



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# **Terapia do cancro do colo do útero: Avaliação do efeito terapêutico da ação combinada de uma droga e do DNA plasmídico**

**Rúben Miguel Ribeiro Faria**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Diana Costa  
Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ângela Sousa

**Covilhã, outubro de 2018**

# Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmãos.

# Agradecimentos

A elaboração deste trabalho e conclusão desta etapa na minha vida académica não seria possível sem o contributo de algumas pessoas, ficando desde já o meu agradecimento.

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Diana Costa e à Professora Doutora Ângela Sousa por me acolherem nos seus grupos de investigação, por me possibilitarem trabalhar numa área que tenho interesse, por todo o conhecimento científico transmitido e pela orientação, disponibilidade, confiança, apoio e ajuda ao longo deste ano.

Agradeço às alunas de doutoramento Margarida Almeida e Joana Valente por todo o apoio, ajuda, disponibilidade e partilha de conhecimentos nas atividades laboratoriais e pela simpatia e amizade ao longo de todo o trabalho. Agradecer também ao Pedro Almeida por me ajudar a dar os primeiros passos no trabalho laboratorial e pela sua simpatia e disponibilidade.

Agradecer à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por me ter permitido realizar todo o trabalho e disponibilizado todas as condições necessárias à realização desta dissertação. Um agradecimento especial à Dra. Ana Borges e à Dra. Catarina Ferreira pela ajuda, disponibilidade e transmissão de conhecimentos em relação à microscopia de confocal e tratamento de dados.

Agradecer também aos meus amigos Bruno Baptista, Ricardo Pais, Alexis Serralheiro, Duarte Rocha e José Santos pela amizade e ajuda nos momentos mais difíceis, mas principalmente por todos os momentos vividos e estarem sempre presentes nestes cinco anos de vida académica.

Aos meus pais, Elisabete Ribeiro e Filipe Faria, e irmãos, Alexandre Faria e Inês Faria, o meu maior agradecimento por todo o amor, carinho e suporte que me deram ao longo deste percurso. Obrigado por me aconselharem e apoiarem em todas as decisões e acreditarem em mim, sem vocês nada disto seria possível, são as pessoas mais importantes da minha vida.

Aos restantes familiares e amigos, fica o meu agradecimento pelo carinho, apoio e amizade.

Por último e não menos importante, um especial agradecimento à minha namorada Tatiana Nogueira por todo o amor, carinho e compreensão ao longo deste trajeto académico. Obrigado por todo o apoio e incentivo nos momentos mais difíceis, mas sobretudo por estares sempre ao meu lado e partilhares tudo comigo.

## Resumo

Na última década, vários investigadores têm realizado diversos estudos com o intuito de projetar e desenvolver sistemas de entrega de material genético que pudessem ser biocompatíveis e competentes para internalizar em células alvo. Este enorme contributo para o sucesso das terapias génicas foi complementado com a aplicação de sistemas de co-entrega que permitem entregar simultaneamente genes e drogas anticancerígenas. O efeito sinérgico demonstrado por estes agentes trouxe um enorme progresso na eficácia terapêutica para o tratamento de diversos cancros.

O cancro do colo do útero é um dos cancros com maior incidência nas mulheres em todo o mundo, especialmente em mulheres jovens. O aparecimento desta doença advém da infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV), sendo os genótipos de elevado risco responsáveis por 99,7% dos casos. Em particular, os genótipos do tipo 16 e 18 são responsáveis por mais de 70% das ocorrências. A infeção por HPV é responsável pela integração do genoma viral nas células do colo do útero levando à interrupção da sequência da proteína E2 que é repressora das oncoproteínas E6 e E7. A oncoproteína E6 induz a degradação do supressor de tumor p53, responsável por regular a apoptose das células. No caso da proteína E7, inibe a atuação da proteína do retinoblastoma (pRb) levando a uma desregulação do ciclo celular e consequente crescimento descontrolado das células.

O objetivo deste trabalho prende-se por repor os níveis da p53 no interior das células cancerígenas do colo do útero através da entrega de um plasmídeo (pDNA) que codifica para este supressor de tumor, e em simultâneo entregar também um fármaco anticancerígeno com o objetivo final de induzir a apoptose destas células de forma mais eficiente. Para este fim, foi desenvolvido um sistema de co-entrega baseado no polímero catiónico polietilenimina (PEI) que permitiu encapsular o DNA plasmídico que contém o gene da p53. Adicionalmente, o fármaco anticancerígeno metotrexato (MTX) foi também encapsulado nestes vetores poliméricos. A utilização da droga MTX na formulação destes sistemas deve-se, não só ao seu efeito terapêutico já comprovado em diversos tipos de cancro, mas também ao facto de ser reconhecido pelos recetores do ácido fólico, abundantemente presentes nas células tumorais, conferindo assim um direcionamento dos sistemas para as células alvo.

Os resultados obtidos neste trabalho revelam que os dois sistemas formulados (PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX) produziram nanotransportadores com características apropriadas em termos de morfologia, tamanho e carga à superfície para a captação e internalização celular dos dois agentes terapêuticos. As células HeLa foram transfetadas com sucesso pelos sistemas que contêm o gene responsável pela produção da proteína supressora de tumor p53. O efeito terapêutico dos dois sistemas foi avaliado, comprovando-se que os poliplexos que continham os dois bioativos inibiram com maior eficácia o crescimento das células tumorais em comparação com o sistema PEI/pDNA. O efeito sinérgico evidenciado nas células

cancerígenas com a utilização desta co-entrega de um agente genético e de um fármaco anticancerígeno é promissor para estudos adicionais *in vivo* e futura aplicação terapêutica. Além disso, a utilização combinada de quimioterapia e terapia génica nas células alvo representa um avanço incrível no desenvolvimento de intervenções terapêuticas inovadoras, podendo assim contribuir grandemente para a evolução do tratamento de vários tipos de cancro.

## **Palavras-chave**

Cancro do colo do útero, Metotrexato, Polietilenimina; Sistemas de co-entrega, Vírus do papiloma humano.

# Abstract

In the last decade, several researchers have conducted diverse studies with the aim of designing and developing delivery systems for genetic material that could be biocompatible and competent to internalize in target cells. This enormous contribution to the success of gene therapies was been complemented by the application of co-delivery systems, which allow to simultaneously deliver genes and anticancer drugs. The synergistic effect demonstrated by these agents has brought tremendous progress in therapeutic efficacy for the treatment of various cancers.

Cervical cancer is one of the cancers with the highest incidence in women worldwide, especially in young women. The cause of this disease is due to infection by the human papillomavirus (HPV), with high risk genotypes accounting for 99.7% of the cases. Specifically, genotypes of type 16 and 18 are responsible for more than 70% of occurrences. HPV infection is responsible for integrating the viral genome into the cells of the cervix, leading to the disruption of the E2 protein sequence - repressor of E6 and E7 oncoproteins. The E6 oncoprotein induces degradation of the p53 tumor suppressor, responsible for regulating cell apoptosis while E7 protein inhibits the action of the retinoblastoma protein (pRb), leading to a dysregulation of the cell cycle and consequent uncontrolled growth of cells.

The aim of this work is to restore the p53 levels within cervical cancer cells by delivering a plasmid encoding this tumor suppressor gene and, simultaneously, delivering an anticancer drug with the ultimate goal of inducing apoptosis of these cells more efficiently. To this end, a co-delivery system based on the cationic polymer polyethyleneimine (PEI) was developed, which allowed to encapsulate the plasmid DNA containing the p53 gene. In addition, the anticancer drug methotrexate (MTX) was also encapsulated into these polymeric vectors. The use of the MTX drug in the formulation of these systems is due not only to its already proven therapeutic effect in several types of cancer but also to the fact that it's recognized by folic acid receptors, abundantly present in tumor cells, thus conferring cancer cells targeting effect.

The results obtained in this work show that the two formulated systems (PEI/pDNA and PEI/pDNA/MTX) produced nanotransporters with appropriate characteristics in terms of morphology, size and surface charge, gene and drug loading/encapsulation efficiencies suitable for both the cellular uptake and internalization of the two therapeutic agents. HeLa cells were successfully transfected by systems containing the gene responsible for the production of p53 tumor suppressor protein. The therapeutic effect of the two systems was evaluated, proving that the polypeptides containing the two therapeutic agents were more effective to inhibit tumor cell growth, when compared to the PEI/pDNA system. The synergistic effect evidenced in cancer cells with the use of this co-delivery of a gene agent and an anticancer drug is promising for additional *in vivo* studies and future therapeutic

application. In addition, the combined use of chemotherapy and gene therapy in target cells represents an incredible advance in the development of innovative therapeutic interventions and can thus greatly contribute to the evolution of the treatment of various types of cancer.

## **Key-words**

Cervical cancer, Co-delivery systems, Human papilloma virus, Methotrexate, Polyethyleneimine.

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Cancro .....	1
1.2. Cancro do colo do útero .....	1
1.3. Vírus do Papiloma Humano .....	2
1.4. Classificação citológica do colo do útero.....	4
1.5. Sintomatologia no cancro do colo do útero .....	7
1.6. Prevenção, causas e riscos.....	7
1.7. Terapias atuais .....	8
1.8. Terapia génica .....	9
1.8.1. DNA plasmídeo .....	11
1.8.2. Sistemas de entrega na terapia génica .....	13
1.8.2.1. Vetores virais.....	13
1.8.2.2. Vetores não virais .....	14
1.9. Estratégias de co-entrega .....	15
1.10. Polietilenimina .....	19
1.11. Metotrexato .....	22
2. Objetivo .....	24
3. Materiais e métodos.....	25
3.1. Materiais .....	25
3.2. Métodos .....	25
3.2.1. Condições de crescimento bacteriano .....	25
3.2.2. Lise alcalina .....	26
3.2.3. Eletroforese em gel de agarose .....	26
3.2.4. Síntese de nanopartículas.....	26
3.2.5. Presença do MTX nos sistemas PEI/pDNA/MTX .....	27
3.2.6. Taxas de encapsulação .....	27
3.2.7. Morfologia das nanopartículas.....	28
3.2.8. Tamanho e potencial zeta ( $\zeta$ ) das nanopartículas .....	28
3.2.9. Cultura celular .....	28
3.2.10. Citotoxicidade dos sistemas .....	29
3.2.11. Capacidade de transfeção dos sistemas .....	29

3.2.11.1.	Marcação do plasmídeo com FITC .....	29
3.2.11.2.	Transfeção/aquisição de imagem .....	30
3.2.11.2.1.	Preparação das lâminas e marcação dos núcleos .....	30
	(Imunocitoquímica).....	30
3.2.11.2.2.	Imunocitoquímica .....	30
3.2.11.2.3.	<i>Live Cell Imaging</i> .....	30
3.2.11.3.	Quantificação da fluorescência .....	31
3.2.12.	Transcrição do gene codificado no plasmídeo.....	31
3.2.12.1.	Extração de RNA .....	32
3.2.12.2.	Síntese de cDNA .....	32
3.2.12.3.	RT-PCR .....	32
3.2.13.	Proliferação celular .....	33
4.	Resultados/Discussão .....	34
4.1.	Formulação e caracterização dos sistemas.....	34
4.1.1.	Encapsulação dos agentes terapêuticos .....	34
4.1.1.1.	Eficiência de encapsulação do pDNA .....	34
4.1.1.2.	Eficiência de encapsulação da droga MTX .....	36
4.1.4.	Tamanho dos complexos .....	41
4.1.5.	Potenciais de superfície .....	42
4.1.6.	Citotoxicidade.....	45
4.2.	Eficiência de transfeção .....	47
4.3.	Transcrição do gene da p53 .....	54
4.4.	Efeito terapêutico dos sistemas .....	55
5.	Conclusão e perspectivas futuras .....	58
6.	Referências bibliográficas.....	60
7.	Anexos .....	68

# Lista de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida do vírus HPV;

Figura 2 - Genoma e organização da estrutura do HPV;

Figura 3 - Representação esquemática da construção do plasmídeo;

Figura 4 - Ilustração esquemática dos quatro tipos principais de nanotransportadores para a co-entrega de genes e fármacos quimioterapêuticos;

Figura 5 - Representação das estruturas químicas da PEI linear de 10 kDa e da PEI ramificada de 25 kDa;

Figura 6 - Representação esquemática da hipótese da esponja de protões;

Figura 7 - Representação da estrutura do ácido fólico e metotrexato;

