa e regulada, e na sua periferia ocorre um processo de

seletividade para a passagem de determinadas moléculas para o parênquima. Este processo é baseado nas características estruturais, físico-químicas e bioquímicas dessas moléculas [63,64]. Assim, a BBB restringe a entrada de solutos para o cérebro pela via transcelular devido ao aumento da resistência elétrica entre as células endoteliais e as junções apertadas. Estas junções são extremamente importantes já que exercem funções cruciais na BBB: restrição quase total da via paracelular; reforço da passagem transendotelial controlando a passagem para o CNS; associação com sistemas de entrega de solutos hidrofílicos essenciais ao cérebro como os nutrientes; expressão de recetores, transportadores e enzimas à superfície permitindo que a BBB funcione como uma interface dinâmica entre o sangue e o cérebro [63,64].

A BBB permite a passagem de nutrientes essenciais, hormonas e vitaminas e degrada enzimaticamente alguns péptidos e neurotransmissores. As moléculas de tamanho reduzido e lipofílicas conseguem passar através dos capilares mas aquelas que são carregadas, de grande tamanho ou hidrofílicas requerem o auxílio de proteínas ou recetores [63,64]. Porém, esta barreira não se encontra presente em redor de todo o cérebro, sendo que os órgãos circumventriculares, como a hipófise posterior, não possuem BBB. Estes órgãos encontram-se relacionados com a quimiosensação, ajustamento hormonal, ritmo circadiano e regulação dos fluidos biológicos. A ausência da barreira auxilia na manutenção das características cerebrais internas através da monitorização da composição do sangue e ativando feedbacks se necessário [63,64].

Os mecanismos de transporte através da BBB podem ser manipulados para a entrega de fármacos ou vetores, para tal é necessário que o composto que se pretende que alcance o cérebro tenha determinadas características como: tamanho reduzido, ser lipofílico e compacto. Então os compostos que podem ser usados para promover a entrada e passagem através da BBB podem ser compostos modificados com ligandos que vão formar uma ligação com receptores específicos existentes na BBB [63-65]. Já foram realizados estudos nos quais se recorre às nanopartículas como sistema de entrega de compostos, nomeadamente rivastigmina e tacrina fármacos que melhoram a condição cognitiva e comportamental de doentes com DA. Estes compostos possuem eficácia clínica limitada e efeitos secundários, e recorrendo ao nanoencapsulamento é possível aumentar significativamente a sua concentração no cérebro dos doentes [66]. Um outro exemplo é a administração de curcuminóides, que são compostos obtidos a partir da curcumina (componente ativo do açafrão-da-índia) que reduzem a toxicidade associada aos agregados do péptido A β mas são facilmente hidrolisado e oxidados, pelo que quando se encontram no interior das nanopartículas o seu tempo de meia-vida e concentração aumentam exponencialmente [67].

1.5 Processo biotecnológico na preparação de vetores para terapia génica

O processo biotecnológico para obtenção de um vetor de expressão com aplicação em terapia génica inicia-se com a construção do vetor, utilizando diferentes enzimas de restrição que irão atuar no local de múltipla clonagem. Estas enzimas promovem a clivagem do plasmídeo e do gene de interesse em locais específicos, permitindo a posterior ligação de ambos, recorrendo a uma ligase. Concluída a construção do vetor, é necessário que este se replique de modo a se obter uma elevada quantidade de material genético, através de um processo denominado fermentação, no qual a bactéria, previamente transformada com o plasmídeo, é semeada em placas e, posteriormente, colocada em meio líquido para que possa crescer e atingir um determinado patamar de crescimento. O processo biotecnológico mais usual para a produção recombinante de plasmídeos utiliza como sistema hospedeiro a bactéria *Escherichia coli* [68-71].

E. coli é uma bactéria gram-negativa que é muito utilizada em engenharia genética devido às vantagens que apresenta, como o seu crescimento rápido em meios pouco dispendiosos, a simplicidade de manuseamento e manutenção, bem como o facto de ser uma bactéria cujas características genéticas e metabólicas se encontram bem estabelecidas. No entanto possui, também, algumas desvantagens, já que não secreta as biomoléculas produzidas para o ambiente extracelular e é incapaz de glicosilar proteínas ou formar pontes dissulfito que são fatores essenciais na produção de proteínas [68,69]. Existem diversas estirpes que foram desenvolvidas com o objetivo de minimizar essas desvantagens, sendo a mais utilizada a DH5 α , uma vez que se trata de uma estirpe que tem a capacidade de produzir o composto que se pretende numa quantidade elevada.

Para a recuperação do vetor, e após a replicação do material genético de interesse, realiza-se o processo de lise alcalina. Este processo é o mais usado já que além de ser mais simples e económico é aquele com o qual se obtém um maior rendimento de produto final, neste caso de plasmídeo. E, finalmente, é imperativo que o DNA seja purificado de modo a remover compostos indesejáveis, como proteínas, ácidos nucleicos ou endotoxinas provenientes do hospedeiro. O processo de purificação pode ser realizado através de diversas técnicas, sendo a maioria baseada em processos cromatográficos, como cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca aniónica, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de afinidade [72]. Após a purificação, a amostra de DNA é sujeita a uma avaliação da pureza, na qual é avaliada a aparência (incolor e limpa) e homogeneidade da amostra (>97%), sendo quantificados os níveis de contaminantes como proteínas (não detetáveis, ou <3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ pDNA no método BCA); RNA (não detetável num gel de agarose de 0,8%); gDNA (<2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ plasmídeo, PCR) e endotoxinas (<10 EU/mg plasmídeo, método LAL). Todos estes parâmetros têm que se enquadrar nos valores estabelecidos pelas agências reguladoras, para que o DNA possa ser usado para fins terapêuticos [73].

Posteriormente, o DNA deve ser sujeito a uma sequenciação de modo a garantir que tanto a sequênça do vetor como a do gene de interesse se mantêm inalteradas.

Uma vez purificado e sequenciado, o plasmídeo tem que ser inserido num sistema de entrega para que possa ser transfectado nas células alvo, para isso recorre-se às nanopartículas. Após o nanoencapsulamento este encontra-se nas condições ideais para ser inserido nas células eucarióticas (Figura 9).

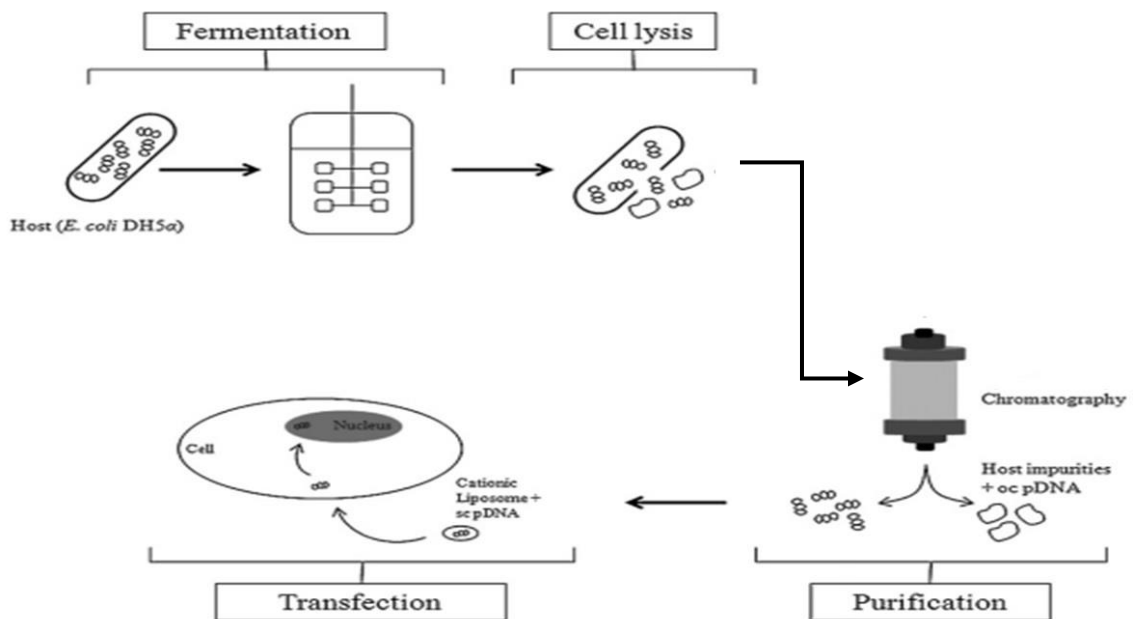


Figura 6: Processo de produção de um vetor com a finalidade de ser usado em células eucarióticas. Imagem adaptada de [71]

Assim, este projeto tem como principais objetivos a construção de um vetor de expressão da TTR com posterior desenvolvimento do sistema de entrega com a finalidade terapêutica na DA.

Capítulo 2- Objetivos

Tendo em conta que a Transtirretina é uma proteína que se encontra envolvida na doença de Alzheimer podendo, devido às suas funções, amenizar os sintomas ou até impedir a sua progressão, pretende-se, neste estudo, construir um vetor que codifique para a TTR e desenvolver um sistema de entrega, considerando a potencial aplicação terapêutica . Assim sendo, este estudo tem como principais objetivos:

- Construção de um vetor de expressão da TTR utilizando, para tal, as técnicas de clonagem;
- Produção e isolamento do vetor a partir de um hospedeiro recombinante;
- Criação de um sistema de entrega para a transfecção;
- Transfecção de células pertencentes a uma linha celular de neurónios seguida de avaliação da expressão da TTR por Western Blot.

Capítulo 3- Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e equipamento

A triptona, o extrato de levedura e o SDS foram obtidos da Himedia (Mumbai, Índia). O glicerol e o ácido acético glacial foram obtidos da JMGS (Odivelas, Portugal). O polietilenimina (PEI), a resazurina e o Tris foram obtidos da Sigma Aldrich (Sintra, Portugal). O metanol foi obtido da VWR (Carnaxide, Portugal). A T4 DNA ligase, a enzima de restrição *NotI* e a BSA foram obtidas da Takara Bio Inc. (Shiga, Japão). A enzima de restrição *EcoRI*, o marcador de pesos moleculares NZY DNALadder VIII, o GreenSafe Premium e o kit comercial NZYMAxiprep foram obtidos da NZYTech (Lisboa, Portugal). Os *primers* utilizados foram obtidos da STAB VIDA (Caparica, Portugal). A master mix para o PCR foi obtida da Kapa Biosystems (Wilmington, MA, EUA). A acrilamida foi obtida da Biorad (Amadora, Portugal). O FBS (Soro fetal de bovino) foi obtido da Biochrom AG (Lisboa, Portugal). O Opti-MEM® I, o anticorpo primário para a β -actina e o RPMI 1640 foi obtido da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). O LB-Agar foi obtido da Pronadisa (Basel, Suíça). O anticorpo primário para a TTR foi obtido da Dako (Glostrup, Dinamarca). Os anticorpos secundários anti-mouse e anti-rabbit foram obtidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, EUA). O kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System foi obtido da Promega (Carnaxide, Portugal). A agarose foi obtida da Hoefer (San Francisco, CA, EUA). O ECL foi obtido da Advansta (Menlo Park, CA, EUA). O agitador orbital usado foi o Agitorb 200 da Aralab (Albarraque, Portugal). O NANOPhotometer usado era da Implen, Inc. (Westlake Village, CA, EUA), e o Shimadzu UV-Vis 1700 spectrophotometer da Shimadzu (Makati, Filipinas). Foi usado um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). O sistema usado para a revelação dos géis de agarose foi o sistema Vilber Lourmat da ILC Lda (Lisbon, Portugal).

3.2 Construção do vetor de expressão pCAG-hTTR

Inicialmente o vetor pGBKT7-hTTR foi sequenciado de modo a garantir que a sequência do gene da TTR se encontrava correta. Após sequenciação e confirmação da sequência de interesse, este vetor foi sujeito a uma digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. A digestão decorreu durante 2h num banho termostaticado com uma temperatura de 37°C. Após a digestão, as enzimas de restrição foram inativadas sujeitando-as a uma temperatura de 65°C durante 20 min.

Posteriormente procedeu-se à ligação do fragmento correspondente ao cDNA da TTR retirado do vetor pGBKT7-hTTR ao vetor pCAG-GFP que foi previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição e sob as mesmas condições. Esta ligação foi efetuada recorrendo-se à T4 DNA ligase, 5 μ L de vetor pCAG-GFP e 5 μ L de fragmento, a uma temperatura de 16°C durante 30 min.

líquido suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina. O crescimento decorreu “overnight” a 37 °C a 250 rpm no agitador orbital.

A recuperação e purificação do vetor pCAG-hTTR foi realizada recorrendo ao Kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System, segundo as instruções do fabricante. As amostras obtidas dos minipreps foram enviadas para a empresa STAB VIDA para sequenciação de modo a garantir a ausência de mutações na sequência do vetor ou do *insert*.