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose da amostra de pDNA inicial e do sobrenadante dos sistemas formulados a vários rácios;

Figura 9 - Espectro de FTIR da polietilenimina, pDNA, metotrexato e do sistema PEI/pDNA/MTX de rácio N/P= 5 e concentração de MTX de 6 µg/mL;

Figura 10 - Imagens SEM das nanopartículas formuladas;

Figura 11 - Potencial zeta vs. rácio N/P dos sistemas formulados;

Figura 12 - Percentagens da viabilidade celular das células HeLa e dos fibroblastos após 48 h de transfeção com o rácio N/P = 2 e 5;

Figura 13 - Percentagens da viabilidade celular das células HeLa após 48 h de transfeção com os sistemas PEI/pDNA/MTX de rácio N/P = 5 e concentrações de MTX 2 e 6 µg/mL;

Figura 14 - Imagens relativas à transfeção das células HeLa (6 horas de transfeção) utilizando o pDNA livre e os vários sistemas PEI/pDNA de rácio N/P = 1,5, 2 e 5;

Figura 15 - Imagens relativas à transfeção das células HeLa utilizando os vários sistemas em estudo;

Figura 16 - Imagem ortogonal relativa à transfeção das células HeLa utilizando o sistema PEI/pDNA/MTX de rácio N/P = 5 e concentração de MTX 6 µg/mL;

Figura 17 - Avaliação da diferença de transfeção dos rácios N/P = 5 para os sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX com concentração de MTX de 2µg/mL e 6µg/mL;

Figura 18 - Intensidade de fluorescência relativa do plasmídeo marcado com FITC;

Figura 19 - Resultados de RT-PCR para células HeLa após 12 e 24 horas de transfeção;

Figura 20 - Proliferação das células HeLa transfetadas com os sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX, incubadas em meio com MTX 6 µg/mL e não transfetadas;

Figura 21 - Poster apresentado no 12º Simpósio da Sociedade Europeia de Ciências da Engenharia Bioquímica (ESBES).

# Lista de tabelas

Tabela 1 - Classificação das neoplasias intraepiteliais do colo do útero;

Tabela 2 - Nanotransportadores recentes de co-entrega de drogas quimioterapêuticas e agentes genéticos;

Tabela 3 - Percentagens de encapsulação do pDNA para os rácios N/P= 1; 1,5; 2; 5 e 10 dos sistemas PEI/pDNA;

Tabela 4 - Percentagens de encapsulação do pDNA para os rácios N/P= 1; 1,5; 2 e 5 dos sistemas PEI/pDNA/MTX utilizando três concentrações de fármaco (2, 4 e 6 µg/mL);

Tabela 5 - Percentagens da eficiência de encapsulação do MTX para os rácios N/P= 1,5; 2 e 5 dos sistemas PEI/pDNA/MTX utilizando três concentrações de fármaco (2, 4 e 6 µg/mL);

Tabela 6 - Tamanho das nanopartículas de PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX (2, 4 e 6 µg/mL) formuladas a rácio N/P = 1,5;

Tabela 7 - Tamanho das nanopartículas de PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX (2, 4 e 6 µg/mL) formuladas a rácio N/P = 2;

Tabela 8 - Tamanho das nanopartículas de PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX (2, 4 e 6 µg/mL) formuladas a rácio N/P = 5;

Tabela 9 - Potenciais Zeta dos sistemas PEI/pDNA para os diversos rácios;

Tabela 10 - Potenciais Zeta dos sistemas PEI/pDNA/MTX para os diversos rácios.

# Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ATP: Trifosfato de adenosina

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar

CIN: Neoplasia Intraepitelial Cervical

CIS: Carcinoma *in situ*

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

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

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

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO: Densidade Ótica

DP: Desvio Padrão

*E. coli*: *Escherichia coli*

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA: *Food and Drug Administration*

Fibro: Fibroblastos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FTIR: Espectroscopia de Infravermelhos com Transformadas de Fourier

G: Força Gravitacional

HPV: Vírus do Papiloma Humano

HSIL: Lesões Intraepiteliais de alto grau

ICC: Carcinoma Invasivo Cervical

IST: Infecções sexualmente transmissíveis

kDa: Quilo Dalton

kpb: Quilo pares de bases

LB: Meio Luria-Bertani

LSIL: Lesões Intraepiteliais de baixo grau

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

MTX: Metotrexato

N: Grupos amina

NaCl: Cloreto de sódio

NIBS: *Non-invasive backscatter*

nm: Nanómetros  
oc: circular aberta  
P: Grupos fosfato  
PBS: Tampão fosfato-salino  
pDNA: DNA plasmídico  
PEI: Polietilenimina  
PFA: Paraformaldeído  
pRB: Proteína Retinoblastoma  
RME: Endocitose mediada por recetores  
RNA: Ácido Ribonucleico  
RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa  
sc: superenrolada  
SEM: Microscopia Eletrónica de Varrimento  
SIL: Lesões Intraepiteliais  
siRNA: Pequeno RNA de interferência  
TAE: Tris-Acetato-EDTA  
TE: Taxa de Encapsulação  
UV: Ultra-violeta  
°C: Graus Celsius

## O trabalho apresentado nesta tese resultou em:

Comunicação oral no XII simpósio anual CICS-UBI, Covilhã (2018): Faria R., Sousa Â., Costa D., *Cervical cancer therapy: Assessment of the therapeutic effect of the combined action of a drug and plasmid DNA.*

Apresentação de poster no 12º Simpósio da Sociedade Europeia de Ciências da Engenharia Bioquímica (ESBES), Lisboa (2018): Costa D., Faria R., Queiroz J.A., Sousa Â., Almeida A.M., *Ligand-functionalized polyplexes for targeted and co-delivery cancer therapy.* (Figura 21, Anexos)

Elaboração de um artigo científico com os resultados apresentados nesta dissertação, em fase de escrita no momento da entrega desta tese.

# 1. Introdução

## 1.1. Cancro

O cancro é a segunda maior causa de morte em todo o mundo e estima-se que o cancro do colo do útero represente cerca de 5% de todos os casos. As doenças oncológicas são consideradas a grande epidemia dos últimos anos, pelo facto de apresentarem elevada morbilidade e elevadas taxas de mortalidade. O cancro advem de alterações nos mecanismos de controlo do ciclo celular que resultam num crescimento descontrolado de uma célula anormal. Com este contínuo crescimento desequilibrado, as células cancerígenas multiplicam-se, formando uma massa de tecido, intitulada de tumor, podendo invadir e causar a destruição de tecidos normais adjacentes (Macedo *et al.*, 2008).

As lesões tumorais são diagnosticadas realizando uma biopsia, o que permite identificar e classificar os diversos tipos de tumor e as suas características, conforme o tipo de células envolvidas. Os diversos tipos de cancro são classificados consoante as células e órgãos afetados:

- Carcinoma, se as células forem epiteliais;
- Sarcomas, se as células forem de tecido de suporte (ossos, cartilagem, gordura, músculo, vasos ou outros tecidos conjuntivos);
- Leucemias, linfomas ou mielomas, se as células entrarem na corrente sanguínea;
- Melanomas, que têm origem em células da pele;
- Glioblastomas, se as células forem do sistema nervoso central, do cérebro e espinal medula (Bruni *et al.*, 2017; Mota, 2012).

## 1.2. Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero é o quarto tipo de cancro mais comum nas mulheres, no entanto este apresenta uma importância superior em relação ao cancro da mama e colorretal que são mais frequentes nas mulheres. Esta relevância deve-se ao facto de apresentar uma maior incidência em mulheres jovens (menos de 45 anos) quando em comparação com os restantes cancros (Chabeda *et al.*, 2018). O cancro do colo do útero advém da infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV) que apresenta mais de 170 genótipos. O HPV é classificado em dois grupos, os de baixo e alto risco. Os de baixo risco provocam verrugas genitais em que se incluem os tipos HPV - 6/11/40/42/43/44/54/61/72. Os tipos HPV - 16/18/31/35/39/45/51/52/ e 56/58/66/68 são os de elevado risco e são responsáveis por cerca de 99,7% de todos os casos de cancro do colo do útero (Limberger *et al.*, 2012). O HPV tipo 16 e 18 são os mais prevalentes, sendo responsáveis por mais de 70% dos casos de doença. As infeções provocadas

pelos tipos de alto risco levam ao desenvolvimento de neoplasias intraepiteliais escamosas no colo do útero e útero (Ramakrishman *et al.*, 2015).

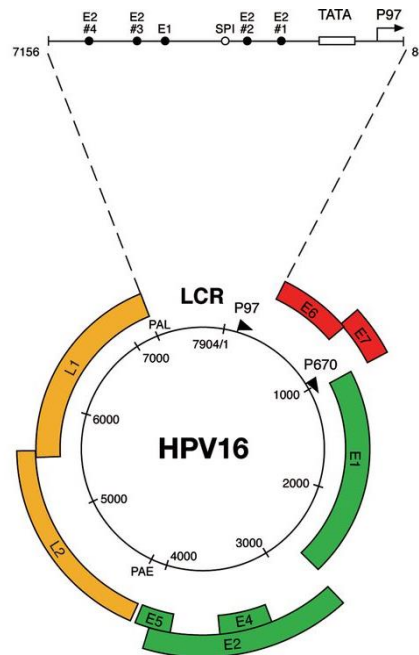
### 1.3. Vírus do Papiloma Humano

O HPV é um vírus icosaédrico da família *Papillomaviridae*, constituído por DNA circular de cadeia dupla com aproximadamente 8000 pares de bases, possui cápside e tem entre 50 a 60 nm de diâmetro (Chabeda *et al.*, 2018). Infecta células da camada basal das células epiteliais através de fissuras na superfície das células e é mantido nos núcleos de células basais infetadas. O DNA viral é integrado no genoma das células eucarióticas e à medida que as células basais se dividem em células epiteliais escamosas, o DNA do vírus replica-se e atinge um elevado número de cópias. Com a diferenciação das células epiteliais basais, o vírus amplifica o seu material genético e provoca alterações na expressão génica das células, levando à expressão dos genes virais (figura 1) (Christensen *et al.*, 2015).



Figura 1 - Ciclo de vida do vírus HPV. Adaptado de (Chabeda *et al.*, 2018)

Os genes do HPV são designados por “Early” (E) ou “Late” (L) de acordo com o estágio de diferenciação, nomeadamente os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos no início, enquanto os genes L1 e L2 são expressos durante os estágios finais da diferenciação. As proteínas iniciais (E) são expressas em baixas concentrações e são responsáveis pela manutenção do genoma e proliferação celular. Nas lesões malignas, o genoma viral é integrado no DNA das células do hospedeiro (Hennessey *et al.*, 2009). Eles também regulam a expressão de proteínas tardias de uma maneira dependente da diferenciação celular: L1 e L2 são expressos apenas em células escamosas maduras (figura 2) (Chabeda *et al.*, 2018).



**Figura 2** - Genoma e organização da estrutura do HPV. A região LCR indica a região de controle, a verde os genes iniciais (E1, E2, E4 e E5), a amarelo os genes tardios (L1 e L2) e a vermelho estão representados os oncogenes (E6 e E7). Adaptado de (Doorbar, 2006).

A cápside é formada pelas proteínas L1 e L2, sendo a L1 a proteína principal, enquanto a L2 é a proteína de ligação ao DNA viral que facilita o transporte da proteína L1 para o núcleo da célula (Christensen *et al.*, 2015). As proteínas L1 e L2 ligam-se aos recetores das células epiteliais e começam o processo de entrada, resultando na remoção do epitélio citoplasmático do vírus e na entrada do genoma no núcleo da célula infetada, onde é transcrito e depois replicado (Chabeda *et al.*, 2018).

Os oncogenes E6 e E7 são expressos devido à inativação da expressão da proteína E2, que é o repressor transcricional destes genes. O genoma viral é integrado no DNA cromossómico do hospedeiro e a sequência do E2 é interrompida durante a linearização do genoma (Chabeda, 2018). Esta inativação promove a imortalização da célula através da degradação ou inibição de proteínas supressoras de tumor que regulam o ciclo celular (p53 e pRB). Consequentemente ocorre uma expressão descontrolada das oncoproteínas E6 e E7, resultando na proliferação e transformação celular (Best *et al.*, 2012).