3.4 Fermentação

Após a confirmação da sequência clonada, procedeu-se à transformação de células de *E. coli* DH5α competentes, pelo método do choque térmico explicado anteriormente. Após a transformação, as células foram inoculadas numa placa de Petri que continha meio LB suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina e permaneceram em crescimento “overnight” a 37 °C. Foram selecionados os clones positivos, como descrito previamente, e uma colónia isolada foi colocada em crescimento usando uma placa com meio LB suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina e permaneceu em crescimento “overnight” a 37°C, para garantir a uniformidade genética entre todas as células. Posteriormente, uma colónia foi retirada da placa e inoculada em 25 mL de meio LB líquido até atingir uma DO₆₀₀ de, aproximadamente, 1,7, sob agitação de 250 rpm e 37 °C. Nesta fase do crescimento, foi adicionado 30% de glicerol com a finalidade de se criar um banco de células transformadas com o vetor.

As restantes colónias existentes na placa foram sujeitas a uma pré-fermentação, que consistiu na sua inoculação em 125 mL de meio Terrific Broth (20 g/L Triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017 M KH₂PO₄, 0,072 M K₂HPO₄) líquido suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina num Erlenmeyer de 500 mL que permaneceu em crescimento num agitador orbital a 250 rpm e 37 °C até atingir uma DO₆₀₀ de, aproximadamente, 2,6. Seguidamente, foi retirada uma alíquota da pré-fermentação de modo a garantir que a fermentação era iniciada a uma DO₆₀₀ de 0,2, segundo a equação:

$$V_{\text{Pré-fermentação a retirar}} = \frac{V_{\text{fermentação}} \times 0,2}{DO_{600\text{pré-fermentação}} - 0,2}$$

Esse volume foi adicionado a 250 mL de meio Terrific Broth num Erlenmeyer de 1000 mL e o crescimento das células foi promovido num agitador orbital a 250 rpm e 37 °C até atingir uma DO₆₀₀ entre 5-6. As células foram, posteriormente, recuperadas através de centrifugação (3900 g, 15 min, 4 °C) e os “pellets” celulares foram armazenados a -20 °C

3.5 Recuperação do vetor de expressão pCAG-hTTR

O vetor foi recuperado utilizando o kit NZYMaxiprep de acordo com o protocolo do fabricante baseado num procedimento de lise alcalina modificado. Após a lise alcalina, o DNA interage com a resina de troca aniónica presente na coluna da NZYTech sob baixas concentrações de sal. Uma vez que baixas concentrações de sal promovem a interação do DNA com a coluna,

para promover a sua eluição recorre-se a uma solução de concentração de sal mais elevada. O vetor é, então, concentrado por precipitação com isopropanol e o “pellet” final é ressuspenso em 1 mL de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. A concentração de pDNA foi medida no NANOPhotometer, utilizando como branco o tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.

3.6 Formação dos poliplexos

Todos os poliplexos foram formulados usando o método da complexação, considerando as concentrações molares de carga positiva, presentes nos grupos amina do polycatião (N), e as cargas negativas presentes nos grupos fosfatos do DNA (P).

A solução de DNA foi preparada dissolvendo o DNA em tampão de acetato de sódio (0,1 M acetato de sódio/0,1 M ácido acético, pH 4,5) para uma concentração final de 20 µg/mL.

Foram feitas várias soluções de polietilenimina (PEI) com diferentes ratios (N/P): 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 7,5 e 12,5. Todas as soluções foram preparadas com tampão de acetato de sódio pH 4,5. Como descrito anteriormente por [Pereira, P. et.al, 2012 [57]] um volume fixo de solução de polycatião (100 µL) de concentrações distintas é adicionado à solução de DNA (400 µL). A concentração final de DNA (20 µg/mL) manteve-se constante ao longo de todos os processos realizados para a caracterização dos complexos DNA-Polycatião. As partículas foram formadas por adição da solução de polycatião à solução de DNA e com recurso ao vórtex na velocidade máxima durante 1 min. Todas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 15 min e, posteriormente, centrifugadas (10 000 g, 20 min, temperatura ambiente). O sobrenadante foi removido e realizou-se a ressusensão do pellet em 400 µL de meio Opti-MEM® I.

3.7 Determinação da eficiência de encapsulação do pCAG-hTTR

A eficiência de encapsulação (EE) é um parâmetro importante na medida em que fornece informações relativas à quantidade de pDNA que é encapsulado pelas nanopartículas. Este foi calculado a partir da determinação de pCAG-hTTR livre no sobrenadante após a centrifugação das partículas (10 000 g, 20 min, temperatura ambiente). A quantidade de pCAG-hTTR foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis (Shimadzu UV-Vis 1700 spectrophotometer) a 260 nm, usando como branco o tampão de acetato de sódio (0,1 M acetato de sódio/0,1 M ácido acético, pH 4,5). Foram realizados triplicados para cada amostra.

O cálculo da eficiência de encapsulação é realizado tendo em conta a concentração de DNA inicial e a que se encontra no sobrenadante após a encapsulação, segundo a equação:

$$(\% EE) = \frac{\text{Concentração total do vetor} - \text{Concentração do vetor existente no sobrenadante}}{\text{Concentração total do vetor}} \times 100$$

Para confirmação dos resultados obtidos anteriormente, 20 µL do sobrenadante de cada amostra foram também usados para análise na eletroforese horizontal usando um gel de

agarose 1,0 % com GreenSafe Premium. A eletroforese realizou-se a 120V durante 30 min em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM de ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0). O gel foi revelado usando o sistema Vilber Lourmat.

3.8 Determinação do potencial zeta das nanopartículas com pCAG-hTTR

O potencial zeta trata-se de um parâmetro que avalia a carga superficial da partícula. Este foi determinado usando um Zetasizer Nano ZS, à temperatura ambiente. Os valores médios foram calculados a partir das três medições realizadas \pm desvio padrão.

3.8 Screening das linhas celulares

O screening das linhas celulares disponíveis para detetar a presença de transcritos de TTR foi realizado utilizando o cDNA de cada uma delas e *primers* complementares à sequência da TTR (*primer* Forward: 5' TACTGTCAGTTCCTTGGGATT 3'; *primer* Reverse: 5' TTATGAATTGATGGCTTCTCATCG 3'). Foram analisados quatro tipos de células: células do plexus coróide, linha celular Z310, linha celular N27 e linha celular N2A695 às 48h e 72h de crescimento.

O cDNA das células foi amplificado por PCR. Foram realizados PCR com duas Taq polimerases diferentes, um com a Taq polimerase Kapa e outro com a Supreme Taq polimerase. Para a Taq polimerase Kapa realizou-se o PCR sob as mesmas condições descritas na subsecção 3.2. Para a Supreme Taq polimerase foi necessário fazer uma mix na qual se adicionou além da Taq polimerase, MgCl₂ e o programa colocado no termociclador foi: 95 °C durante 2 min, 30 x (95 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min, 72 °C durante 5 min), 72 °C durante 5 min e 12 °C até as amostras serem retiradas do termociclador.

Posteriormente, as amostras amplificadas por PCR foram sujeitas a uma eletroforese horizontal usando um gel de agarose 1,0 % com GreenSafe Premium para confirmar se ocorreu ou não amplificação, pois caso ocorresse significava que esse tipo de célula possuía produção endógena de TTR e não poderia ser usada para os restantes estudos necessários a este projeto.

3.10 Cultura e Transfecção da linha celular N27

Para a realização dos estudos da viabilidade celular, as células N27 foram semeadas em placas de 96 poços com uma densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço, com meio RPMI completo (RPMI, bicarbonato de sódio, 10% de FBS e 1% Antibiótico SP), e incubadas durante 12 h a 37 °C sob uma atmosfera de 5 % CO₂. Após 12 h o meio completo foi trocado por meio incompleto (sem FBS e sem Antibiótico) e permaneceram na incubadora por 12 h. Procede-se à transfecção com uma fração (8 μ L) das nanopartículas, previamente preparadas. A

transfecção foi interrompida 8 h depois com a adição de meio completo e as células foram mantidas na incubadora por mais 48 h ou 72 h, trocando o meio a cada 24 h.

3.11 Avaliação da viabilidade celular

Este ensaio foi realizado após 48 h e 72 h da transfecção. Depois de trocar o meio por meio completo novo adicionou-se 10 µL de Resazurina. A Resazurina é um composto de cor azul que é reduzido a Resorufina (composto de cor rosa) quando as células se encontram viáveis. Quando a Resazurina é adicionada, a placa deve ser envolvida em papel de alumínio pois é um composto fotossensível e coloca-se na incubadora a 37 °C sob uma atmosfera de 5% CO₂ durante 4 h. Para o estudo, foram criados dois controlos e analisados seis ratios N/P das nanopartículas (ratios de 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 7,5). Relativamente aos controlos foi realizado o controlo positivo no qual as células não foram sujeitas a transfecção mas às quais se adicionou 50 µL de etanol a 70%, e foi realizado o controlo negativo no qual as células não foram transfectadas nem sujeitas a qualquer tipo de tratamento. Decorridas as 4h de incubação com Resazurina realizou-se a leitura da absorvância de cada poço no fluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}} = 544$ e 584 nm; $\lambda_{\text{emissão}} = 590$ nm) e no espectrofotómetro ($\lambda_{\text{excitação}} = 600$ nm; $\lambda_{\text{emissão}} = 690$ nm). Seguidamente procedeu-se à análise estatística pelo teste t-student para um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

3.12 Avaliação da expressão da TTR

Foram semeadas células numa placa de 6 poços e procedeu-se à cultura destas e respetiva transfecção como previamente descrito. A quantificação da proteína foi realizada às 48h após a transfecção. O meio da placa foi aspirado e a placa foi lavada com 1,5 mL de PBS e as células aderidas foram retiradas com um cell scraper. O PBS com células foi aspirado para tubos Eppendorf de 1,5 mL, que foram posteriormente sujeitos a uma centrifugação (11500 rpm, 4 °C, 7 min). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados, aos tubos Eppendorf, 500 µL de PBS para ressuspender o pellet por agitação no vórtex. De seguida foi realizada uma centrifugação (11500 rpm, 4°C, 7 min) e o sobrenadante foi descartado. Ressuspendeu-se o pellet em tampão de lise completo (25 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2,5 mM EGTA, 25 mM PMSF, 10 µL de cocktail de proteínas) de acordo com o volume do pellet realizando-se, de seguida, um vórtex. Colocaram-se os tubos Eppendorf em gel durante 10 min.

A leitura de absorvância foi realizada numa placa de 96 poços, na qual se colocaram triplicados do branco (159 µL de água milli-Q e 1 µL de tampão de lise completo) e triplicados de cada ratio (2; 7,5) e controlo (K⁻ e K⁺). Para as amostras adicionaram-se 159 µL de água milli-Q e 1 µL de amostra. Posteriormente, adicionaram-se a todos os poços 40 µL de reagente BioRad e ressuspendeu-se bem para que a solução ficasse homogénea. Após uma incubação de 15 min, realizou-se a leitura no espectrofotómetro ao comprimento de onda de 595 nm, após a qual se calculou a quantidade de proteína existente em cada amostra.

A expressão da TTR foi avaliada por Western Blot. Foram preparados dois géis: Resolving Gel e Stacking Gel. Para criar o resolving gel são adicionados água milli-Q (4,8 mL), 1,875 M Tris-HCl pH 8,8 (6 mL), SDS 10% (160 µL) e acrilamida (5 mL). Para o stacking gel foram adicionados água milli-Q (5,4 mL), 1,25 M Tris-HCl pH 6,8 (1 mL), SDS 10% (740 µL) e acrilamida (1 mL). Após os reagentes base estarem em solução, adicionou-se 160 µL de PSA e 41 µL de TEMED ao resolving gel, pipetou-se a solução para o sistema de electroforese e aguardou-se a sua polimerização. Depois deste se encontrar polimerizado, adicionou-se 150 µL de PSA e 38 µL de TEMED ao stacking gel, pipetou-se a solução para os vidros onde já se encontrava o resolving gel e colocou-se o pente cuidadosamente para evitar a formação de bolhas.

Seguidamente preparou-se as amostras de modo a que no final estivessem presentes 40 µg de proteína para um volume de solução de 20 µL. Adicionou-se 10 µL de Loading Buffer (10% SDS, 0,05% de azul bromofenol, 200 mM de Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 30% de β-mercaptoetanol) e colocou-se as amostras a desnaturar num bloco de aquecimento a 95°C durante 10 min. Depois das amostras estarem preparadas realizou-se a electroforese. As amostras foram carregadas nos poços, sendo um dos poços carregado com 2 µL de marcador de pesos moleculares. A corrida foi realizada, primeiramente, a 80 V, até as proteínas atingirem o resolving gel, ponto a partir do qual se aumentou a voltagem para 120 V, durante, aproximadamente, 2h.

Enquanto a electroforese se encontrava a decorrer começou-se a ativar as membranas para Western blot. Estas foram ativadas colocando-as em metanol até ficarem translúcidas (aproximadamente 5 seg) depois em água milli-Q até ficarem submersas (aproximadamente 5 min). Removeu-se a água e colocou-se as membranas em tampão de eletrotransferência até se realizar a eletrotransferência. Depois de concluída a electroforese realizou-se a eletrotransferência. Para tal foi necessário realizar a montagem do sistema de modo a que as membranas se encontrem em contacto com os géis ficando estes no lado do pólo negativo para que as proteínas sejam transferidas para as membranas. A eletrotransferência foi realizada a 75 V durante 40 min. Durante este tempo preparou-se a solução de leite 5% em TBS-T 0,1 % para o bloqueio.

Quando a eletrotransferência terminou as membranas foram lavadas duas vezes com TBS durante 5 min cada lavagem e colocou-se na solução de leite durante 1h e 30 min e, posteriormente, foram lavadas mais uma vez com TBS-T 0,1% durante 10 min. De seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário α-TTR (1:250 em TBS-T 0,1%; 2,5 mL por membrana) overnight a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, foram lavadas três vezes com TBS-T 0,1% (10 min cada lavagem) e foram colocadas a incubar com o anticorpo secundário α-rabbit (1:50000 em TBS-T 0,1%; 25 mL por membrana) durante 1h. Depois foram lavadas mais duas vezes com TBS-T 0,1% durante 10 min cada. Preparou-se o reagente ECL (200 µL ECL 1, 200 µL ECL 2) que tem que estar sempre tapado com folha de alumínio já que se trata de um composto fotossensível. Dispôs-se o ECL em gotas e colocou-se a membrana em contacto com o reagente, aguardou-se 5 min e revelou-se.

Depois da revelação, as membranas foram lavadas abundantemente com TBS-T 0,1% e procedeu-se à incubação com o anticorpo primário α - β -actina (1:250 em TBS-T 0,1%; 25 mL por membrana) durante 2h à temperatura ambiente. Lavou-se as membranas três vezes com TBS-T 0,1% (10 min cada lavagem) e foram colocadas a incubar com o anticorpo secundário α -mouse (1:50000 em TBS-T 0,1%; 25 mL por membrana) durante 1h. Depois foram lavadas mais duas vezes com TBS-T 0,1% durante 10 min cada. E repetiu-se o procedimento para a revelação.

Capítulo 4- Resultados e Discussão

A bactéria *E. coli* é uma bactéria que é comumente usada na produção biotecnológica de diversos produtos devido às diversas vantagens que possui como o facto de as suas características genéticas e metabólicas serem bem conhecidas, a possibilidade de obtenção de uma elevada densidade celular, aplicando estratégias relativamente económicas [69].

A TTR é uma proteína transportadora envolvida na doença de Alzheimer. Esta proteína tem a capacidade de prevenir a toxicidade do péptido AB bem como modular os seus níveis nas células neuronais [16].

Neste trabalho, pretendeu-se construir um vetor de expressão para a TTR usando como hospedeiro procariota, a *E. coli*. Este vetor foi então recuperado após a lise das células e purificado. Após a purificação e subsequente sequenciação, o vetor construído foi nanoencapsulado e a sua eficiência de encapsulação determinada. Foi ainda avaliado o potencial zeta das nanopartículas, de forma a conhecer a sua carga à superfície. Posteriormente, as nanopartículas foram utilizadas como sistema de entrega do vetor de expressão às células eucariotas N27 para verificar a produção da proteína TTR.

4.1 Construção do vetor de expressão da TTR

O vetor onde o gene da TTR se encontrava originalmente (pGBKT7-hTTR) foi sequenciado para garantir a integridade da sequência do gene em questão. Com o auxílio das enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* o gene foi retirado do vetor original e inserido no vetor pCAG-GFP recorrendo à T4 DNA ligase, seguido de transformação de células de *E. coli* XL1B por choque térmico. Nesta fase, procedeu-se à recuperação do vetor que foi sujeito a um PCR com *primers* complementares à sequência do vetor (*primer forward* T7/HA introd.: 5' AAAATTGTAAATGGCC 3'; *primer reverse* M13: 5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') seguido de digestão com as mesmas enzimas de restrição e verificou-se a presença do *insert* por eletroforese horizontal usando um gel de agarose 1,0 % com GreenSafe Premium (0,01%; NZYTech) (Figura 11). Realizou-se ainda uma sequenciação deste vetor, pela empresa STAB VIDA, para verificar a sequência e ausência de mutações no gene clonado.

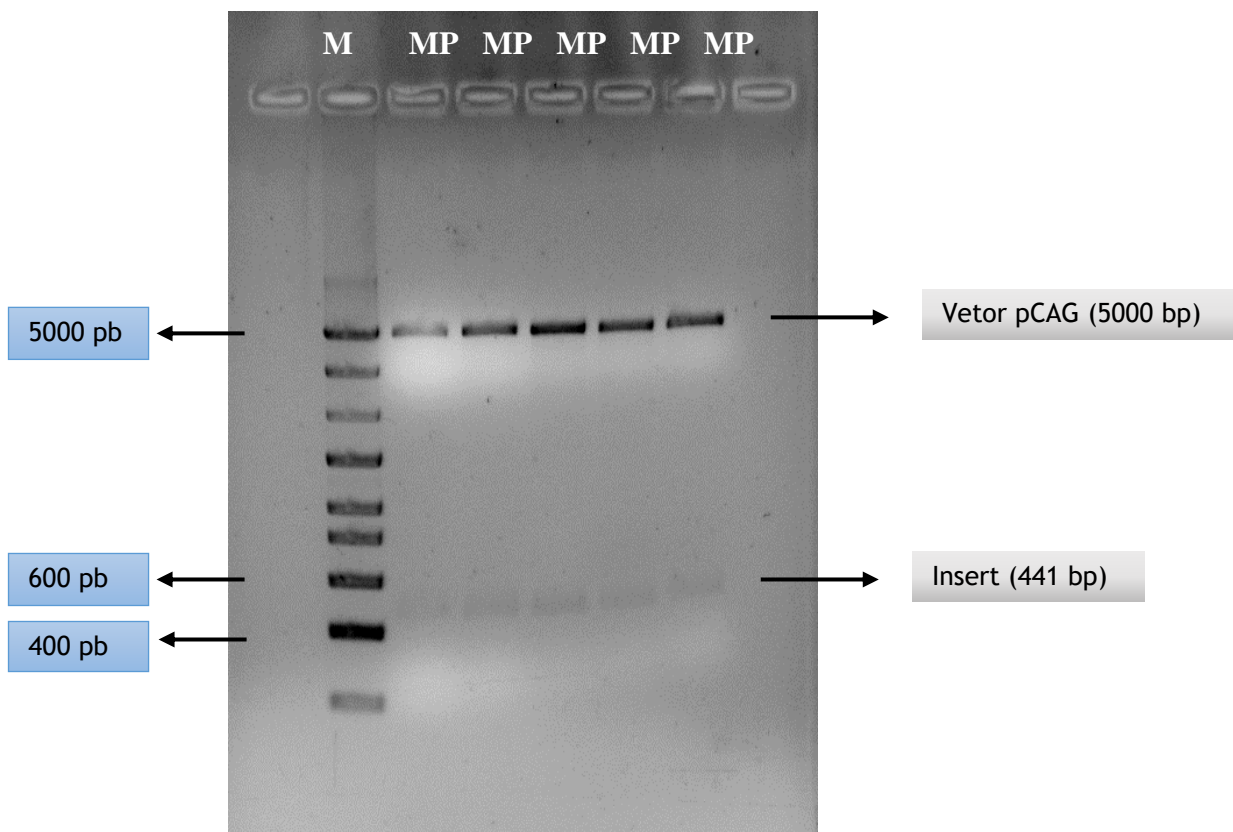


Figura 11: Minipreps de pCAG-hTTR (MP). O vetor foi amplificado por PCR seguido de digestão com *EcoRI* e *NotI* para verificar a presença do *insert*. O Marcador de Peso Molecular (M) que foi usado foi o NZY DNALadder VIII (até 5000 pb).

Analisando os resultados da eletroforese realizada ao vetor após este ter sido sujeito a um PCR seguido de digestão, verifica-se a presença de uma banda correspondente ao insert a, aproximadamente, 400 bp e uma, correspondente ao pCAG a, aproximadamente, 5000 bp, pelo que se pode inferir que o fragmento libertado aquando a digestão correspondia ao insert pretendido (441 pb). No entanto a sequência do insert teve que ser verificada para garantir que não ocorreram mutações durante todo o processo de clonagem. A sequenciação foi realizada utilizando o reverse primer M13 (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3') e recorreu-se a algumas ferramentas como Reverse Complement Sequence (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) para saber a sequência reversa e complementar; BLASTx ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO C=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) para proceder à análise dos resultados e saber a que correspondia a sequência e Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para se proceder ao alinhamento e verificar-se a presença ou não de mutações (Figura 12).

pCAG-hTTR hTTR	GGCGTGTGAACGGCGGCTCTAGAGCCTTTTCTAACCTAGGTTCAAGCCTTTTTCTT -----	pCAG-hTTR hTTR	TATCAGAAAGTGTGGCTGGTGGTGGCCAAATGCCCTGGCTCACAATACCCTGAGATCTT -----
pCAG-hTTR hTTR	TTTCCTACAGGTTCTGGGCAAGTGTGTTATTGTGCTGTCTCATCTTTTGGCAAAG -----	pCAG-hTTR hTTR	TTTCCTCTGCCAAAAATTATGGGACATCATGAAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGC -----
pCAG-hTTR hTTR	AATTCATGGCTTTTCATCGTCTGCTCCTCCTCGCTTGCTGGACTGGTATTGTGTCTG -----atggccttttcacgtctgctcctcctcctctgctggactggattttgtgctg *****	pCAG-hTTR hTTR	TAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGGAAATTTTTGTGTCTCACTC -----
pCAG-hTTR hTTR	AGGCTGGCCCTACGGGACCCGGTGAATCCAAGTGTCTCTGATGGTCAAAGTTCTAGATG aggctggccctacgggcaccggatgaatccaagtgctcctctgatggatcaagttctagatg *****	pCAG-hTTR hTTR	GGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAAAACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGT -----
pCAG-hTTR hTTR	CTGTCCGAGGCGAGTCTGCCATCAATGTGGCGTGCATGTGTTTCAAGAAAGGCTGTGATG ctgtccgaggcagtcctgccatcaatggcctgcatgtgttcagaaggctgctgatg *****	pCAG-hTTR hTTR	TTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAGTTGGCTATAAAGAGGTGAT -----
pCAG-hTTR hTTR	ACACCTGGGAGCCATTGCTCTGGGAAAACAGTGAAGTCTGGAGAGCTGCATGGGCTCA acacctggagccatttgcctctgggaaaaccagtgagctggagagctgcatgggctca *****	pCAG-hTTR hTTR	CAGTATATGAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATCCATAGAAAAGCCTTGACTTGA -----
pCAG-hTTR hTTR	CAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAGTGGAAATAGACACCAATCTTACT caactgaggaggaattttagaaggatatacaaaagtggaatagacaccaaatcttact *****	pCAG-hTTR hTTR	GGTTAGATTTTTTTATATTTTGTGGTGTATTTTTTTCTTAAACATCCCTAAAATTT -----
pCAG-hTTR hTTR	GGAAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGCAGAGGTGGTATTACAGCCAACG ggaaggcacttggcatctcccatccatgagcatgagagtggtattcacagccaacg *****	pCAG-hTTR hTTR	TCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCTGACTACTCCCAAGTATAGCT -----
pCAG-hTTR hTTR	ACTCGGCCCCCGCCGCTACACCAATTGCGCCCTGCTGAGCCCTACTCCTATTCCACCA actcggcccccgcctacaccattgccctctgctgagccctactcctattccacca *****	pCAG-hTTR hTTR	GTCCCTCTTCTTATGAGGATCCCTGCACCTGCAGCCAGCGTGTCTC -----
pCAG-hTTR hTTR	CGGCTGTGTCACCAATCCCAAGGAAGTGCAGCGCCGCACTCCTCAGGTGCAAGGCTGCC cggtgtcgtcaccaatcccaaggaa----- *****		

Figura 12: Alinhamento da sequência obtida pela sequenciação com a sequência da TTR humana (hTTR) usando o programa Clustal Omega.

Tendo em conta os resultados obtidos e a sua respetiva análise verificou-se que a sequência da TTR se encontrava íntegra sem qualquer vestígio de mutação, o que indicou que o processo poderia avançar com estes clones.

4.2 Produção no hospedeiro *E.coli* DH5α

Após a confirmação da sequência do gene, transformaram-se células de *E. coli* DH5α com o vetor recorrendo ao método de choque térmico. Na construção do vetor recorreu-se a células de *E.coli* XL1B. Contudo esta estirpe não era a mais adequada para a produção, já que foi testada e os rendimentos obtidos de vetor eram bastante reduzidos (aproximadamente, 32 µg/mL, os resultados não se encontram apresentados), pelo que se optou por trabalhar com células de *E. coli* DH5α de modo a se obter rendimentos superiores. O seu crescimento foi realizado primeiramente em placas de Petri com meio Luria-Bertani (LB) e, seguidamente, em meio Terrific Broth (TB). Para se realizar a fermentação propriamente dita retirou-se uma alíquota da cultura da pré-fermentação para a fermentação, que permaneceu em crescimento sob as mesmas condições até atingir uma DO₆₀₀ entre 5-6 tendo em conta que a DO₆₀₀ inicial era de 0,2. Os valores da DO₆₀₀ foram registados em intervalos de 1 hora para se poder traçar a curva de crescimento (Figura 13).