A oncoproteína E6 promove a degradação do supressor de tumor p53 por uma via mediada pela ubiquitina, diminuindo a capacidade da célula para sofrer apoptose (Best *et al.*, 2012). A oncoproteína E6 também apresenta função na ativação da telomerase que resulta no prolongamento da vida das células, e, juntamente com a oncoproteína E7, coopera para a imortalização das células epiteliais humanas (Christensen *et al.*, 2015).

A proteína E7 liga-se e inibe a proteína do retinoblastoma (pRb), responsável por bloquear a atividade de fatores de transcrição, promovendo a dissociação da pRb com o fator E2F (fator de transcrição), levando a transição do ciclo celular para a replicação da fase S, resultando na perda do controlo do ciclo celular e consequente proliferação celular descontrolada (Best *et al.*, 2012).

As células que expressam E6 sofrem alterações cromossómicas estruturais, e as células que expressam E7 acumulam numerosas anomalias cromossómicas e desenvolvem aneuploidia. O efeito final da atividade das oncoproteínas E6 e E7 é a progressão do ciclo celular desregulado e a replicação do DNA do HPV em células epiteliais escamosas infetadas, e eventual oncogénese (Hennessey *et al.*, 2009).

#### **1.4. Classificação citológica do colo do útero**

A citologia é um exame médico que permite analisar as células do colo do útero, nomeadamente a sua morfologia, crescimento e função. Em caso de infeção por HPV, este exame clínico permite avaliar as alterações nas células em comparação com as células normais e realizar uma classificação das lesões provocadas. As lesões de pré-malignidade, como é o caso de carcinomas epidermóides que resultam da progressão de estádios não invasivos, podem ser classificadas de acordo com os seguintes sistemas (Bruni *et al.*, 2018):

- **Citologia normal (Negativa para lesões intraepiteliais malignas)** - A citologia realizada às células do colo do útero não apresenta qualquer anomalia;
- **Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN) / Lesões intraepiteliais escamosas (SIL)** - A citologia realizada às células do colo do útero revela lesões pré-malignas.

Os termos CIN e SIL são usados para descrever lesões pré-malignas e/ou crescimento anormal de células escamosas no colo do útero. As lesões intraepiteliais escamosas são detetadas pelo teste de Papanicolau e citologias. No caso das neoplasias é realizado um diagnóstico histológico através de tecido obtido do colo do útero por biópsia ou excisão cirúrgica. A condição é classificada como CIN 1, 2 ou 3 dependendo da espessura do epitélio anormal (Bruni *et al.*, 2018).

As lesões pré-malignas detetadas no colo do útero foram designadas por Reagan em 1953 por displasias malpighianas e carcinoma *in situ* (CIS). Em 1967, Richart definiu três estádios e em 1988, Bethesda definiu mais dois estádios, de acordo com a tabela 1 (Mota, 2012).

Tabela 1 - Classificação das neoplasias intraepiteliais do colo do útero. Adaptado de (Mota, 2012).

Classificação das neoplasias intraepiteliais cervicais e suas inter-relações		
REAGAN (1953)	RICHART (1967)	BETHESDA (1988)
Displasia ligeira	CIN-1	LSIL
Displasia moderada	CIN-2	HSIL
Displasia grave	CIN-3	
Carcinoma <i>in situ</i>		

Richart definiu o seu sistema em relação à espessura do epitélio malpighiano com diferenciação celular anormal. A diferença de espessura foi analisada atendendo às alterações da estratificação celular e da sua maturação e pela atipia citológica. Assim, pelos critérios do seu sistema, Richart definiu três estádios diferentes. Em relação ao sistema de Bethesda, este foi criado para classificar esfregaços citológicos de células do colo do útero. Bethesda propôs a terminologia SIL ((lesões intraepiteliais escamosas) de baixo (*low*) e alto (*high*) grau. As lesões de baixo grau (LSIL) abrangem as coilocitoses e/ou as CIN-1. No caso das lesões de alto grau (HSIL), estas incluem a CIN 2 e/ou a CIN 3 (Solomon *et al.*, 1989).

A classificação de neoplasia e lesões intraepiteliais (CIN/SIL) é realizada tendo em consideração a organização, maturação, polaridade e atividade mitótica das células do cancro do colo do útero (Bruni *et al.*, 2017; Bruni *et al.*, 2018):

- **Lesões de baixo grau do colo do útero (CIN-1/ LSIL):** As lesões de baixo grau são definidas por mudanças precoces no tamanho, forma e número de células anormais formadas na superfície do colo do útero. Os núcleos destas células são geralmente arredondados ou ovais e ligeiramente irregulares no tamanho e forma. O tamanho e forma dos núcleos tornam-se mais irregulares com o desenvolvimento da patologia.

- **Lesões de alto grau do colo do útero (HSIL/ CIN-2/ CIN-3/ CIS):** As lesões de alto grau são definidas por um grande número de células pré-cancerosas na superfície do colo do útero. Estas células, muito diferentes das normais, têm um enorme potencial para se tornarem cancerígenas e invadirem tecidos mais profundos do colo do útero. Estas lesões podem ser referidas como displasia moderada ou grave, HSIL, CIN-2, CIN-3 ou carcinoma cervical *in situ* (CIS).

- **Carcinoma *in situ* (CIS):** células pré-cancerígenas que ainda não possuem capacidade de romper a membrana basal e invadir outros tecidos, permanecendo no epitélio.

- **Carcinoma invasivo cervical (ICC):** células pré-cancerígenas de alto grau que têm a capacidade de invadir a membrana basal e atingir tecidos mais profundos do colo do útero ou outros tecidos e órgãos. Existem 4 estágios dos ICC, que vão desde o cancro no útero/colo do útero (estágio I) até ao desenvolvimento de células cancerígenas noutros órgãos distantes, como por exemplo no fígado (estágio IV). Existem dois tipos de ICC:

- **Carcinoma de células escamosas invasivas** - Carcinoma invasivo composto por células que se assemelham às do epitélio escamoso.

- **Adenocarcinoma** - tumor invasivo com elementos glandulares e escamosos misturados.

A substituição da nomenclatura atribuída por Reagan pelo sistema de Bethesda contribuiu para aperfeiçoar o diagnóstico das lesões CIN, para melhorar a compreensão da evolução da doença e conseqüentemente permitir o desenvolvimento de novas terapias. Assim, foi possível relacionar a infeção por HPV de baixo e alto risco à CIN 1, e que a CIN 2 e 3 estão associadas ao HPV de alto risco (Lorincz *et al.*, 1992).

## 1.5. Sintomatologia no cancro do colo do útero

O aparecimento de células cancerígenas, provenientes maioritariamente de uma infeção por HPV de alto risco, pode ocorrer em mulheres de todas as idades. O desenvolvimento de um tumor numa fase inicial neste tipo de casos é assintomático, no entanto alguns sinais têm sido associados ao diagnóstico da infeção por HPV. A sensação de prurido, ardor durante o ato sexual, hemorragias intermenstruais, metrorragias pós-menopausa e aparecimento de verrugas genitais são alguns dos sinais evidenciados (Mota, 2012; Leto *et al.*, 2011).

O cancro do colo do útero em estados mais avançados manifesta-se através de dor pélvica, uropatia obstrutiva, leucorreia fétida, disúria e hematúria ou retrorragias quando existe invasão da bexiga e reto. Pode apresentar ainda sintomas mais comuns e menos indicativos como por exemplo a perda de peso, anemia, lombalgias, perda de massa muscular e dores na região inguinal (Carter, 2013; Govindappagari *et al.*, 2011).

## 1.6. Prevenção, causas e riscos

O cancro é um problema global e crescente, mas heterogénio, pois cada vez mais se verifica maior incidência em países pouco desenvolvidos (de baixo/médio rendimento). A prevenção primária surge como a principal arma de defesa nestes países, uma vez que este tipo de prevenção não precisa de ser renovado a cada geração. A prevenção primária tem várias vantagens: a eficácia da prevenção pode ter benefícios para outras pessoas além das diretamente visadas; evitar a exposição a agentes carcinogénicos pode prevenir outras doenças (transmissíveis e não transmissíveis) que têm fatores de risco em comum com o cancro e a causa pode ser removida ou reduzida a longo prazo - por exemplo, por meio de medidas regulatórias contra exposições ocupacionais ou ambientais. Assim sendo, a prevenção primária deve ser prioritária como parte integrante do controlo global do cancro (Vineis *et al.*, 2014; Riethmuller *et al.*, 2015).

Os principais fatores de risco para o aparecimento do cancro são o tabagismo, consumo de álcool, pouca atividade física e uma dieta pouco saudável. No entanto existem outras causas como infeções oncológicas crónicas, doenças sexualmente transmissíveis, carcinogénicos ocupacionais (amianto, aminas aromáticas, benzidina, benzeno) e carcinogénicos ambientais (poluição do ar, arsénico, afloxoxina, bifenilas policloradas, radónio, cromo, cádmio, níquel, berílio) (Vineis *et al.*, 2014).

Em relação aos fatores de risco do cancro do colo do útero, a infeção pelo vírus do papiloma humano é a principal causa. A transmissão do vírus acontece principalmente através da atividade sexual (Barasso *et al.*, 1987). As células basais do epitélio são infetadas pelo vírus em áreas de metaplasia cervical imatura ou microtraumatismo. O genoma viral penetra nas células através da membrana celular, havendo libertação da cápside, sendo depois transportado até ao núcleo. A capacidade das células se dividirem e de se clonarem acelera a replicação viral. O período de incubação do HPV ronda em média 3 meses (Jenison *et al.*, 1990). No entanto, apenas uma infeção por HPV não é por si só suficiente para o desenvolvimento de cancro do colo do útero, podendo ser eliminada pelo sistema imunitário. Existem outros co-fatores que influenciam a evolução do estado de infeção ao aparecimento de células cancerígenas como, por exemplo: o início da atividade sexual precoce, promiscuidade sexual e antecedentes de outras infeções sexualmente transmissíveis (IST), a alimentação, sobretudo com baixos níveis de vitamina A e C e de ácido fólico, raça, tabagismo e a falta de uso de preservativo (Mota, 2012).

A diminuição de ocorrência da infeção por HPV, e conseqüentemente do cancro do colo do útero, tem-se verificado com estratégias de prevenção ao controlo do cancro. A vacinação surge como a melhor estratégia de prevenção. A vacinação precoce previne o aparecimento de casos de cancro do colo do útero, diminuindo assim a taxa de incidência e mortalidade no nosso país. Outras intervenções recomendadas são a “Educação para a Saúde”, promovendo a saúde e prevenindo a doença, sobre as práticas sexuais seguras, como a utilização do preservativo, advertência para os perigos do tabaco, que muitas vezes começam na adolescência (Direção Geral da Saúde, 2017).

Numa prevenção secundária, a deteção precoce de lesões pré-malignas com programas de rastreio, como o teste do papanicolau (denominada citologia cervical) tem sido a primeira abordagem selecionada para rastreio deste tipo de lesões. Tal como os dados epidemiológicos comprovam, a introdução da citologia no rastreio foi a medida de maior êxito na redução da mortalidade por cancro do colo do útero (Goldie *et al.*, 2005).

## 1.7. Terapias atuais

As vacinas comercializadas contra o vírus do papiloma humano são apenas preventivas, ou seja, consistem na administração de uma proteína antigénica, por exemplo, para ativar o sistema imune levando à produção de anticorpos de memória, caso não exista ainda contato com o vírus. Além disto, apresentam outras limitações, tais como o elevado custo e a não protegem contra todos os tipos de HPV. As primeiras vacinas comercializadas contra o HPV foram a Cervarix™, vacina bivalente constituída por partículas virais do HPV 16 e 18, e a Gardasil™, vacina quadrivalente constituída por partículas virais para os tipos de HPV 16 e 18, bem como para os tipos 6 e 11 (Dochez *et al.*, 2014).

Atualmente são recomendadas e usadas vacinas de nove valências (tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58). Esta vacina, que está presente no plano nacional de vacinação de Portugal, deve ser administrada em duas doses com intervalo de meio ano, a crianças com 10 anos de idade. A utilização desta vacina permite maximizar a imunidade contra a infeção por HPV (Direção Geral da Saúde, 2017).