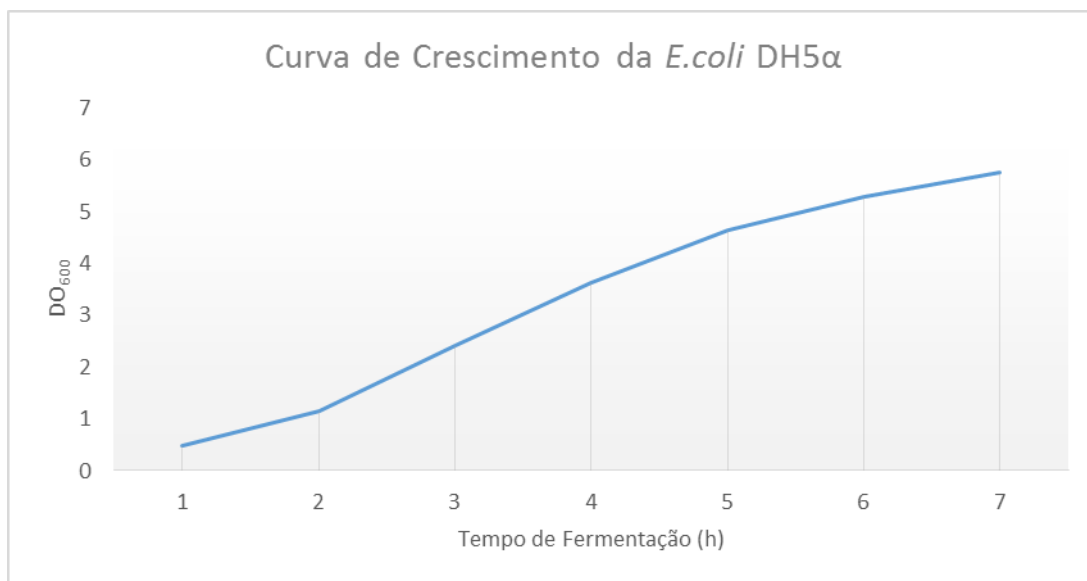


Figura 13: Curva de Crescimento da *E. coli* DH5α durante o tempo de fermentação.

Analisando a curva de crescimento obtida para a *E. coli* DH5α verifica-se que possui um perfil semelhante a outros descritos para a produção de plasmídeos [74]. Pode-se constatar a presença de duas fases bem definidas, a primeira relacionada com uma pequena fase de adaptação (fase lag) entre as 1-2 horas e posteriormente uma fase de crescimento exponencial (fase log) entre as 2-7 horas. É de notar também a tendência para desacelerar o crescimento a partir das 6h de fermentação, sugerindo a entrada numa fase estacionária do crescimento.

A fermentação decorreu até se atingir uma DO₆₀₀ entre 5-6 já que é nesta fase que a obtenção de plasmídeo na forma superenrolada é superior. A forma superenrolada é a mais ativa comparativamente às formas linear e circular aberta e por isso o interesse na sua produção e recuperação [74,75].

4.3 Recuperação do vetor pCAG-hTTR

A recuperação do vetor foi realizada recorrendo ao kit NZYMaxiprep da empresa NZYTech, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante que se baseia num procedimento de lise alcalina modificado. A concentração do vetor foi realizada por precipitação com isopropanol e o pellet final ressuscitado em 1 mL de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Foram retiradas amostras ao longo do processo de extração para avaliar a eficiência do processo: a primeira amostra foi retirada após a segunda centrifugação para a obtenção do sobrenadante contendo o vetor, ou seja, o lisado (A1), a segunda amostra foi retirada após eluição do sobrenadante, na qual são eluídas as espécies não retidas (A2), a terceira amostra corresponde à eluição associada ao processo de lavagem com os primeiros 30 mL da solução QC (A3), a quarta amostra foi retirada após a adição dos 30 mL seguintes da solução de QC (segunda lavagem) (A4) e a quinta é o produto final (F). As diversas amostras foram analisadas por eletroforese horizontal

usando um gel de agarose 1,0% com GreenSafe Premium com uma corrida de 120 V durante 30 min (Figura 14).

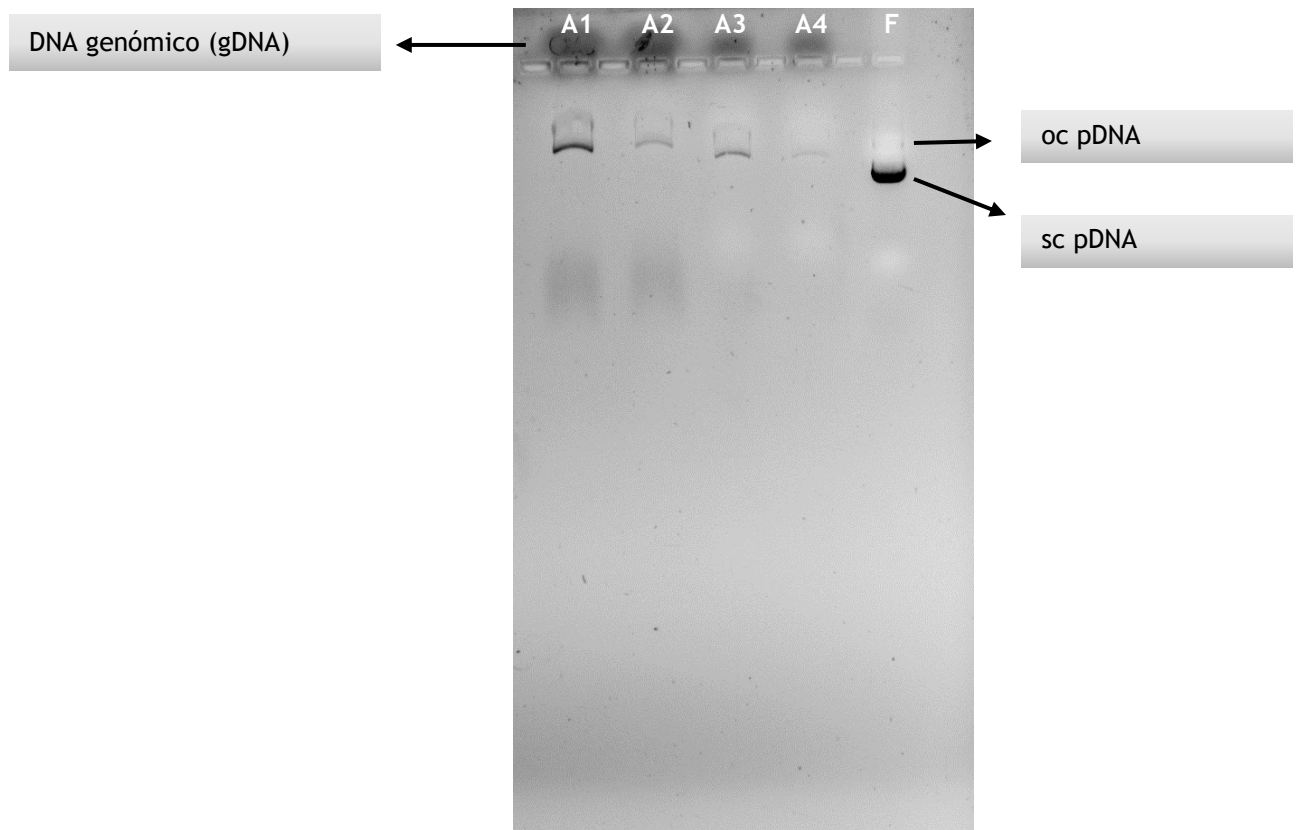


Figura 14: Maxiprep realizado para obtenção do vetor pCAG-hTTR. A1: amostra recolhida após a segunda centrifugação (lisado); A2: amostra recolhida após eluição do sobrenadante (espécies não retidas); A3: amostra recolhida após a primeira adição de QC (1ª lavagem); A4: amostra recolhida após a segunda adição de QC (2ª lavagem); F: amostra final. oc pDNA (forma circular aberta do pDNA); sc pDNA (forma superenrolada do pDNA).

Analisando os resultados obtidos nesta eletroforese verifica-se a presença de vetor em todos os poços, mas também se observa a presença de DNA genómico nos poços das amostras 1, 2, 3 e 4. Na primeira amostra era esperado verificar-se uma banda correspondente ao vetor visto que se trata do lisado apenas, sem qualquer tipo de purificação. Contudo nos poços correspondentes às amostras 2, 3 e 4 não era suposto aparecer nenhuma banda, a sua presença indica que ao longo do processo foram sendo perdidas quantidades mínimas de vetor, o que não seria pretendido. A perda de vetor nos passos intermédios poderia ser evitada diminuindo a concentração de sal existente na solução de lavagem de modo a aumentar a interação entre o DNA e a coluna, mas essa diminuição da concentração de sal também poderia originar a retenção dos contaminantes existentes em solução.

No último poço que corresponde à amostra final observa-se uma banda com uma intensidade muito mais acentuada que corresponde à forma superenrolada do DNA, que era previsto já que se trata do vetor purificado. Contudo verifica-se a existência de uma banda menos

notória a um peso molecular superior que corresponde à forma circular aberta do DNA, que apresenta maior raio hidrodinâmico e por isso a migração é menos acentuada.

É ainda importante realçar que apesar de ter sido perdido algum vetor ao longo do processo, o produto final está purificado, não apresentando vestígios de RNA.

A concentração de pCAG-hTTR foi determinada no NANOPhotometer (Implen) e verificou-se que o vetor obtido após a extração possuía uma concentração de 201 µg/mL.

4.4 Avaliação da eficiência de encapsulação e do potencial zeta

Depois de se recuperar o vetor, este foi sujeito a nanoencapsulação com CS. Foram criados dois ratios de N/P diferentes (30 e 50) [57] de modo a avaliar qual teria a melhor eficiência de encapsulação e potencial zeta mais positivo. O potencial zeta corresponde à carga superficial das nanopartículas, e quanto mais positivo este valor, melhor será a eficiência de transfecção uma vez que a repulsão eletrostática entre a carga negativa da membrana e a carga das nanopartículas será menor. Foram ainda avaliadas diferentes concentrações de DNA (5, 10, 15 e 50 µg/mL) para verificar quais as melhores condições para a preparação dos sistemas de entrega. Após a encapsulação do vetor, o sobrenadante foi analisado por eletroforese horizontal usando um gel de agarose 1,0% com GreenSafe Premium com uma corrida de 120V durante 30 min para se verificar se todo o vetor tinha sido encapsulado (Figura 15 e Figura 16).

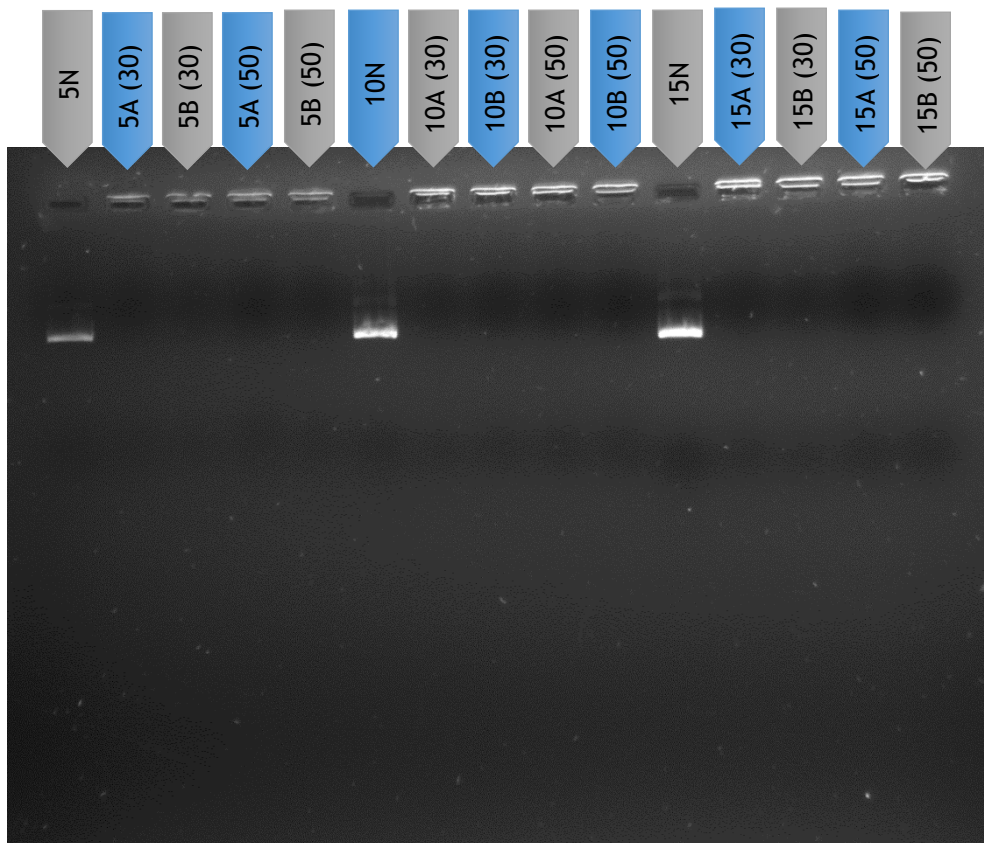


Figura 15: Amostras do sobrenadante após encapsulação do vetor com CS para os ratios N/P de 30 e 50 e para diferentes concentrações de DNA (5, 10 e 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), realizando duplicados (A e B). Utilizou-se como negativo (N) uma amostra de vetor que não foi sujeito a encapsulação (5N, 10N e 15N).