As vacinas comercializadas são produzidas a partir de partes da proteína da cápside L1 do HPV. A administração destes antígenos induz uma resposta serológica mais forte e de maior duração do que a resposta desenvolvida perante uma infeção natural, devido ao uso de adjuvantes específicos (Dochez *et al.*, 2014). Estas vacinas são seguras, imunogénicas e altamente eficazes na prevenção, não só da infeção persistente pelos tipos incluídos nas vacinas, mas também na prevenção de lesões precursoras de carcinomas. Porém podem causar reações adversas que provocam febre, náuseas, fadiga, dores de cabeça e tonturas. As vacinas profiláticas apresentam evidências de proteção cruzada contra a infeção por sorotipos não incluídos na vacina, mas nenhuma delas possui efeitos terapêuticos (Dochez *et al.*, 2014). Assim sendo, existe uma grande necessidade de desenvolver soluções que, para além de prevenirem, sejam capazes de tratar tumores malignos induzidos por HPV. A terapia génica tem surgido como um método terapêutico promissor (Zhao *et al.*, 2014).

## 1.8. Terapia génica

A terapia génica tem-se tornado numa área de interesse para o tratamento de várias doenças. Este tipo de terapia surgiu devido ao avanço na área da genómica, o que permitiu compreender o papel dos genes em determinadas patologias (Xu *et al.*, 2014; Foldvari *et al.*, 2015). A terapia génica tem como princípio a introdução de material genético terapêutico (ácidos nucleicos) em células somáticas com o objetivo de suprimir, alterar ou complementar o efeito de um gene deficiente responsável por uma doença (Xu *et al.*, 2014; Ramamoorth *et al.*, 2015). Em 1963, Joshua Lederberg foi o primeiro a propor uma terapia deste género, em que pretendia controlar a sequência de nucleótidos em cromossomas humanos e fazer uma seleção e incorporação de genes específicos. A aplicação de terapias génicas tem aumentado ao longo dos anos e com isso surgiu a necessidade de desenvolver veículos (vetores) que possam proteger e entregar o material genético de forma adequada (Yla-Herttuala, 2012; Zhao *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2014).

Uma das preocupações na aplicação deste tipo de terapia prende-se com a segurança dos vetores que são utilizados. Assim, os veículos usados para entregar o material genético devem ser seguros, apresentar eficiência de transfeção e capacidade de compactar e proteger o material genético da degradação na corrente sanguínea. A facilidade de penetração destes vetores nas células alvo é fundamental, uma vez que por si só, o material genético terá muita dificuldade em entrar nas células e será degradado por nucleases (Bajpai *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Além disso, os sistemas de entrega que permitam uma elevada eficiência de transfeção também vão permitir a entrada de elevadas quantidades de material genético nos tecidos/células alvo, garantindo assim que a terapia seja eficaz e produza os efeitos terapêuticos desejáveis (Pereira *et al.*, 2014).

A terapia génica pode ser aplicada sob a forma de duas abordagens, a terapia génica de células somáticas e a terapia génica da linhagem germinativa. A terapia génica germinativa consiste na introdução de um gene em células reprodutivas (espermatozoide ou óvulos) ou posteriormente no zigoto, o que resulta na transmissão do gene de interesse para a descendência. No caso da terapia génica somática, a introdução do gene de interesse ocorre nas células alvo do paciente onde é necessária a aplicação da terapia. Devido a questões éticas a terapia em células somáticas tem sido mais estudada (Tachibana *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2005).

Os sistemas de entrega surgem como veículos que podem ser aplicados tanto na terapia génica como em vacinas de DNA, pois têm como objetivo facilitar a entrada do DNA nas células eucarióticas, assim como o transporte e entrega no núcleo sem sofrer degradação. Para serem eficientes, estes sistemas de entrega devem conseguir transportar o DNA independentemente do seu tamanho, devem ter a capacidade de entregar o gene apenas às células alvo (entrega direcionada) e devem ser fáceis de preparar, económicos, de baixa toxicidade e disponíveis comercialmente em altas concentrações, como é o caso do DNA plasmídico (Ibraheem *et al.*, 2014).

### 1.8.1. DNA plasmídeo

O DNA plasmídico, descoberto por Joshua Lederberg em 1952, é uma pequena molécula de DNA de cadeia dupla circular que se auto-replica dentro da célula hospedeira (Lederberg, 1952). Esta molécula tem sido explorada em aplicações terapêuticas por ser um agente seguro, apresentar baixa toxicidade e devido à facilidade de produção. Apresenta tamanhos entre 1 e 1.000kpb e peso molecular entre  $10^6$  e  $10^7$  Dalton. O seu esqueleto hidrofílico é composto por um grupo fosfato e um açúcar, já no seu interior apresenta bases azotadas e propriedades hidrofóbicas. Esta molécula pode apresentar-se em três conformações diferentes: a isoforma linear, circular aberta (oc) ou superenrolada (sc), sendo esta última a que tem maior interesse terapêutico, uma vez que é a mais eficiente em termos de expressão do gene de interesse (Han *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2008).

Os plasmídeos são amplamente utilizados como vetores não-virais devido à sua capacidade de integrar DNA exógeno e replicarem-se no núcleo das células alvo (Lederberg, 1952). Este biofármaco tem sido amplamente explorado na terapia de DNA pois apresenta uma série de vantagens que encaixam nas características deste tipo de vetores, uma vez que é produzido por fermentação bacteriana, o que faz com que seja mais fácil controlar a sua produção associada a um custo reduzido (Ibraheem *et al.*, 2014).

A obtenção de pDNA na isoforma sc para aplicações terapêuticas pode ser dividida em duas partes distintas. A primeira parte consiste na construção do plasmídeo inserindo o gene de interesse, seguido da transformação das células hospedeiras (por exemplo a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*)) (Diogo *et al.*, 2005) e por último a replicação e amplificação do número de cópias de pDNA através do crescimento das células transformadas por fermentação. A segunda parte baseia-se na extração do plasmídeo das células hospedeiras, seguido de isolamento e purificação da isoforma sc de entre outros constituintes do hospedeiro como por exemplo RNA, DNA genómico, endotoxinas e proteínas. A primeira parte do processo de obtenção do plasmídeo é designada de “upstream” enquanto que a segunda parte é designada de “downstream” (Ferreira *et al.*, 2000).

O pDNA escolhido como vetor de expressão deve conter determinados genes que são cruciais para a obtenção deste vetor, nomeadamente um gene de origem de replicação para garantir a amplificação do plasmídeo no interior do hospedeiro de forma independente da sua maquinaria. Deve também conter um gene de resistência a antibiótico (marca de seleção) para crescerem apenas as células transformadas. Além dos genes essenciais à amplificação deste vetor em células procariotas, o plasmídeo também deve apresentar uma cassete de expressão eucariota, nomeadamente um promotor e uma sequência de terminação para iniciar e concluir a expressão do gene de interesse nas células alvo (Figura 3) (Prather *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

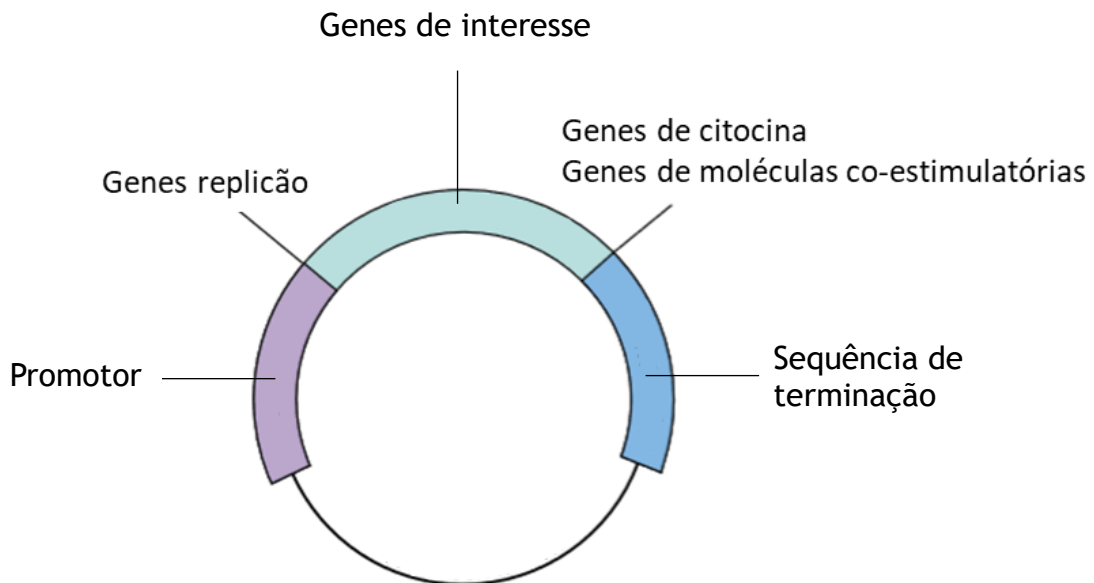


Figura 3 - Representação esquemática da construção do plasmídeo. Adaptado de (Liu, 2003).

A produção do pDNA sc ocorre no interior do hospedeiro sendo necessário aplicar uma estratégia de lise celular para extrair a molécula alvo. A lise alcalina é considerada um método adequado, uma vez que permite romper a membrana celular através do uso de detergentes e pH elevado, sem danificar o pDNA. O plasmídeo para ser utilizado em aplicações terapêuticas tem de ser isolado e purificado, de forma a respeitar os critérios das agências reguladoras como a *Food and Drug Administration* (FDA). A purificação do pDNA sc tem sido explorada por diversas técnicas de cromatografia, nomeadamente exclusão molecular, troca iónica, interação hidrofóbica e afinidade (Sousa *et al.*, 2008). A forma estrutural dos suportes cromatográficos também tem evoluído, desde a aplicação de esferas não porosas até às membranas e monolitos, sendo possível explorar quase todos os princípios cromatográficos em qualquer tipo de suporte, através da imobilização do ligando adequado (Sousa *et al.*, 2012).

## 1.8.2. Sistemas de entrega na terapia génica

A manipulação genética de células de mamíferos é atualmente utilizada na vasta área de ciências biomédicas e medicina. Os recentes avanços na genética molecular levaram ao aparecimento de vários tipos de ferramentas de modificação genética, incluindo plasmídeos, siRNA, microRNA, “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” (CRISPR)/Cas9 que foram utilizados em muitos estudos para a modificação do comportamento genético e transcrição de genes de interesse. De fato, as ferramentas mencionadas podem ser usadas para obtenção de biofármacos baseados em ácidos nucleicos, produção do modelo de doença, estudo dos caminhos metabólicos, produção de proteínas recombinantes, desenvolvimento de biossensores e terapia celular. No entanto surgem dificuldades para a aplicação da terapia génica uma vez que existem algumas barreiras, incluindo a membrana celular, o aprisionamento do endosoma e as nucleases séricas que reduzem a capacidade de transfeção. No sentido de ultrapassar estas limitações, surgem assim os sistemas de entrega virais e não virais (Cheraghi *et al.*, 2017).

### 1.8.2.1. Vetores virais

Os vírus têm uma grande capacidade de invadir células eucarióticas e usufruir da maquinaria nuclear do hospedeiro para intercalarem o seu material genético, e conseqüentemente levar à expressão das proteínas alvo nessas células. Devido a estas características, os vírus foram os primeiros vetores a serem utilizados na terapia génica para entregar genes terapêuticos ao núcleo das células alvo (Chira *et al.*, 2015).

Os vírus mais utilizados como sistemas de entrega são o retrovírus, o adenovírus e o lentivírus. Além da eficiência de evasão celular, estes tipos de vírus foram escolhidos devido à elevada capacidade de transdução e transcrição do material exógeno inserido no genoma viral (Ibraheem *et al.*, 2014; Kamimura *et al.*, 2011).

Para serem usados como sistemas terapêuticos, os vírus têm de ser modificados, nomeadamente os genes responsáveis pela sua patogenicidade são substituídos pelos genes terapêuticos. Estas alterações eliminam o seu efeito patogénico uma vez que o vírus recombinante fica incapaz de se replicar, no entanto mantêm a capacidade de transfetar as células alvo, o que é fundamental para este tipo de vetores (Bajpai *et al.*, 2014).

Os vetores virais apesar de apresentarem uma eficácia de transfeção essencial à aplicação de terapias génicas, têm várias desvantagens, tais como despoletar respostas imunitárias e inflamatórias severas, potenciais efeitos oncogénicos, instabilidade de armazenamento, o tamanho da sequência de DNA alvo é limitada e reduzida e requerer alterações que levam a que a sua preparação seja demorada e de alto custo. Além disso, os vetores virais não conseguem transferir siRNA e outros sistemas novos como CRISPR/Cas para o interior das células. Portanto, vários materiais não virais surgiram para colmatar as desvantagens dos vírus, apesar de não terem a mesma capacidade de evasão celular (Ibraheem *et al.*, 2014; Cheraghi *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

#### 1.8.2.2. Vetores não virais

Os sistemas não virais surgem para colmatar as desvantagens apresentadas pelos vetores virais. Em comparação com o primeiro tipo de vetores, os não virais apresentam maior segurança, alta viabilidade celular, menor imunogenicidade e facilidade de produção (Wang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Apesar dos vetores não virais apresentarem menor eficiência de transfeção celular em comparação com os virais, têm sido estudados e aplicados em terapias génicas devido à sua biocompatibilidade (Li *et al.*, 2015).

Os sistemas de entrega de DNA não virais podem ser classificados em dois grupos, os sistemas físicos e os sistemas químicos. Nos sistemas físicos o DNA é entregue à célula alvo por meio de forças físicas que enfraquecem a membrana para a tornar mais permeável e permitir que o DNA chegue ao núcleo. Este sistema é aplicado utilizando técnicas como a microinjeção, a eletroporação, os ultrassons e sistemas hidrodinâmicos. Apesar de serem técnicas de aplicação fácil e apresentarem eficiência, podem levar a lesões nos tecidos. Em relação aos sistemas químicos, o DNA é conduzido através da membrana até ao núcleo por transportadores que podem ser preparados por reações químicas e que vão encapsular o DNA. Os transportadores utilizados nos sistemas químicos podem ser compostos por materiais sintéticos ou naturais, em que se incluem os polímeros catiónicos (naturais ou sintéticos) como por exemplo a polietilenimina, lípidos catiónicos, lipossomas, proteínas sintéticas e dendrímeros (Ibraheem *et al.*, 2014; Cevher *et al.*, 2012; Ramamoorth *et al.*, 2015).

Os polímeros e lípidos ideais utilizados na construção de vetores não virais devem possuir cargas positivas na sua superfície para estabelecerem ligações eletrostáticas com os ácidos nucleicos, levando à sua encapsulação e formulação de sistemas com tamanhos à escala nanométrica. Esta encapsulação permite a proteção do material genético e facilita a sua entrada nas células. Os vetores formulados com polímeros são designados de poliplexos e os que utilizam lípidos são designados de lipoplexos (Pack *et al.*, 2005). Os lipoplexos são menos

utilizados que os poliplexos por apresentarem menor eficiência de encapsulação e menor estabilidade depois de formados. Os poliplexos, uma vez que apresentam uma grande diversidade química e capacidade de serem funcionalizados para melhorar as suas propriedades, têm ganho vantagem em relação aos lipoplexos (Rehman *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2014).

Os sistemas não virais devem permitir a entrega do material genético às células alvo, uma vez que as cargas negativas dos ácidos nucleicos são repulsas pelas cargas negativas da membrana celular. Esta limitação na internalização dos ácidos nucleicos pode ser contornada utilizando os sistemas físicos e químicos. Os sistemas físicos permitem introduzir diretamente ácidos nucleicos no interior das células através de microinjeção, por exemplo. No entanto os sistemas químicos são mais utilizados, uma vez que permitem encapsular o material genético em vetores com carga superficial positiva. Estes vetores possibilitam ultrapassar as barreiras celulares e entregar mais eficazmente o DNA em comparação com os sistemas físicos (Wang *et al.*, 2013).

Em suma, os vetores não virais são propostos como alternativas bastante promissoras aos vetores virais pois conseguem condensar a molécula de DNA, proteger da degradação por parte das nucleases e entregar o material genético nas células alvo (Ibraheem *et al.*, 2014). A terapia génica não viral evoluiu a tal ponto que existe uma variedade enorme de métodos para entregar o DNA, desde métodos convencionais como a injeção de DNA e eletroporação, até ao uso de nanopartículas e hidrogéis (Costa *et al.*, 2012).

## 1.9. Estratégias de co-entrega

O tratamento de diversos tipos de cancro utilizando a quimioterapia é muitas vezes dificultado pela rejeição e resistência aos fármacos por parte das células tumorais depois de várias administrações. Esta resistência é muitas vezes causada pela expressão de um gene mutado. Uma das soluções que foi encontrada passa pela utilização de RNAs de interferência que são específicos para os genes responsáveis pela resistência. O silenciamento deste tipo de genes permite que as células se tornem mais sensíveis aos fármacos utilizados (Lin Kang *et al.*, 2015).

Outros problemas associados à resistência a fármacos por parte de células cancerígenas são as bombas de efluxo que reduzem a concentração do fármaco no interior das células. A utilização de um siRNA dirigido ao gene MDR1 pode reduzir a formação de transportadores de efluxo na membrana celular, resultando num aumento da concentração celular do fármaco (Lin Kang *et al.*, 2015).

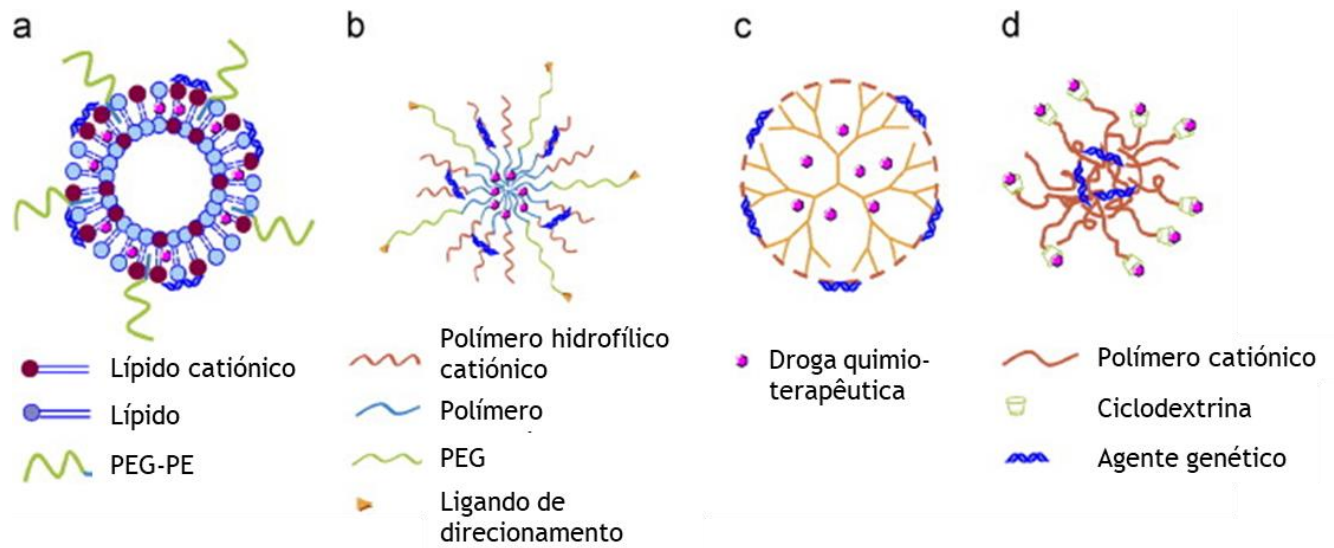
Por outro lado, a utilização de pDNA que codifique a proteína p53 permite induzir a apoptose das células cancerígenas. Tanto os RNAs de interferência como o DNA plasmídeo são conhecidos por serem agentes genéticos muito úteis para o tratamento do cancro e utilização em estratégias de co-entrega (Lin Kang *et al.*, 2015).

A terapia combinada surge assim como uma abordagem promissora para o tratamento do cancro. A combinação de fármacos pode ser utilizada com o intuito de explorar efeitos aditivos ou sinérgicos decorrentes da ação de várias drogas com o objetivo final de maximizar a eficácia terapêutica. Foi também demonstrado que uma combinação apropriada de drogas quimioterápicas e agentes genéticos pode melhorar o resultado terapêutico e a qualidade de vida do paciente, uma vez que o uso desta co-entrega permite reduzir a dose e concentração do fármaco utilizado, diminuir o desenvolvimento de resistência aos medicamentos e permite a ação terapêutica de dois agentes distintos (Lin Kang *et al.*, 2015).

Os transportadores utilizados para este tipo de entrega têm de ter capacidade de transportar em simultâneo ambos os fármacos quimioterápicos e/ou agentes genéticos para as células cancerígenas, libertando os agentes de maneira controlada e precisa. Desta forma, é possível maximizar o efeito combinado dos dois agentes para o tratamento de tumores resistentes a drogas. Existem diversos nanotransportadores, no entanto os mais tradicionais utilizados para a co-entrega de fármacos e material genético são lipossomas, micelas, dendrímeros e sistemas supramoleculares (tabela 2) (figura 4) (Lin Kang *et al.*, 2015).

**Tabela 2** - Nanotransportadores recentes de co-entrega de drogas quimioterapêuticas e agentes genéticos. Adaptado de (Lin Kang *et al.*, 2015).

Nanotransportador	Composição do nanotransportador	Fármaco	Agente genético	Linha celular	Referências
Lipossoma	Nanocápsulas lipídicas funcionalizadas com PEI	Paclitaxel	pDNA	HEK	Skandrani <i>et al.</i> , 2014
	Lipossomas PEGuilados	Docetaxel	siRNA BCL2	A549	Qu <i>et al.</i> , 2014
	Lipossomas catiónicos	Doxorrubicina	MRP1 e siRNA BCL2	MCF-7 e HCT15	Saad <i>et al.</i> , 2008
Micelas	Peptídeo quimérico anfifílico (Fmoc) <sub>2</sub> KH <sub>7</sub> -TAT	Doxorrubicina	Plasmídeo da p53	HeLa e 293T	Han <i>et al.</i> , 2013
	PEI-PCHLG	Docetaxel	pDNA	HEK293	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	PEG-pp-PEI-PE	Paclitaxel	"surviving" siRNA	A549	Zhu <i>et al.</i> , 2014
	PEOz-PLA-g-PEI	Doxorrubicina	mcDNA	MCF-7	Gaspar <i>et al.</i> , 2014
	Nanopartículas de invólucro nuclear catiónico	Paclitaxel	Plasmídeo IL-2 siRNA BCL2	MDA-MB-231 e 4T1	Wang <i>et al.</i> , 2006
Dendrímeros	PAMAM-PEG-T7	Doxorrubicina	pORF-hTRAIL	Bel-7402	Han <i>et al.</i> , 2011
	Dendrímeros de Poly(L-lisina) com um núcleo cúbico de silsesquioxano	Doxorrubicina	siRNA luciferase	U87	Kaneshiro <i>et al.</i> , 2009
	Núcleo de b-ciclodextrina e ramificações de poli (L-lisina)	Docetaxel	pMR3	HNE-1	Liu <i>et al.</i> , 2014
Sistemas supramoleculares	$\beta$ -CD e OEI-FA	Paclitaxel	p53	KB e A549	Zhao <i>et al.</i> , 2014
	PEI <sub>1,8k</sub> -PB <sub>2</sub> ,9- $\gamma$ -CD	Doxorrubicina	pDNA	239T e HeLa	Yang <i>et al.</i> , 2013
Nanoformulações "Novel"	Quitosano-enxerto-PEI	Candesartana	p53	PANC-1	Bao <i>et al.</i> , 2014
	PLGA	Doxorrubicina	siRNA MDR1	MCF-7	Misra <i>et al.</i> , 2014
	PEI-Fc	Doxorrubicina	DNA	HepG2	Sun <i>et al.</i> , 2013
	PEI-PEG	Doxorrubicina	DNA	HUVE, HepG2 e MCF-7	Liu <i>et al.</i> , 2013



**Figura 4** - Ilustração esquemática dos quatro tipos principais de nanotransportadores para a co-entrega de genes e fármacos quimioterapêuticos. (a) Lipossoma catiónico; (b) Micela; (c) Dendrímero; (d) Sistemas supramoleculares. Adaptado de (Lin Kang *et al.*, 2015)

As propriedades físico-químicas do material genético e dos fármacos são normalmente bastante díspares, o que vai influenciar na maneira como interagem com o nanotransportador. No caso dos fármacos, estes podem ser adicionados aos sistemas através de interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou conjugação química. Os agentes genéticos são normalmente encapsulados pelos vetores através de interações eletrostáticas (Lin Kang *et al.*, 2015).