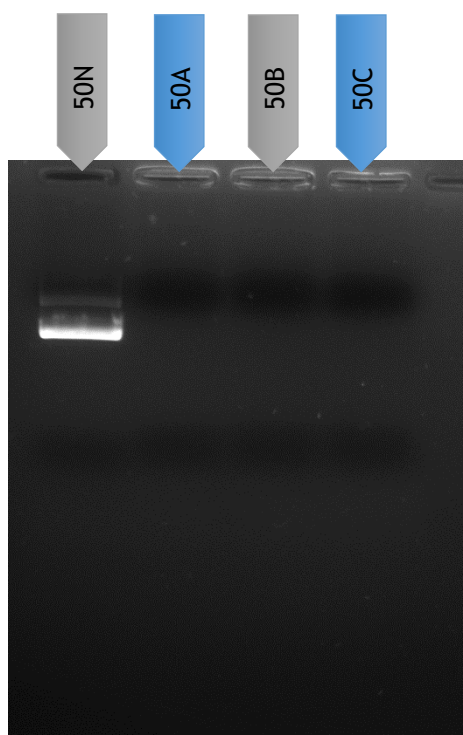


Figura 16: Amostras do sobrenadante após encapsulação do vetor com CS para o ratio N/P de 50 e para uma concentração de DNA de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, realizando triplicados (A, B, C). Utilizou-se como negativo (N) uma amostra de vetor que não foi sujeito a encapsulação.

Pelos resultados obtidos nas eletroforeses verifica-se a presença de uma banda correspondente ao vetor nos poços onde foram depositadas as amostras dos controles negativos e a ausência de bandas nos poços onde foram depositadas as amostras dos diferentes ratios e diferentes concentrações de pDNA, pelo que se pode inferir que o vetor foi totalmente encapsulado. Contudo, quando se calculou a eficiência de encapsulação (resultados não apresentados) constatou-se que esta era bastante reduzida atingindo um valor máximo de 30% para a concentração mais elevada de DNA e para o ratio mais elevado, sendo ainda inferior para as restantes concentrações e para o ratio N/P de 30. Ainda se analisou o potencial zeta destas nanopartículas e verificou-se que este era bastante negativo. Por estes motivos, optou-se por formular as nanopartículas com outro polímero a polietilenimina (PEI). No caso do PEI foram formuladas nanopartículas para diferentes ratios N/P (1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 7,5 e 12,5) com a mesma finalidade: para se avaliar qual teria melhor eficiência de encapsulação e potencial zeta mais positivo. Neste caso a concentração de DNA final foi mantida constante em 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [57]. Como no caso anterior, depois da encapsulação do vetor, o sobrenadante foi analisado por eletroforese horizontal usando um gel de agarose 1,0% com GreenSafe Premium com uma corrida de 120V durante 30 min para se verificar se todo o vetor tinha sido encapsulado (Figura 17).

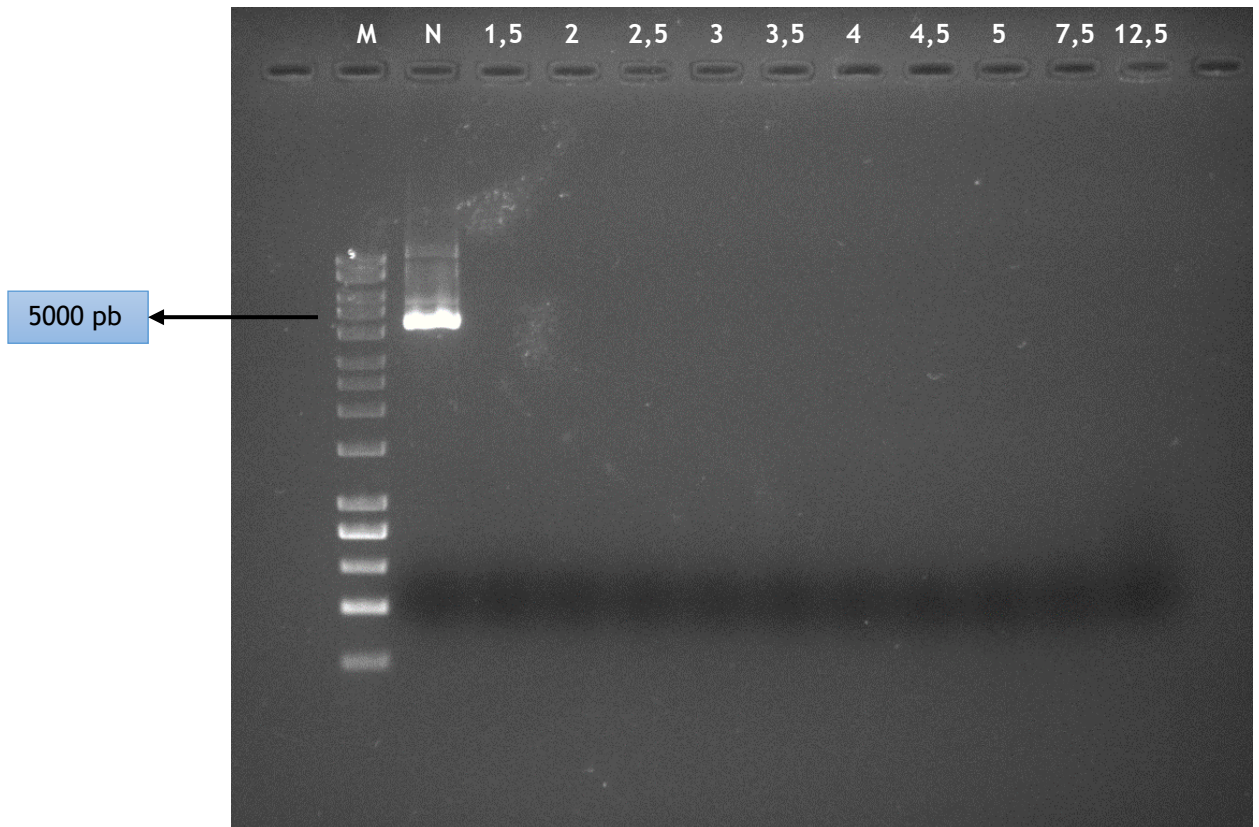


Figura 17: Amostras do sobrenadante após encapsulação do vetor para os ratios N/P de 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 7,5 e 12,5. Usando como negativo (N) uma amostra de vetor que não foi sujeito a encapsulação e como marcador de pesos moleculares (M) o HyperLadder 1kb.

Analisando a eletroforese, observa-se uma banda correspondente ao vetor no poço onde foi depositada a amostra do controlo negativo e a ausência de bandas nos poços onde foram depositadas as amostras dos diferentes ratios, pelo que se pode depreender que o vetor foi totalmente encapsulado. No entanto para se verificar a eficiência de encapsulação (% EE) (Figura 18) procedeu-se também à leitura da absorvância das amostras do sobrenadante no espectrofotómetro UV-Vis a 260 nm para quantificar o vetor que não foi encapsulado através da equação (1):

$$(\% EE) = \frac{\text{Concentração total do vetor} - \text{Concentração do vetor existente no sobrenadante}}{\text{Concentração total do vetor}} \times 100 \quad (1)$$

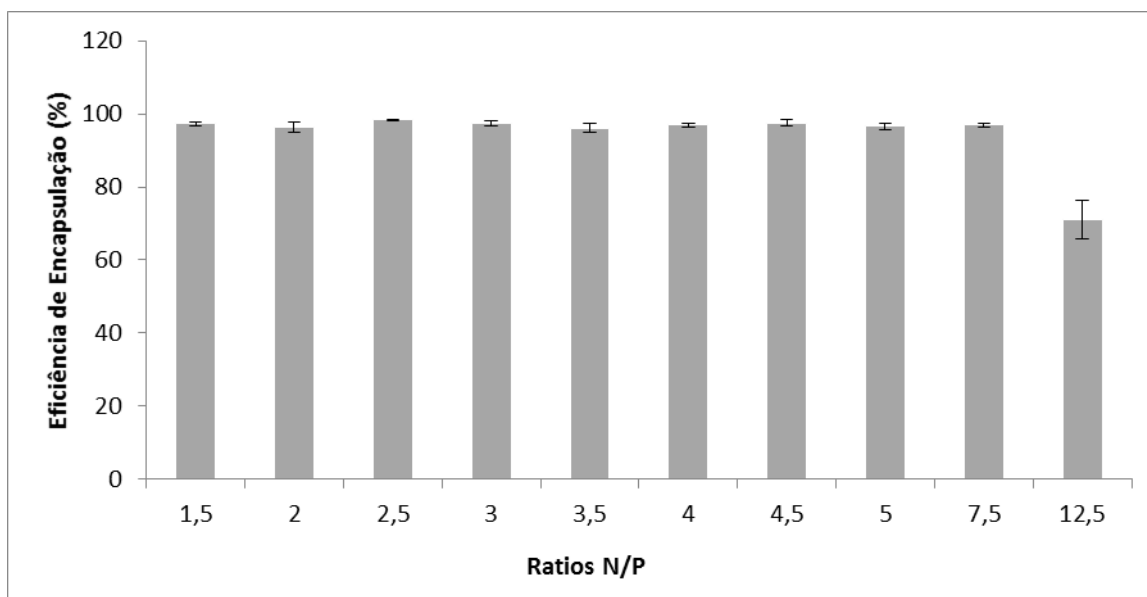


Figura 18: Eficiência de encapsulação dos políplexos pDNA-PEI. As médias e desvios-padrão são apresentados (linhas verticais no gráfico) de três medições independentes (foram realizados triplicados).

Analisando a Figura 18 verifica-se que a eficiência de encapsulação varia entre os 96% e os 98% com exceção do ratio mais elevado (12,5) que teve uma eficiência de encapsulação de, aproximadamente, 70%. Tendo em conta estes resultados e os obtidos na eletroforese pode-se deduzir que o vetor foi encapsulado quase na totalidade.

Contudo, não é só a encapsulação que vai definir uma boa transfecção mas também o potencial zeta das nanopartículas que, como previamente referido, influencia a transfecção na medida em que quanto mais positivo for este valor menor serão as forças repulsivas existentes entre a membrana celular, que possui carga negativa, e as nanopartículas. Assim, o potencial zeta das nanopartículas formuladas com os ratios N/P 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 e 7,5, foi medido recorrendo a um Zetasizer Nano ZS. Os restantes ratios N/P: 4,5 e 5, não são apresentados pois não possuíam alterações significativas na eficiência de encapsulação e o 12,5 não foi medido já que a sua eficiência de encapsulação era significativamente inferior (Tabela 7).

Tabela 7: Potencial zeta médio para vários ratios N/P do políplexo pCAG-hTTR-PEI. Os valores do potencial zeta foram calculados a partir dos dados obtidos de três medições independentes (média \pm DP, n=3)

Ratio N/P	Potential zeta (mV)
1,5	-35,43 \pm 0,38
2	-34,37 \pm 2,30
2,5	-29,43 \pm 2,12
3	-28,73 \pm 2,20
3,5	-17,93 \pm 0,47
4	-7,86 \pm 0,76
7,5	2,66 \pm 1,19

Analisaram-se os dados obtidos do potencial zeta para triplicados e verificou-se que quanto mais elevado é o ratio N/P mais positivo é o valor do potencial zeta, tornando-se mesmo positivo para o ratio de 7,5, pelo que se o ratio de 12,5 fosse testado provavelmente também teria um valor positivo. Com a análise destes resultados prevê-se que o único ratio que poderá promover uma transfecção mais eficiente, por minimização da repulsão entre as nanopartículas e a membrana celular, é o ratio de 7,5.

4.5 Screening de diferentes linhas celulares

Para se poder avaliar a expressão da TTR corretamente foi necessário escolher uma linha celular que não possua produção endógena dessa proteína, caso contrário os resultados obtidos podiam ser erróneos e corresponder apenas à produção endógena não tendo relação com o vetor de expressão. Assim, foi realizado um screening a diferentes linhas celulares utilizando para tal cDNA das células sujeitos a PCR usando *primers* intrínsecos à TTR e, posteriormente, analisados por eletroforese horizontal usando um gel de agarose 2,0% com GreenSafe Premium com uma corrida de 120 V durante 30 min (Figura 19). As amostras de cDNA analisadas pertenciam ao plexus coróide (1 e 6) e às linhas celulares: Z310 (Amostras 2 e 7); N27 (Amostras 3 e 8); N2A695 (48h) (Amostras 4 e 9) e N2A695 (72h) (Amostras 5 e 10). Como o objetivo é utilizar um vetor de expressão da TTR como terapia génica na DA, todas as células sujeitas ao screening são células neuronais.

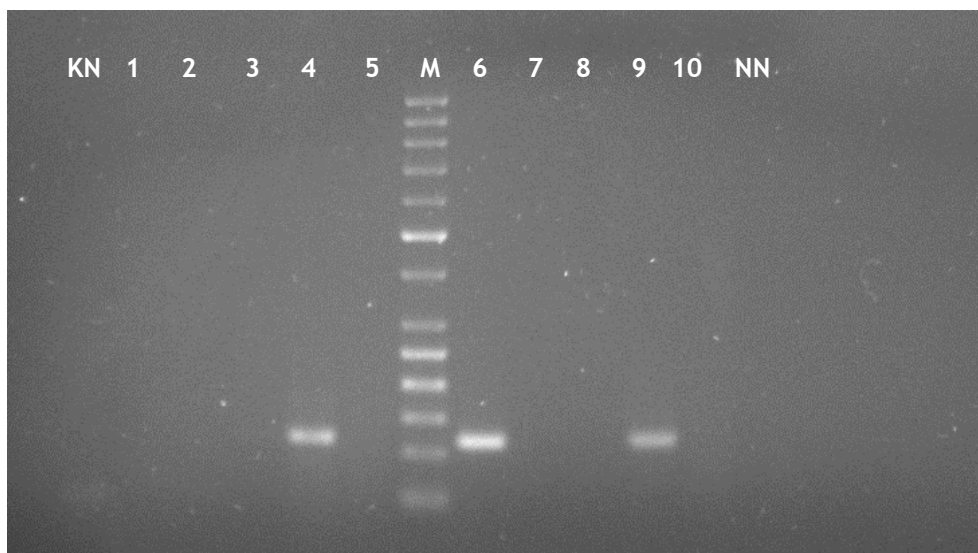


Figura 19: Screening dos cDNA pertencentes ao plexus coróide e a diferentes linhas celulares. KN: o PCR foi realizado usando a polimerase KAPA, sendo este o controlo. NN: o PCR foi realizado usando a polimerase Supreme, sendo este o controlo. Amostras 1 e 6: cDNA proveniente do plexus coróide. Amostras 2 e 7: cDNA da linha celular Z310. Amostras 3 e 8: cDNA da linha celular N27. Amostras 4 e 9: cDNA da linha celular N2A695 (48h). Amostras 5 e 10: cDNA da linha celular N2A695 (72h). O marcador de pesos moleculares (M) usado foi o GRS Ladder 50 bp.

Analisando a eletroforese obtida verifica-se a presença de TTR nos poços 4,6 e 9 correspondentes ao cDNA da linha celular N2A695 (48h) (poços 4 e 9) e ao cDNA proveniente do plexus coróide (poço 6). No entanto apesar de não se verificar a presença de nenhuma banda correspondente à TTR no poço 1, sabe-se que o plexus coróide produz TTR, pelo que este cDNA serviria como controlo positivo do PCR e não para ser usado para os estudos posteriores. Relativamente à linha celular N2A695 (72h) não foi escolhida, pois se há produção às 48h então é porque essas células têm produção endógena de TTR tanto às 48h como às 72h. A linha celular Z310 já tinha sido testada por estudos imunocitoquímicos, nos quais se verificou a produção e secreção de TTR, por isso também não pode ser usada [76], mas a partir dos resultados obtidos não se pode retirar essa conclusão visto que não aparece qualquer banda nos poços referentes a esta linha celular (poços 2 e 7), remetendo para o facto de poder ter ocorrido algum erro aquando deste processo. Assim sendo, resta a linha celular N27 cujos poços não possuem qualquer banda, o que implica que não houve amplificação usando *primers* humanos específicos da sequência da TTR pelo que, provavelmente, não há produção desta proteína nestas células.

4.6 Avaliação da viabilidade celular

Procedeu-se à transfecção da linha celular N27. As células N27 são células imortalizadas de neurónios dopaminérgicos bastante usadas em estudos de neurodegeneração e que não possuem uma produção endógena de TTR. A transfecção foi realizada depois das células se

encontrarem durante 12 h em meio sem soro e sem antibiótico o que permite a entrada das nanopartículas.

Para saber se os poliplexos são citotóxicos foi necessário realizar um estudo de viabilidade celular, assim sendo este estudo foi realizado 48 h e 72 h após a transfecção. Foram testados os diferentes ratios N/P: 1,5 (x1); 2 (x2); 2,5 (x3); 3(x4); 3,5 (x5); 7,5 (x6) (Figura 20).

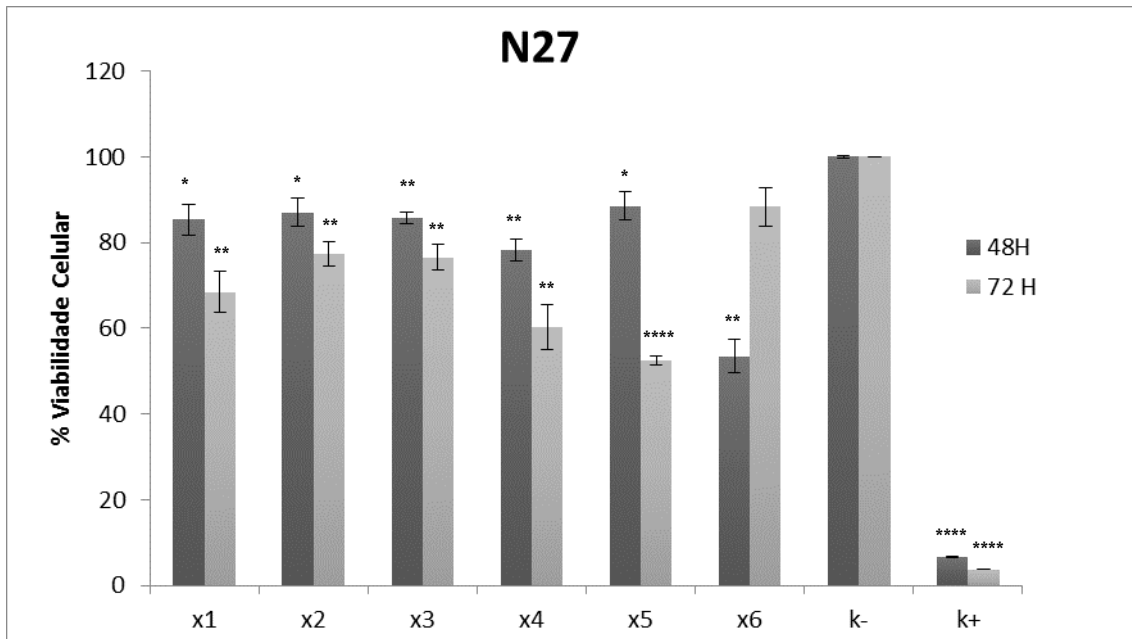


Figura 20: Viabilidade celular das N27 avaliada 48h e 72h após a transfecção com diferentes ratios N/P de poliplexo: 1,5 (x1); 2 (x2); 2,5 (x3); 3(x4); 3,5 (x5); 7,5 (x6). O K⁻ é o controlo negativo, no qual as células não foram transfectadas e o K⁺ é o controlo positivo no qual as células morreram por adição de etanol a 70%. As médias e desvios-padrão são apresentados (linhas verticais no gráfico) de três medições independentes (foram realizados triplicados). Foi realizado o teste t-student e as diferenças estatísticas significativas entre cada ratio e o controlo negativo para essa hora (48h ou 72h) são apresentadas (* p<0,05; ** p<0,01; **** p<0,0001 para $\alpha = 0,05$)

Verificou-se que 48h após a transfecção, a viabilidade celular diminuiu o que indica que as nanopartículas eram ligeiramente citotóxicas. No entanto, a viabilidade variou, aproximadamente, entre os 78% e os 88% com exceção do ratio mais elevado (7,5) que diminuiu significativamente para, aproximadamente, 53%, o que vai de encontro ao esperado visto que se trata de um ratio no qual a quantidade de PEI utilizada é superior e, como dito anteriormente, o PEI é um polímero que é considerado citotóxico devido à sua elevada densidade de carga.

Considerando este resultado, uma próxima abordagem poderia ser a avaliação de outros polímeros, como o ácido Poli Láctico-co-Glicólico (PLGA) [77] ou polisorbato 80 - revestido com Poli n-butilcianoacrilato (PnBCA) [66], ou recorrer a outro sistema de entrega como

nanomicelas ou nanotubos de carbono [61,78] com a finalidade de diminuir a citotoxicidade e, conseqüentemente, se obter um resultado significativamente melhor.

Relativamente às medições realizadas decorridas 72h, observa-se um decréscimo da viabilidade celular em todos os ratios, com exceção do ratio de 7,5 que aumenta comparativamente aos valores obtidos às 48h (88%). No entanto este resultado precisaria ainda de ser confirmado.

4.7 Western Blot

Para se realizar o western blot foram escolhidos dois ratios tendo em consideração os resultados obtidos no ensaio da viabilidade celular e na caracterização das nanopartículas. Assim foi escolhido o ratio de 2, cujos resultados da viabilidade celular eram mais coerentes de acordo com o tempo decorrido nos ensaios, e o de 7,5 já que foi o único ratio no qual as nanopartículas possuíam potencial zeta positivo (Figuras 21 e 22).

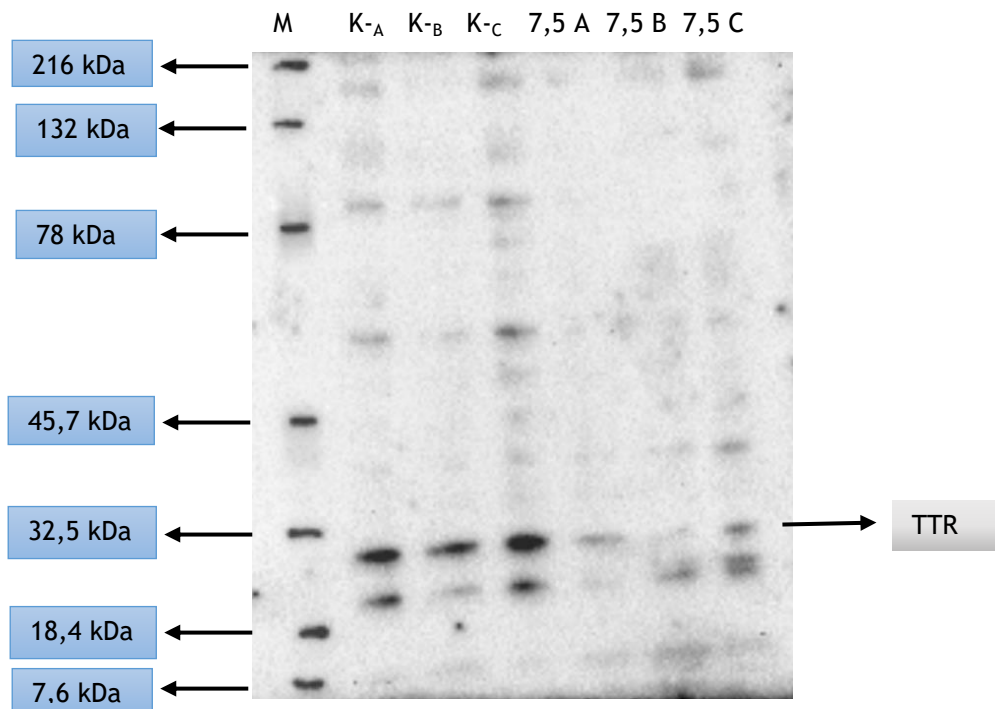


Figura 21: Amostras da proteína TTR extraída das células N27. O ratio apresentado é o de 7,5 e os K representam as células que não foram transfectadas. Foram realizados triplicados tanto para o ratio em estudo como para os controlos e este ensaio foi realizado em duplicado, sendo este resultado representativo de ambos.