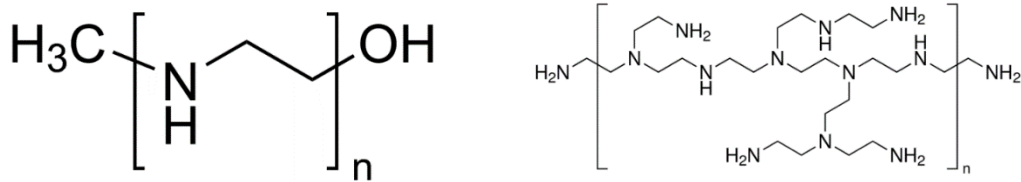
## 1.10. Polietilenimina

O desenvolvimento de veículos seguros e eficientes para a libertação controlada de genes tem sido objeto de estudo para aplicação em terapias génicas. Estes transportadores devem apresentar um tamanho adequado, incorporar grandes quantidades de DNA, proteger contra a degradação enzimática, contornar o sistema imunológico inato e garantir que a carga terapêutica seja libertada de forma sustentada. Além disso, estes vetores devem ser biocompatíveis, provocar efeitos colaterais mínimos (como inflamação) e ter boa biodistribuição (Costa *et al.*, 2015).

A utilização de polímeros catiónicos para a entrega de genes de interesse surgiu devido à facilidade de manipulação e modificação dos mesmos. Estes vetores não virais apresentam uma enorme variedade entre si, desde a composição e peso molecular até à sua estrutura que pode ser linear, ramificada ou dendrímica. Devido à sua carga positiva, ligam-se facilmente aos ácidos nucleicos por interações eletrostáticas, o que facilita a encapsulação do material genético e consequente formulação de poliplexos à escala nanométrica (Aied *et al.*, 2013).

O polímero de polietilenimina (PEI) está entre os sistemas de administração de genes não virais mais proeminentes, descritos até ao momento para a encapsulação de ácidos nucleicos e transfeção de uma ampla gama de tipos de células eucarióticas. Este polímero revela uma forte capacidade de encapsulação do DNA e possui características de tamponamento intrínsecas que lhe permite apresentar eficiência na internalização do material genético (Jin *et al.*, 2014).

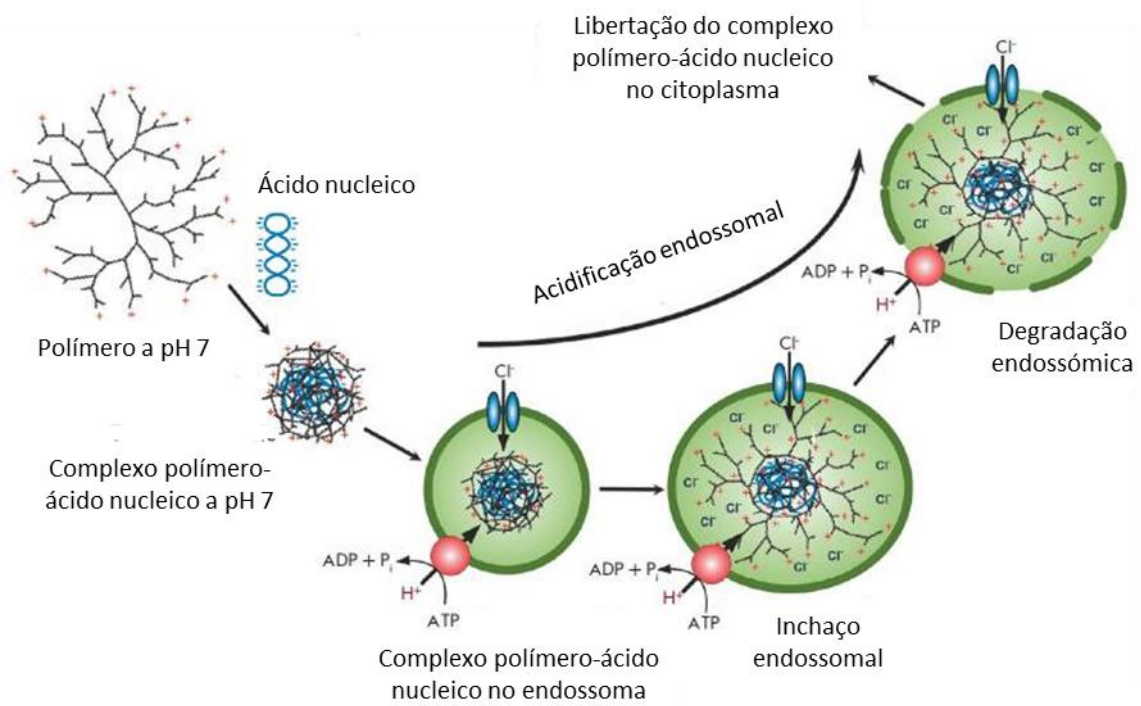
O polímero de PEI pode apresentar arquitetura ramificada ou linear (figura 5) e está disponível em diferentes pesos moleculares. É geralmente aceite que os polímeros PEIs de maior peso molecular (25 kDa que são o padrão recomendado) não são apenas agentes de transfeção mais eficientes do que os homólogos de menor peso molecular, mas também os mais citotóxicos (Hall *et al.*, 2015). A utilização de PEI de elevado peso molecular causa citotoxicidade aguda, devido à rutura da membrana da célula, seguindo-se a apoptose celular. A utilização de PEI de menor peso molecular poderia eliminar o problema da citotoxicidade, no entanto estudos demonstram que estes polímeros apresentam valores de eficiência de transfeção indesejáveis. Assim, é essencial encontrar o equilíbrio entre a capacidade de transfeção e a citotoxicidade e formular poliplexos que permitam a maior eficiência possível com o mínimo de toxicidade para as células (Nikitenko *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2014).



**Figura 5** - Representação das estruturas químicas da PEI linear de 10 kDa e da PEI ramificada de 25 kDa. Fonte: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyethylenimine\\_linear12345900298611?lang=pt&region=PT](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyethylenimine_linear12345900298611?lang=pt&region=PT) e <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyethyleniminebranched12345900298611?lang=pt&region=PT>. Acedido em: 07/09/2018.

O polímero de PEI surge como um dos materiais sintéticos mais utilizados devido à sua capacidade de transportar diferentes tipos de ácidos nucleicos, independentemente do seu tipo e tamanho. Apresenta ainda uma elevada capacidade de armazenamento e possui características que lhe permitem ultrapassar a membrana do endossoma/lisossoma. Este polímero catiónico tem uma capacidade inerente para neutralizar a carga negativa do pDNA, usufruindo da formação de interações eletrostáticas entre o grupo amina do polímero PEI e o grupo fosfato do DNA (Cheraghi *et al.*, 2017). Assim, este polímero associa-se fortemente ao DNA, levando à sua compactação e condensação. Como já foi referido, a força motriz para este fenómeno é a interação eletrostática que se estabelece entre os dois componentes, que é reforçada pelo aumento entrópico resultante da libertação dos respetivos contra-íões (Costa *et al.*, 2015).

Ao analisar o efeito do tempo de incubação na formação de nanopartículas PEI/DNA foi possível demonstrar que o polímero PEI se ligou instantaneamente ao DNA e neutralizou a sua carga. Esta eficiência de condensação e formação de nanopartículas torna-se muito útil para alcançar transfeções de alto rendimento. O polímero de PEI ramificado é conhecido como um agente de transfeção eficiente, devido a um fenómeno vulgarmente conhecido por “capacidade da esponja do protão” (figura 6). De fato, a protonação de grupos amino primários, secundários e terciários permite a lise do endossoma e a libertação do conteúdo no citoplasma. Sistemas de entrega baseados em partículas possuindo uma carga superficial positiva beneficiam a interação de nanopartículas com a membrana celular e o início dos fenómenos de endocitose (Cheraghi *et al.*, 2017; Nikitenko *et al.*, 2013).



**Figura 6** - Representação esquemática da hipótese da esponja de protões. Adaptado de (Nikitenko *et al.*, 2013).

De forma geral, os sistemas formulados com PEI exibem tamanhos na ordem dos 50/500 nanómetros, morfologia esférica e cargas superficiais positivas adequadas para aplicações de entrega de genes. No entanto vários estudos revelaram que os sistemas PEI/pDNA que são formulados com PEI de maior peso molecular apresentam melhores resultados em termos de encapsulação do plasmídeo, carga à superfície, capacidade de transfeção e maior liberação do plasmídeo *in vitro* (Costa *et al.*, 2018; Mady *et al.*, 2011). Parâmetros tais como a razão molar dos grupos azoto de PEI para os grupos fosfato do DNA (rácios N/P) e a estrutura do polímero também têm implicações na eficiência da formulação destes vetores. A formulação de sistemas baseados em elevados rácios N/P e aplicação de PEI ramificado apresentam melhores resultados na literatura quando em comparação com o uso de rácios N/P baixos e PEI linear (Costa *et al.*, 2018).

## 1.11. Metotrexato

Os vetores sintéticos utilizados na terapia génica para o tratamento do cancro apresentam limitações ao nível da entrega direcionada, resultando numa transferência inespecífica e menos eficiente nos tecidos alvo (Costa *et al.*, 2015). Deste modo estão descritas diversas transformações dos sistemas terapêuticos utilizando ligandos como fármacos, péptidos e anticorpos. Assim a utilização de ligandos que, para além de conferirem seletividade e direcionamento aos sistemas formulados, apresentem propriedades quimioterapêuticas são considerados mais valias para o desenvolvimento de novos tratamentos (Dohmen *et al.*, 2012).

A molécula metotrexato (MTX) é um dos ligandos que pode ser utilizado para formular e funcionalizar sistemas de co-entrega. O MTX é um agente terapêutico antifolato que é um dos medicamentos mais utilizados no tratamento de diversos tipos de cancro como o do colo do útero, da mama, ovários, bexiga, osteossarcomas, linfomas e leucemias (Kohler *et al.*, 2006). O MTX é igualmente usado em transplantes de órgãos e doenças autoimunes (artrite reumatóide e psoríase) como agente imunossupressor (Dervieux *et al.*, 2004; Rubino, 2001). Devido às suas propriedades terapêuticas, o MTX tem sido usado em tratamentos de quimioterapia antineoplásica (Infarmed, 2017).

A utilização do MTX na quimioterapia tem um resultado limitado devido à sua meia-vida curta na corrente sanguínea e difusão rápida pelo corpo. Apresenta efeitos adversos relacionados com a toxicidade da droga e a resistência das células alvo a este fármaco (Kohler *et al.*, 2006). Assim, precisam de ser administradas grandes quantidades desta droga no caso de quimioterapia convencional. Esta necessidade ocorre porque na internalização celular, a maioria (quase 75%) do MTX livre é extraído das células cancerígenas (na forma mono, di ou triglutamato) devido a bombas de efluxo com ATP na membrana celular, como ABC B1 (pgP), ABC C (MRP (1-4)), BCRP (ABC G2), etc., que expulsam os xenobióticos para neutralizar a acumulação de fármacos nas células (Dumoga *et al.*, 2017).

A conjugação e encapsulação do MTX em sistemas de entrega direcionada permite colmatar as limitações acima referidas, a falta de seletividade desta droga quando a sua utilização é isolada de outros agentes terapêuticos, reduz significativamente a sua toxicidade sistêmica e proporciona um melhor resultado terapêutico (Kohler, 2006; Khatri, 2014). A encapsulação do fármaco em transportadores que possuem direcionamento para as células alvo permite que a sua absorção diminua em células normais e que aumente nas células tumorais com a ajuda de recetores associados à membrana (via RME). Estes recetores são altamente regulados em células cancerígenas, evitando assim o mecanismo de transporte celular e permitindo uma libertação elevada e concentrada da droga dentro do citoplasma (Dumoga *et al.*, 2017).

O MTX é um agente antineoplásico que atua por inibição competitiva da di-hidrofolato reductase, enzima que reduz o ciclo dihidrofólico a tetrahidrofólico no processo de síntese do DNA e replicação celular. Assim, inibe a conversão de dihidrofolato em tetrahidrofolato que é responsável pela síntese de nucleótidos de purina e timidilato, que posteriormente servem como substratos para a síntese de DNA necessária para a proliferação celular (Khatri *et al.*, 2014). Este fármaco é um agente terapêutico antifolato, ou seja, um análogo do ácido fólico, apresentando apenas uma substituição no carbono C2 de um grupo hidroxilo por um grupo amina e uma metilação no N10 (figura 7) (Infarmed, 2017; Rubino, 2001). Devido a esta semelhança estrutural e ao facto de os recetores do ácido fólico estarem presentes em maior número nas células tumorais do que nas células normais, o MTX tem grande afinidade por estes recetores e funciona como ligando às células tumorais (Wong *et al.*, 2015). Diversos estudos demonstraram que o MTX conjugado em nanossistemas de entrega permite ligações específicas a células tumorais e que as nanopartículas são internalizadas nas células através do processo de endocitose mediado pelo recetor do ácido fólico (Kohler *et al.*, 2006).