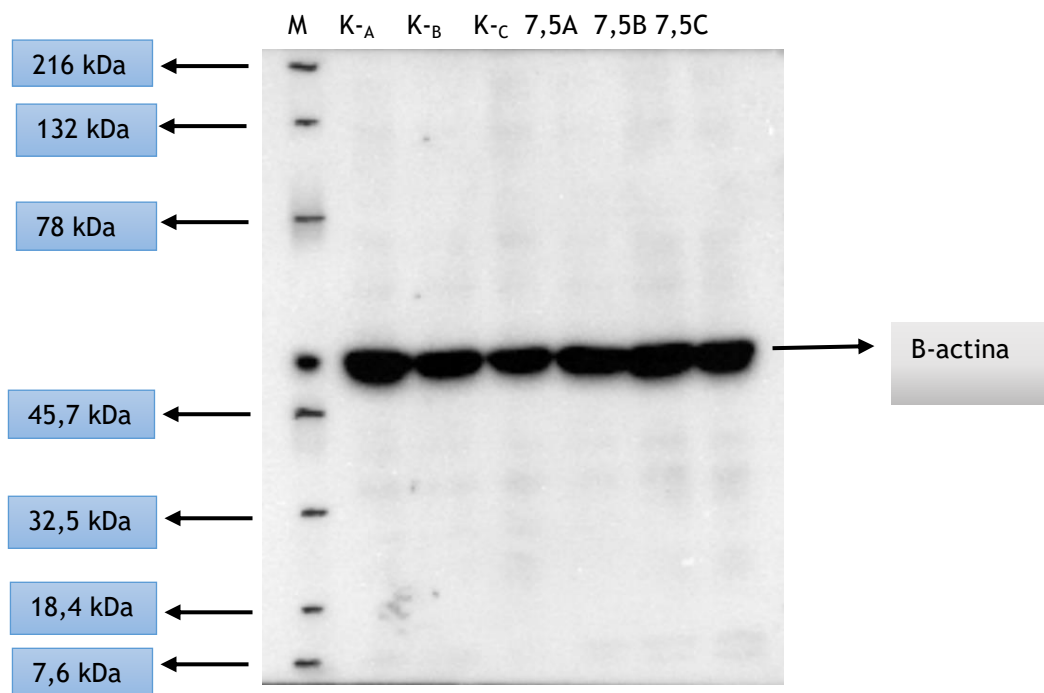


Figura 22: Marcação com o anticorpo α -B-actina. O ratio apresentado é o de 7,5 e os K⁻ representam as células que não foram transfectadas. Foram realizados triplicados tanto para o ratio em estudo como para os controlos e este ensaio foi realizado em duplicado, sendo este resultado representativo de ambos.

Tendo em conta os resultados obtidos não se pode retirar nenhuma conclusão definitiva. No entanto verifica-se que nas membranas sujeitas a marcação com o anticorpo primário α -TTR existe uma banda em todos os poços a, aproximadamente, 30 kDa que poderá corresponder aos dímeros da TTR. Neste caso, e confirmando-se este resultado, podemos inferir que as células N27 também possuem expressão endógena da TTR, uma vez que a banda é também visível nos controlos negativos, que correspondem às células não transfectadas. Este resultado não é concordante com os resultados obtidos no PCR aquando do screening das células. Contudo, como dito anteriormente, pode ter ocorrido algum erro ao nível do PCR já que nos poços onde foram depositadas as amostras correspondentes ao cDNA das células Z310 (que expressam TTR [76]) também não aparecia qualquer banda. Em relação às células N27, estas são usadas no estudo da doença de Parkinson [79], pelo que ainda não existem estudos a relacioná-las com a produção, ou ausência de expressão da TTR.

Analisando as membranas marcadas com o anticorpo primário α -B-actina, verifica-se que as bandas correspondentes a esta proteína são bem visíveis e delimitadas o que indica que não ocorreu qualquer erro no processamento da amostra. Todavia como os resultados não foram conclusivos não se pode descartar a possibilidade de que tenha ocorrido algum problema nos processos antecedentes a este ensaio, como: dificuldades na transfecção; problemas na expressão da TTR ou dificuldades na identificação.

Capítulo 5- Conclusões e Perspetivas

Futuras

A TTR é uma proteína que tem sido exaustivamente estudada para se compreender de que modo se encontra relacionada com a doença de Alzheimer. Esta proteína tem a capacidade de proteger os neurónios da toxicidade do péptido A β e modular os níveis deste péptido nas células neuronais. Por esse motivo, já existem alguns fármacos, em modelos animais, que têm como alvo terapêutico quer para promover o aumento da sua concentração [25]. Contudo os tratamentos que atualmente existem têm, na sua maioria, algumas desvantagens como o curto tempo de meia-vida, dificuldade na entrega às células-alvo e apenas conseguem aliviar os sintomas não diminuindo a progressão da doença [24,26].

Assim sendo, a terapia génica é uma alternativa bastante favorável, pelo que este trabalho pretendia a construção de um vetor de expressão não-viral (plasmídeo) que codificasse para a TTR. A construção do vetor pCAG-hTTR foi alcançada com sucesso. Analisando a sequência do vetor e do *insert* verificou-se a ausência de mutações, mostrando que o processo de replicação do vetor ocorreu sem provocar qualquer alteração. Relativamente à sua extração verificou-se que ao longo do processo foi sendo perdida uma quantidade mínima de vetor, que não comprometeu a continuidade do projeto. Contudo, de forma a minimizar a perda do vetor ao longo do processo, algumas otimizações poderiam ser realizadas, nomeadamente no que respeita às concentrações de sal usadas na sua purificação.

Relativamente ao sistema de entrega, foram desenvolvidas nanopartículas formuladas com PEI, verificando-se a encapsulação de uma grande quantidade de vetor (96%-98%) sendo menor para o ratio N/P 12,5 (70%), o oposto do que ocorreu quando se formularam nanopartículas com CS, cuja eficiência de encapsulação era bastante reduzida (<30%). Tendo em conta estes resultados pode-se concluir que ao nível da eficiência de encapsulação, o polímero PEI é melhor para encapsular o vetor do que o CS, já que para ratios mais baixos obtém-se uma eficiência de encapsulação superior. Quanto ao potencial zeta constatou-se que o ratio N/P 7,5 de PEI possuía um potencial zeta positivo ($2,66 \pm 1,19$ mV) que era o esperado pois o potencial zeta vai ficando mais positivo quanto mais elevado o ratio N/P mas não se analisou o potencial zeta do ratio N/P 12,5 pois era o que possuía menor eficiência de encapsulação. Contudo, o mesmo não se verificou para o CS, já que até para o ratio N/P 50, que é bastante elevado, o potencial zeta manteve-se negativo, pelo que, mais uma vez, se verifica que o PEI, comparativamente ao CS, era um polímero melhor para a formulação das nanopartículas. Porém, quando se realizou o ensaio da viabilidade celular, 48h e 72h após a transfecção das células N27, verificou-se um decréscimo da viabilidade (78% - 88% viabilidade) acentuando-se às 72h, mas o mesmo não ocorreu para o ratio N/P 7,5 já que ocorreu um decréscimo acentuado após 48h (53%) mas aumentou às 72h (88%), pelo que pode ter sido cometido algum erro aquando a transfecção e respetivo tratamento destas células. Tendo em consideração os resultados obtidos neste ensaio, pode-se concluir que o PEI é um composto

ligeiramente citotóxico, pelo que futuramente se deveria testar outro polímero para a formulação das nanopartículas, como o ácido Poli Láctico-co-Glicólico (PLGA) [77] ou polisorbato 80 - revestido com Poli n-butilcianoacrilato (PnBCA) [66] ou testar outro sistema de entrega diferente como nanomicelas ou nanotubos de carbono [61,78] ou ainda modificar-se a superfície das nanopartículas incorporando ligandos específicos de modo a promover a passagem destas através da BBB.

As células N27 foram escolhidas para a análise da expressão da TTR, pois aquando do screening realizado a diferentes linhas celulares neuronais (células do plexus coróide, Z310, N2A695 e N27) as células N27 seriam as únicas para as quais não era conhecida a expressão endógena de TTR. Para além disso, foi feito um PCR, não tendo ocorrido amplificação quando o seu cDNA foi sujeito a amplificação com *primers* complementares à sequência da TTR, pelo que era provável que não possuíssem produção endógena desta proteína. Todavia, a avaliar pelos resultados de western blot, e comprovando-se estes resultados, sugere-se que pode ter ocorrido algum erro na realização do PCR visto que a linha celular N27 tem produção endógena da TTR, visto que se visualiza uma banda intensa nos controlos negativos. Este erro ao nível do PCR é corroborado pela ausência de bandas nos poços, ou seja, ausência de amplificação, referentes à linha celular Z310 (que possui produção endógena da TTR). Futuramente, a linha celular N27 deveria ser testada, talvez com ensaios imunocitoquímicos para se avaliar se possui ou não produção endógena da TTR ou através de uma nova extração de RNA e respetiva transformação em cDNA, repetindo o PCR. Assim, os resultados do western blot não foram conclusivos, já que ocorreu uma marcação excessiva, talvez devido ao anticorpo ter perdido especificidade, pelo que não é possível saber concretamente qual banda pode corresponder à TTR, havendo apenas uma suspeita de se tratar da banda com maior intensidade uma vez que se localiza ligeiramente abaixo da marca correspondente a 32,5 kDa (o dímero da TTR possui 30 kDa de peso molecular). Contudo essa banda aparece em todos os poços, incluindo aqueles onde foram injetadas as amostras correspondentes aos controlos, ou seja, às células não transfectadas, pelo que caso se trate mesmo dessa banda, implica que as células N27 poderão ter expressão da TTR. Analisou-se, ainda, a β -actina e apareciam bandas bem definidas e intensas pelo que não ocorreu nenhum problema com a amostra. Deste modo, futuramente, poder-se-ia repetir o PCR, como dito anteriormente, e caso se verificasse a existência de produção endógena da TTR por parte das células N27 alterar-se o design do estudo utilizando outras células neuronais que não produzam TTR como os astrócitos [80].

Em resumo, pode afirmar-se que, pela primeira vez, foi construído um vetor de expressão que codifica para a TTR com o objetivo de promover a expressão desta proteína. Foi, ainda possível, criar-se um sistema de entrega do vetor através da formulação de nanopartículas com o polímero PEI de modo a promover a sua entrega às células-alvo. Faltou confirmar a transfeção da linha celular N27 com este vetor, bem como a expressão de TTR nestas células. Assim, para dar continuidade ao trabalho já efetuado é necessário i) reavaliar a expressão de TTR endógena nesta linha neuronal; ii) avaliar a eficiência de transfeção com o vetor

encapsulado e iii) reavaliar a produção de TTR em linhas neuronais que definitivamente não expressem TTR endógena. Uma vez esclarecidas e ultrapassadas estas questões, será necessário avaliar a capacidade do vetor nanoencapsulado em ultrapassar a barreira hematoencefálica e depois testar a sua eficácia em modelos animais de DA.

Capítulo 6- Bibliografía

- [1] Ingenbleek Y, Bernstein LH. Downsizing of Lean Body Mass is a Key Determinant of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2014;44:141950. doi:10.3233/JAD-141950.
- [2] Duthey B. Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and other Dementias, Update on 2004. *World Heal Organ* 2013:1-77.
- [3] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 2010;19:12-20. doi:10.1093/hmg/ddq160.
- [4] Patel N, Ramachandran S, Azimov R, Kagan BL, Lal R. Ion Channel Formation by Tau Protein: Implications for Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Biochemistry* 2015;54:7320-5. doi:10.1021/acs.biochem.5b00988.
- [5] Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40:121-35. doi:10.1111/nan.12084.
- [6] Jarero-Basulto JJ, Luna-Muñoz J, Mena R, Kristofikova Z, Ripova D, Perry G, et al. Proteolytic cleavage of polymeric tau protein by caspase-3: implications for Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:1145-61. doi:10.1097/NEN.000000000000013.
- [7] Faria TQ, Almeida ZL, Cruz PF, Jesus CSH, Castanheira P, Brito RMM. A look into amyloid formation by transthyretin: aggregation pathway and a novel kinetic model. *Phys Chem Chem Phys Phys Chem Chem Phys* 2015;17:7255-63. doi:10.1039/c4cp04549a.
- [8] Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Haupenthal VJ, Blümel T, et al. APP intracellular domain derived from amyloidogenic β - and γ -secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 2015;7:1-17. doi:10.3389/fnagi.2015.00077.
- [9] Janelidze S, Zetterberg H, Mattsson N, Palmqvist S, Vanderstichele H, Lindberg O, et al. CSF AB42/AB40 and AB42/AB38 ratios: better diagnostic markers of Alzheimer disease. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3:154-65. doi:10.1002/acn3.274.
- [10] Meisl G, Yang X, Hellstrand E, Frohm B, Kirkegaard JB, Cohen SI a, et al. Differences in nucleation behavior underlie the contrasting aggregation kinetics of the AB40 and AB42 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:9384-9. doi:10.1073/pnas.1401564111.
- [11] Philibert KD, Marr RA, Norstrom EM, Glucksman MJ. Identification and characterization of A β peptide interactors in Alzheimer's disease by structural approaches. *Front Aging Neurosci* 2014;6:1-9. doi:10.3389/fnagi.2014.00265.
- [12] Modi G, Pillay V, Choonara YE, Ndesendo VMK, du Toit LC, Naidoo D. Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 2009;88:272-85. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.05.002.