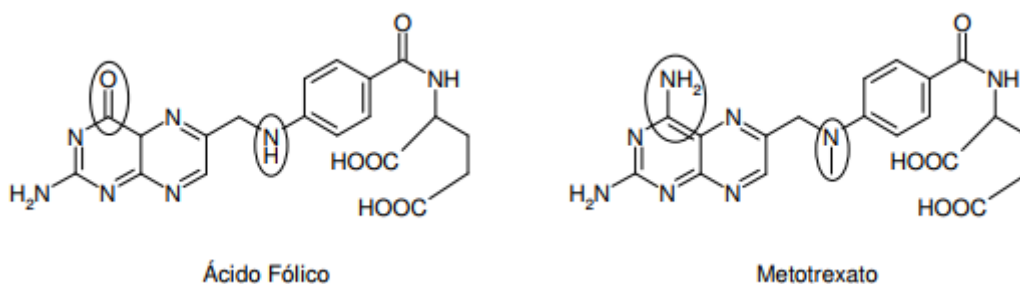


Figura 7 - Representação da estrutura do ácido fólico e metotrexato. Adaptado de (Rubino, 2001).

As células cancerígenas apresentam uma proliferação celular muito maior do que as células normais, facilitando a atuação do MTX que é mais sensível em tecidos com elevada atividade proliferativa. O MTX presente nos sistemas é libertado nas células alvo através da ação de enzimas intracelulares, resultando na apoptose das células cancerígenas do colo do útero (Kohler *et al.*, 2006). Esta droga tem a capacidade de impedir o crescimento descontrolado inibindo o ciclo celular na fase S sem causar danos irreversíveis às células normais (Infarmed, 2017; Khatri *et al.*, 2014). Além do seu efeito terapêutico, a utilização do MTX na formulação dos nanossistemas também permite o direcionamento destes na terapia do cancro.

## 2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi preparar um sistema para a entrega conjunta de um pDNA que codifica para um supressor de tumor e de uma droga anticancerígena de forma direcionada às células tumorais do cancro do colo do útero com o intuito de induzir a apoptose destas células. Para atingir este fim, foi fundamental formular um sistema de entrega eficiente, possuindo um conjunto de propriedades (morfologia, tamanho, capacidade de encapsulação e carga superficial) adequadas a protocolos de terapia génica.

Assim sendo, este trabalho consistiu na utilização do polímero polietilenimina (PEI) para encapsular o DNA plasmídico que codifica o gene da p53 e o fármaco metotrexato (MTX). As propriedades das nanopartículas foram estudadas utilizando diferentes proporções de azoto polimérico dos grupos fosfato presentes no plasmídeo (rácios N/P) e diferentes concentrações da droga. A utilização da droga MTX nos complexos deveu-se ao seu potencial terapêutico, mas também ao direcionamento às células cancerígenas que esta molécula permite conferir. Estudos de transfeção *in vitro* foram realizados em células HeLa para testar a captação e internalização celular bem como a sua eficiência de transfeção. Por último, foi avaliado o efeito dos agentes terapêuticos individualmente e em simultâneo para averiguar o potencial efeito sinérgico do sistema desenvolvido.

## 3. Materiais e métodos

### 3.1. Materiais

Os materiais necessários para a realização deste trabalho foram: o DNA plasmídico “6.07-kb pcDNA3-FLAG-p53 Addgene 144 plasmid 10838” que foi obtido na Addgene (Cambridge, MA, 146 USA), a triptona e o extrato de levedura foram adquiridos à empresa Bioakar Diagnostics, o meio LB foi obtido da Panreac, o kit *NZY Maxi Prep Kit* e o reagente Greensafe (Greensafe Premium) foram adquiridos na NZYTech, Lda. Genes and Enzymes, (Lisboa, Portugal), a polietilenimina (PEI) ramificada (25 kDa), a droga metotrexato hidratado, o marcador de plasmídeo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) e o corante resazurina “*Resazurin sodium salt*” foram adquiridos à empresa Sigma Aldrich (St. Louis, M.O., EUA). As soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água desionizada ultrapura, recorrendo à purificação com o sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, MA, EUA).

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Condições de crescimento bacteriano

A bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada como hospedeira para a amplificação do plasmídeo pcDNA3-FLAG-p53. Esta amplificação iniciou-se com a inoculação da estirpe *E. coli* DH5 $\alpha$  em placas de LB-agar com ampicilina (100  $\mu$ g/mL) a 37°C, deixando crescer *overnight*. Efetuado o crescimento em meio sólido, as colónias são inoculadas em Erlenmeyers de 1 litro, contendo 250 mL de meio *Terrific Broth* (20 g/L Triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0.017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.072 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) suplementado com ampicilina a 100  $\mu$ g/mL. O crescimento foi realizado a 37°C num agitador orbital Agitorb 200 da Aralab (Albarraque, Portugal) a 250 rpm. O crescimento bacteriano foi interrompido no final da fase log, depois de se atingir uma DO<sub>600</sub>=7. As bactérias foram recolhidas por centrifugação e armazenadas a -20°C.

### 3.2.2. Lise alcalina

Depois da produção e amplificação intracelular do pDNA na bactéria *E. coli DH5a*, foi realizada a lise alcalina para extrair a molécula de interesse. A pré-purificação do plasmídeo foi realizada com o *kit NZYTech*, utilizando-se o protocolo fornecido pelo fabricante. Brevemente, após a lise das células, foram ajustadas as condições de sal e pH para promover a ligação do plasmídeo à coluna de bancada de troca aniônica. Após a ligação do plasmídeo são eluídas impurezas como RNA, proteínas e outros contaminantes de baixo peso molecular, através de uma lavagem com uma solução de concentração média de sal. Por último, o pDNA foi eluído utilizando uma solução com maior teor de sal e foi precipitado (concentrado) através da adição de isopropanol. Deste modo foi possível pré-purificar o plasmídeo, maioritariamente na sua forma superenrolada, para posteriormente ser utilizado na formulação dos nanosistemas.

### 3.2.3. Eletroforese em gel de agarose

O conteúdo de ácidos nucleicos presente na amostra pré-purificada de pDNA e nos sobrenadantes da formulação dos sistemas foi avaliado através da técnica de eletroforese horizontal, utilizando um gel de agarose de 0,8% (Hoefer, Holliston, MA, USA) corado com 0,6 µL de GreenSafe. A eletroforese foi realizada a 120 Volts durante 30 minutos em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH=8). O gel foi analisado recorrendo à luz ultravioleta (UV) (312 nm), com utilização do sistema Uvitec Cambridge Fire-Reader UV (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK).

### 3.2.4. Síntese de nanopartículas

A formulação das nanopartículas baseadas em PEI/pDNA consistiu na adição de 100 µL de solução de PEI a 400 µL de solução de pDNA com uma concentração final de 20 µg/mL, determinada pela absorvância a 260 nm (Pereira et al., 2012). Tanto o pDNA como o polímero PEI foram dissolvidos em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5). A adição da solução de polímero PEI foi realizada gota a gota, com agitação constante no vortex, durante 1 minuto (40 segundos gota a gota + 20 segundos de vortex). Depois de adicionado o PEI ao pDNA, deixou-se equilibrar durante 15 minutos à temperatura ambiente. Todas as formulações dos complexos foram realizadas em triplicados. Seguidamente, os sistemas são centrifugados a 10000 G, durante 20 minutos, à temperatura ambiente e o sobrenadante é recolhido para posterior análise da eficiência de encapsulação e eletroforese em gel de agarose. Todos os rácios N/P foram calculados tendo em conta a concentração molar de cargas positivas

provenientes dos grupos amina do polímero (N) e a concentração molar das cargas negativas que advêm dos grupos fosfato presentes no plasmídeo (P).

No caso dos sistemas PEI/pDNA/MTX, 200 µL de MTX nas diferentes concentrações estudadas (2, 4 e 6 µg/mL) foram adicionados a 200 µL de pDNA com uma concentração final de 20 µg/mL. Posteriormente, são adicionados os 100 µL do polímero de forma a formar os complexos, seguindo o procedimento descrito anteriormente para os sistemas PEI/pDNA.

### 3.2.5. Presença do MTX nos sistemas PEI/pDNA/MTX

A avaliação da presença do MTX foi determinada por espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR). Os sistemas depois de formulados e congelados foram liofilizados para eliminar ruídos nos espectros. A análise espectroscópica foi realizada utilizando o espectrofotómetro Nicolet iS10 FTIR (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), operado no modo ATR (Smart iTR diamond ATR). Os espectros foram adquiridos em 120 *scans* com uma largura espectral entre os 4000 e os 525 cm<sup>-1</sup> e uma resolução espectral de 32 cm<sup>-1</sup>.

### 3.2.6. Taxas de encapsulação

As eficiências de encapsulação do pDNA e da droga MTX foram calculadas para os diversos sistemas formulados. Para tal, foi realizada a medição da quantidade de pDNA e de MTX que estavam no sobrenadante obtido após centrifugação dos sistemas formados com o PEI e comparada com a quantidade inicial usada para formular os sistemas. Esta quantificação foi realizada através do *Ultrospec 3000 UV-Visible Spectrophotometer* (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) a 260 nm para o pDNA e a 303 nm para o MTX. As medições foram realizadas em triplicados. As taxas de encapsulação foram determinadas utilizando as seguintes fórmulas:

$$\%TE(pDNA) = \frac{\text{Total de pDNA adicionado} - \text{pDNA livre no sobrenadante}}{\text{Total de pDNA adicionado}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%TE(MTX) = \frac{\text{Total de MTX adicionado} - \text{MTX livre no sobrenadante}}{\text{Total de MTX adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

### 3.2.7. Morfologia das nanopartículas

A morfologia dos sistemas formulados foi avaliada depois da sua preparação seguido da sua precipitação por centrifugação e remoção do sobrenadante. As nanopartículas foram depois lavadas com 500  $\mu\text{L}$  de água Milli Q e centrifugadas a 13000 rpm, durante 12 minutos. Este processo foi repetido 8 vezes. Posteriormente, o pellet de nanopartículas foi ressuspensionado em 40  $\mu\text{L}$  de tungsténio 2% e foi realizada uma diluição da amostra de 1:20 em água Milli Q. Desta solução diluída, foram retirados 10  $\mu\text{L}$  e colocados numa lamela redonda e deixou-se secar “overnight” à temperatura ambiente. Quando a amostra ficou seca, esta foi revestida com ouro usando o aparelho Emitech K550 sputter coater (London, England) e a morfologia das nanopartículas foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) (Hitachi S-2700, Tokyo, Japan).