- [13] Fändrich M. Oligomeric intermediates in amyloid formation: Structure determination and mechanisms of toxicity. *J Mol Biol* 2012;421:427-40. doi:10.1016/j.jmb.2012.01.006.
- [14] Fu Z, Aucoin D, Davis J, Van Nostrand WE, Smith SO. Mechanism of Nucleated Conformational Conversion of A β 42. *Biochemistry* 2015;54:4197-207. doi:10.1021/acs.biochem.5b00467.
- [15] Du W-J, Guo J-J, Gao M-T, Hu S-Q, Dong X-Y, Han Y-F, et al. Brazilin inhibits amyloid β -protein fibrillogenesis, remodels amyloid fibrils and reduces amyloid cytotoxicity. *Sci Rep* 2015;5:7992. doi:10.1038/srep07992.
- [16] Vieira M, Gomes JR, Saraiva MJ. Transthyretin Induces Insulin-like Growth Factor I Nuclear Translocation Regulating Its Levels in the Hippocampus. *Mol Neurobiol* 2015;51:1468-79. doi:10.1007/s12035-014-8824-4.
- [17] Kabat EA, Moore DH, Landow H. an Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship To the Serum Proteins. *J Clin Invest* 1942;21:571-7. doi:10.1172/JCI101335.
- [18] Niemietz C, Chandhok G, Schmidt H. Therapeutic oligonucleotides targeting liver disease: TTR amyloidosis. *Molecules* 2015;20:17944-75. doi:10.3390/molecules201017944.
- [19] Li X, Zhang X, Ladiwala ARA, Du D, Yadav JK, Tessier PM, et al. Mechanisms of Transthyretin Inhibition of β -Amyloid Aggregation In Vitro. *J Neurosci* 2013;33:19423-33. doi:10.1523/JNEUROSCI.2561-13.2013.
- [20] Costa R, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Cardoso I. Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: A mechanism sensitive to the kunitz protease inhibitor. *PLoS One* 2008;3. doi:10.1371/journal.pone.0002899.
- [21] Cho PY, Joshi G, Johnson JA, Murphy RM. Transthyretin-Derived Peptides as β -Amyloid Inhibitors 2014. doi:10.1021/cn500014u.
- [22] Castaño EM, Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Beach T. Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. *Neurol Res* 2006;28:155-63. doi:10.1179/016164106X98035.
- [23] Gloeckner SF, Meyne F, Wagner F, Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, et al. Quantitative Analysis of Transthyretin, Tau and Amyloid- β in Patients with Dementia. *J Alzheimer's Dis* 2008;14:17-25.
- [24] Viola KL, Klein WL. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* 2015;129:183-206. doi:10.1007/s00401-015-1386-3.
- [25] Faxén-Irving G, Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jönhagen M, Basun H, Hjorth E, Palmblad J, et al. Effects on Transthyretin in Plasma and Cerebrospinal Fluid by DHA-Rich n - 3 Fatty Acid Supplementation in Patients with Alzheimer's Disease: The OmegAD Study. *J Alzheimer's Dis* 2013;36:1-6. doi:10.3233/JAD-121828.
- [26] Nilsson P, Iwata N, Muramatsu S, Tjernberg LO, Winblad B, Saido TC. Gene therapy in

- Alzheimer's disease - potential for disease modification (14). *J Cell Mol Med* 2010;14:741-57. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01038.x.
- [27] Chen KS, Gage FH. Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration. *J Neurosci* 1995;15:2819-25.
- [28] Smith DE, Roberts J, Gage FH, Tuszynski MH. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 1093-10898.
- [29] Conner JM, Darracq M a, Roberts J, Tuszynski MH. Nontropic actions of neurotrophins: subcortical nerve growth factor gene delivery reverses age-related degeneration of primate cortical cholinergic innervation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1941-6. doi:10.1073/pnas.98.4.1941.
- [30] Rosenberg MB, Friedmann T, Robertson RC, Tuszynski M, Wolff JONA, Breakefield X, et al. Grafting Genetically Modified Cells to the Damaged Brain : Restorative Effects of NGF Expression 1984;203:1983-6.
- [31] Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 2005;11:551-5. doi:10.1038/nm1239.
- [32] Andsberg G, Kokaia Z, Klein RL, Muzyczka N, Lindvall O, Mandel RJ. Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats. *Neurobiol Dis* 2002;9:187-204. doi:10.1006/nbdi.2001.0456.
- [33] Wu K, Meyers CA, Guerra NK, King MA, Meyer EM. The effects of rAAV2-mediated NGF gene delivery in adult and aged rats. *Mol Ther* 2004;9:262-9. doi:10.1016/j.ymthe.2003.11.010.
- [34] Nagahara AH, Merrill D a, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 2009;15:331-7. doi:10.1038/nm.1912.
- [35] Liu Y, Liu Z, Wang Y, Liang YR, Wen X, Hu J, et al. Investigation of the performance of PEG-PEI/ROCK-II-siRNA complexes for Alzheimer's disease in vitro. *Brain Res* 2013;1490:43-51. doi:10.1016/j.brainres.2012.10.039.
- [36] Iwata N. Presynaptic Localization of Neprilysin Contributes to Efficient Clearance of Amyloid- Peptide in Mouse Brain. *J Neurosci* 2004;24:991-8. doi:10.1523/JNEUROSCI.4792-03.2004.
- [37] Hemming ML, Patterson M, Reske-Nielsen C, Lin L, Isacson O, Selkoe DJ. Reducing amyloid plaque burden via ex vivo gene delivery of an A β -degrading protease: A novel therapeutic approach to alzheimer disease. *PLoS Med* 2007;4:1405-16. doi:10.1371/journal.pmed.0040262.
- [38] Spencer B, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Adame A, Potkar R, et al. Long-term neprilysin gene transfer is associated with reduced levels of intracellular Abeta and behavioral improvement in APP transgenic mice. *BMC Neurosci* 2008;9:109.

- doi:10.1186/1471-2202-9-109.
- [39] Guan H, Liu Y, Daily A, Police S, Kim MH, Oddo S, et al. Peripherally expressed neprilysin reduces brain amyloid burden: A novel approach for treating Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 2009;87:1462-73. doi:10.1002/jnr.21944.
- [40] Dodart J-C, Marr RA, Koistinaho M, Gregersen BM, Malkani S, Verma IM, et al. Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1211-6. doi:10.1073/pnas.0409072102.
- [41] Hong C-S, Goins WF, Goss JR, Burton E a, Glorioso JC. Herpes simplex virus RNAi and neprilysin gene transfer vectors reduce accumulation of Alzheimer's disease-related amyloid-beta peptide in vivo. *Gene Ther* 2006;13:1068-79. doi:10.1038/sj.gt.3302719.
- [42] Hartl DL, Jones EW. *Genetics: Principles and Analysis*. 1998.
- [43] Jones CH, Chen CK, Ravikrishnan A, Rane S, Pfeifer BA. Overcoming nonviral gene delivery barriers: Perspective and future. *Mol Pharm* 2013;10:4082-98. doi:10.1021/mp400467x.
- [44] Chira S, Jackson CS, Oprea I, Ozturk F, Pepper MS, Diaconu I, et al. Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget* 2015;6:30675-703. doi:10.18632/oncotarget.5169.
- [45] Robbins PD, Ghivizzani SC. *Viral Vectors for Gene Therapy*. *Pharmacol Ther* 1998;80:35-47. doi:10.1016/S0163-7258(98)00020-5.
- [46] Verma IM, Somia N. Gene therapy - promise, problems and prospects. *Nature* 1997;389:239-42. doi:10.1038/38410.
- [47] Lundstrom K, Boulikas T. Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technol Cancer Res Treat* 2003;2:471-86.
- [48] Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 2000;60:249-71.
- [49] Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol* 2003;21:117-22. doi:10.1016/S0167-7799(02)00042-2.
- [50] Nicholl DST. *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press; 2008.
- [51] Voß C. Production of plasmid DNA for pharmaceutical use. *Biotechnol Annu Rev* 2007;13:201-22. doi:10.1016/S1387-2656(07)13008-8.
- [52] Gaspar V, Melo-Diogo D De, Costa E, Moreira A, Queiroz J, Pichon C, et al. Minicircle DNA vectors for gene therapy: advances and applications. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:353-79. doi:10.1517/14712598.2015.996544.
- [53] Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:16-22. doi:10.1073/pnas.2235688100.
- [54] Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IGH. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: An update. *Trends Mol Med* 2003;9:67-72. doi:10.1016/S1471-4914(03)00005-4.
- [55] Zolochovska O, Xia X, Williams BJ, Ramsay A, Li S, Figueiredo ML. Sonoporation

- Delivery of Interleukin-27 Gene Therapy Efficiently Reduces Prostate Tumor Cell Growth *In Vivo*. *Hum Gene Ther* 2011;22:1537-50. doi:10.1089/hum.2011.076.
- [56] Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy A a, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet* 2014;15:541-55. doi:10.1038/nrg3763.
- [57] Pereira P, Jorge AF, Martins R, Pais AACC, Sousa F, Figueiras A. Characterization of polyplexes involving small RNA. *J Colloid Interface Sci* 2012;387:84-94. doi:10.1016/j.jcis.2012.07.088.
- [58] Namvar A, Bolhassani A, Khairkhah N, Motevalli F. Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection. *Biopolymers* 2015;103:363-75. doi:10.1002/bip.22638.
- [59] Thomas M, Klibanov AM. Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;62:27-34. doi:10.1007/s00253-003-1321-8.
- [60] Mansouri S, Lavigne P, Corsi K, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC. Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;57:1-8. doi:10.1016/S0939-6411(03)00155-3.
- [61] Modi G, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1184:154-72. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05108.x.
- [62] Wong SY, Pelet JM, Putnam D. Polymer systems for gene delivery-Past, present, and future. *Prog Polym Sci* 2007;32:799-837. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.007.
- [63] Roney C, Kulkarni P, Arora V, Antich P, Bonte F, Wu A, et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *J Control Release* 2005;108:193-214. doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.024.
- [64] De Boer AG, Gaillard PJ. Strategies to improve drug delivery across the blood-brain barrier. *Clin Pharmacokinet* 2007;46:553-76. doi:10.2165/00003088-200746070-00002.
- [65] Brambilla D, Le Droumaguet B, Nicolas J, Hashemi SH, Wu L-P, Moghimi SM, et al. Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues. *Nanomedicine* 2011;7:521-40. doi:10.1016/j.nano.2011.03.008.
- [66] Wilson B, Samanta MK, Santhi K, Kumar KPS, Paramakrishnan N, Suresh B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:75-84. doi:10.1016/j.ejpb.2008.03.009.
- [67] Sun C, Tang T, Uludağ H, Cuervo JE. Molecular dynamics simulations of DNA/PEI complexes: Effect of PEI branching and protonation state. *Biophys J* 2011;100:2754-63. doi:10.1016/j.bpj.2011.04.045.
- [68] Waegeman H, Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011;38:1891-910. doi:10.1007/s10295-011-1034-4.
- [69] Smith HE. The transcriptional response of *Escherichia coli* to recombinant protein

- insolubility. *J Struct Funct Genomics* 2007;8:27-35. doi:10.1007/s10969-007-9030-7.
- [70] Reixach N, Foss TR, Santelli E, Pascual J, Kelly JW, Buxbaum JN. Human-murine transthyretin heterotetramers are kinetically stable and non-amyloidogenic: A lesson in the generation of transgenic models of diseases involving oligomeric proteins. *J Biol Chem* 2008;283:2098-107. doi:10.1074/jbc.M708028200.
- [71] Du J, Murphy RM. Characterization of the interaction of β -Amyloid with Transthyretin monomers and tetramers. *Biochemistry* 2010;49:8276-89. doi:10.1021/bi101280t.
- [72] Sousa A, Sousa F, Queiroz JA. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2011;879:3507-15. doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.032.
- [73] Sousa A, Sousa F, Queiroz JA. Differential interactions of plasmid DNA, RNA and genomic DNA with amino acid-based affinity matrices. *J Sep Sci* 2010;33:2610-8. doi:10.1002/jssc.201000347.
- [74] Silva F, Passarinha L, Sousa F, Queiroz JA, Domingues FC. Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19:1408-14. doi:10.4014/jmb.0805.0329.
- [75] Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification. *J Gene Med* 2004;6 Suppl 1:54-66. doi:10.1002/jgm.512.
- [76] Zheng W, Zhao Q. Establishment and characterization of an immortalized Z310 choroidal epithelial cell line from murine choroid plexus. *Brain Res* 2002;958:371-80. doi:10.1016/S0006-8993(02)03683-1.
- [77] Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN V. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release* 2007;119:77-85. doi:10.1016/j.jconrel.2007.01.016.
- [78] Yang Z, Zhang Y, Yang Y, Sun L, Han D, Li H, et al. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2010;6:427-41. doi:10.1016/j.nano.2009.11.007.
- [79] Gao L, Zhou W, Symmes B, Freed CR. Re-cloning the N27 dopamine cell line to improve a cell culture model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2016;11:1-18. doi:10.1371/journal.pone.0160847.
- [80] Tsuzuki K, Fukatsu R, Yamaguchi H, Tateno M, Imai K, Fujii N, et al. Transthyretin binds amyloid beta peptides, Abeta1-42 and Abeta1-40 to form complex in the autopsied human kidney - possible role of transthyretin for abeta sequestration. *Neurosci Lett* 2000;281:171-4. doi:10.1016/s0304-3940(00)00834-x.