### 3.2.8. Tamanho e potencial zeta ( $\zeta$ ) das nanopartículas

Os tamanhos e potenciais zeta das nanopartículas foram adquiridos utilizando o aparelho Zetasizer Nano Zs, a 25°C. Para tal, os sistemas formulados foram centrifugados e o sobrenadante resultante descartado. As nanopartículas foram depois ressuspensionadas em 600  $\mu\text{L}$  de água Milli Q. Para a determinação do tamanho dos complexos foi realizada a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) com o laser He-Ne a 633nm com *non-invasive backscatter optics* (NIBS). Para avaliarmos a carga superficial das nanopartículas ( $\zeta$ ) foi usado o modo de espalhamento eletroforético de luz utilizando um laser denominado de M3-PALS (Phase analysis Light Scattering). O software Malvern Zetasizer foi utilizado para obtenção e tratamento dos dados. Os valores médios dos tamanhos e potenciais à superfície foram obtidos através de 3 medições e os desvios padrão apresentados como  $\pm\text{DP}$

### 3.2.9. Cultura celular

As células utilizadas neste trabalho foram as células HeLa, células cancerígenas provenientes do colo do útero e os fibroblastos. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose* (DMEM-HG) (Sigma) e suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 0,5 g/L de bicarbonato de sódio, 1,10 g/L HEPES, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina e 100 unidades/mL de penicilina (Sigma). As células foram mantidas numa incubadora que mimetiza as condições do corpo humano, temperatura a 37°C e uma atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 3.2.10. Citotoxicidade dos sistemas

A citotoxicidade dos sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX foi avaliada através do ensaio com a resazurina, um corante azul que é redutível a resorufina, indicando a ocorrência de uma oxirredução. Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços. Foram realizados quintuplicados para cada sistema. No dia seguinte mudou-se o meio para meio simples para facilitar a transfeção, pelo menos 12h antes de transfetar. As células foram transfetadas adicionando 0,14  $\mu\text{g}$  de pDNA, encapsulado nos vários sistemas testados, a cada poço. A transfeção foi terminada após 6 horas trocando o meio simples em que ocorreu a transfeção para meio completo. Ao fim de 48 horas de incubação, retirou-se o meio e adicionaram-se 120  $\mu\text{L}$  de resazurina 0,1% a cada poço. Ao fim de 4 horas de incubação com a resazurina, 40  $\mu\text{L}$  de cada poço foram adicionados numa placa de leitura. A absorvância de cada poço foi lida a 530 e 590 nm, utilizando o espectrofotómetro *XMark microplate*. A viabilidade celular de cada poço foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorvância 530nm} - \text{Abs. 590nm}}{\text{Abs. do controlo 530nm} - \text{Abs. do controlo 590nm}} \times 100 \quad (3)$$

### 3.2.11. Capacidade de transfeção dos sistemas

A avaliação da capacidade de transfeção dos diversos complexos em estudo foi realizada por técnicas de microscopia de fluorescência confocal por meio de imunocitoquímica e *live cell imaging*. Para tal, efetuaram-se os seguintes procedimentos:

#### 3.2.11.1. Marcação do plasmídeo com FITC

A marcação do plasmídeo com FITC ocorreu por adição de 8  $\mu\text{L}$  de pDNA, 75  $\mu\text{L}$  de *labeling buffer* e 2  $\mu\text{L}$  de FITC ( $V_f = 85 \mu\text{L}$ ). As amostras foram colocadas em constante agitação durante 4 horas à temperatura ambiente e protegidas da luz. Adicionou-se 1 volume de 3 M NaCl (85  $\mu\text{L}$ ) e 2,5 volumes de etanol 100% (212,5  $\mu\text{L}$ ). As amostras com o pDNA marcado foram incubadas a  $-20^\circ\text{C}$  overnight. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a  $4^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos a 12 000 G, descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com etanol 75 %. Este procedimento foi repetido várias vezes até o pellet perder a coloração laranja.

### 3.2.11.2. Transfecção/aquisição de imagem

#### 3.2.11.2.1. Preparação das lâminas e marcação dos núcleos (Imunocitoquímica)

A preparação das lâminas para observação no microscópio confocal começou com a lavagem dos poços, 3 vezes, com PBS até cobrir as lamelas. De seguida, adicionou-se 1 mL de paraformaldeído (PFA) e deixou-se atuar durante 10 minutos (com o objetivo de fixar/manter a estrutura celular). O PFA foi lavado 3 vezes com PBS e para corar os núcleos adicionou-se 60 µL de DAPI (diluição de 1:1000) em cima da lamela e deixou-se atuar durante 10 minutos. De seguida, retirou-se o DAPI e lavou-se 3 vezes com PBS. As lamelas foram fixadas nas lâminas utilizando Entellan e posteriormente seladas com verniz.

#### 3.2.11.2.2. Imunocitoquímica

Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células por poço em placas de 12 poços, contendo lamelas que foram revestidas com poli-L lisina. No dia seguinte, mudou-se o meio para meio simples para facilitar a transfecção, pelo menos 12 h antes deste processo. As células foram transfetadas adicionando 8 µg de pDNA, encapsulado nos sistemas testados, a cada poço. A transfecção foi terminada com diferentes *end points* (2, 4 e 6 horas). Através do microscópio confocal de varredura a laser LSM710 (Carl Zeiss, Alemanha) e do programa ZEN 2010 foi possível analisar as diferenças de transfecção dos vários rácios testados para os tempos em análise. Os núcleos das células foram marcados com DAPI e o pDNA com FITC. Todas as imagens foram obtidas utilizando ao mesmo tempo os lasers correspondentes ao DAPI e ao FITC.

#### 3.2.11.2.3. *Live Cell Imaging*

Inicialmente, foram plaqueadas pequenas quantidades (1 µL, 2 µL ou 3 µL) de células em ressuspensão com uma concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL de meio por poço em placas “µ-Slide 8 Well”. No dia seguinte mudou-se o meio para meio simples pelo menos 12 h antes da transfecção. As células foram transfetadas adicionando 2,2 µg de pDNA, encapsulado nos sistemas testados, a cada poço depois de adquiridas as imagens só com a marcação do núcleo corado com DAPI (controlo). A internalização celular foi acompanhada ao longo de duas horas.

Através do microscópio confocal de varredura a laser LSM710 (Carl Zeiss, Alemanha), sob uma ampliação de 63x e do programa ZEN 2010, foi possível acompanhar a entrada do pDNA no núcleo utilizando a opção Z-Stacks. Esta opção permitiu visualizar por camadas as células e o respetivo núcleo. Para cada sistema avaliado foi inicialmente adquirida uma imagem das células antes de serem transfetadas, estando apenas marcado o núcleo com o marcador DAPI. Após a transfeção foram adquiridas imagens para os diferentes rácios N/P até duas horas depois de adicionar as nanopartículas às células. O laser LSM 710 da Zeiss (Carl Zeiss SMT, Inc., Oberkochen, Alemanha) permitiu analisar a transfeção. Todas as imagens foram obtidas utilizando ao mesmo tempo os lasers correspondentes ao DAPI e ao FITC e as células mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.11.3. Quantificação da fluorescência

As imagens obtidas através da microscopia de confocal foram tratadas de igual forma utilizando o programa Fiji em que foi realizado um procedimento de seleção de canais e regiões de interesse de modo a analisar e quantificar apenas a fluorescência presente nos núcleos das células. Neste sentido, e de acordo com as opções disponíveis no programa mencionado, várias funções foram selecionadas (duplicate; rename; select channel and change LUT; make a MIP; make a composite; split channels; gaussian blur clean noise; threshold; convert to mask; watershed; filter for size and roundness; analyse particles to detect nuclei). As células em divisão e as que de alguma forma ficaram cortadas nas imagens não foram contabilizadas. A percentagem da intensidade de fluorescência relativa foi calculada em relação ao controlo dos respetivos sistemas utilizando a seguinte equação:

$$\frac{\text{Intensidade final} - \text{Intensidade do controlo } (t_0)}{\text{Intensidade do controlo } (t_0)} \times 100 \quad (4)$$

### 3.2.12. Transcrição do gene codificado no plasmídeo

Após verificação da chegada dos sistemas de PEI contendo o pDNA aos núcleos das células HeLa, foi avaliada a transcrição do gene da p53 codificado no plasmídeo através da técnica de reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para tal, foram plaqueadas  $2.4 \times 10^5$  células por poço em placas de 12 poços. No dia seguinte mudou-se o meio para meio simples para facilitar a transfeção, pelo menos 12h antes de transfetar. As células foram transfetadas adicionando 8 µg de pDNA, encapsulado nos sistemas testados, a cada poço. A avaliação dos transcritos foi realizada após 12 e 24 horas.

### 3.2.12.1. Extração de RNA

Para realizar a extração de RNA lavaram-se os poços 3 vezes com PBS, adicionaram-se 250 µL de trisol para lisar as células e colocou-se a amostra num eppendorf. Após 5 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 50 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente. Depois de incubar 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 4°C durante 15 minutos a 12000 RCF. Retirou-se a fase aquosa, adicionou-se 125 µL de isopropanol gelado para precipitar o RNA e colocou-se no gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se a 4°C durante 15 minutos a 12000 RCF. Descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 125 µL de etanol 75 % em água DEPC para retirar os compostos orgânicos. Centrifugou-se a 4°C durante 5 minutos a 12000 RCF, o sobrenadante foi rejeitado e deixou-se secar. Reidratou-se com 20 µL de água DEPC e as amostras foram quantificadas no nanodrop. As amostras foram corridas num gel de eletroforese (1%) para despistar possíveis contaminações.

### 3.2.12.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi efetuada utilizando o “Xpert cDNA Synthesis Kit” da grisp. Num tubo RNase-free adicionou-se 1 µL de dNTP's, 1 µL de *Random primer*, 1 µg de *Template RNA* e *RNase free water* até perfazer o volume total de 14,5 µL. Incubou-se a 65°C durante 5 minutos e posteriormente amostra foi colocada no gelo durante 2 minutos. Depois adicionou-se à mistura 4 µL de buffer, 0,5 µL de RNase inhibitor e 1 µL de Xpert RTase. Homogeneizou-se suavemente e no fim realizou-se um mini-spin. Utilizando o termociclador, incubou-se a amostra a 25°C durante 10 minutos, depois durante 50 minutos a 50°C e no fim para inativar a enzima, 85°C durante 5 minutos. As amostras foram usadas como template para o PCR ou armazenadas a -20°C.

### 3.2.12.3. RT-PCR

A cada reação de PCR adicionou-se 3,95 µL de *RNase free water*, 0,40 µL de *primer reverse* (5- CCT CAT TCA GCT CTC GGA AC -3) e *primer forward* (5- CCT CAC CAT CAT CAC ACT GG -3) para detetar o transcrito da p53, 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 6,25 µL de Taq DNA polimerase e 1 µL de cDNA. As amostras foram homogeneizadas e de seguida realizou-se um mini-spin. As amostras foram colocadas no termociclador que é programado da seguinte forma: 95°C durante 5 minutos, ciclos de 25 ou 30 vezes (95°C durante 40 segundos, 60°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto), no final do último ciclo 72°C durante 5 minutos e por último deixou-se arrefecer até chegar aos 12°C. Os produtos de PCR foram depois injetados num gel de agarose de 1% e analisados por eletroforese.

### 3.2.13. Proliferação celular

O efeito terapêutico dos diversos sistemas foi avaliado indiretamente através da análise da proliferação celular. As células HeLa foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço. No dia seguinte, mudou-se o meio para meio simples para facilitar a transfeção, pelo menos 12h antes de transfetar. As células foram transfetadas adicionando 0,84  $\mu\text{g}$  de pDNA, encapsulado nos vários sistemas testados, a cada poço. A contagem das células aderentes e viáveis foi realizada utilizando o ensaio de exclusão por azul de tripano. Este ensaio baseia-se no facto das células mortas absorverem o azul de tripano, corando o citoplasma por perda de seletividade da membrana, enquanto que as células vivas permanecem intactas, ou seja, o número relativo de células mortas e vivas é feito através da contagem das células coradas (mortas) e as incolores (vivas) com uma câmara de *Neubauer* (Strober, 2015). As células não transfetadas foram usadas como controlo e avaliou-se ainda o efeito da droga anticancerígena MTX diluída no meio, sem ser encapsulada. Os ensaios foram realizados durante 5 dias, em triplicados e as células de cada poço foram contadas duas vezes. A análise estatística dos resultados obtidos foi feita através do cálculo da média do número de células viáveis em cada dia para os diferentes ensaios e os dados apresentados num gráfico de linhas.

## 4. Resultados/Discussão

### 4.1. Formulação e caracterização dos sistemas

A primeira fase deste trabalho consistiu na formulação de dois grandes grupos de sistemas de entrega, os sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX. Os sistemas PEI/pDNA foram formulados por adição direta do polímero, gota a gota, à solução de pDNA de concentração e volume fixo (de acordo com as condições especificadas na secção experimental). A forte interação electrostática entre os dois compostos induz a compactação do pDNA em agregados, à escala nanométrica, de elevada estabilidade (Costa *et al.*, 2015). Estes poliplexos foram preparados tendo em conta os rácios N/P de 1; 1,5; 2; 5 e 10. No caso dos sistemas PEI/pDNA/MTX, as nanopartículas foram produzidas considerando os rácios N/P = 1; 1,5; 2; e 5, devido aos resultados obtidos nos sistemas anteriores. O fármaco MTX neste último sistema foi usado com concentrações de 2, 4 e 6 µg/mL. As nanopartículas desenvolvidas foram caracterizadas em termos da taxa de encapsulação do pDNA, presença do MTX, morfologia, tamanho e carga de superfície. Para complementar esta informação, a citotoxicidade dos complexos foi também avaliada.

#### 4.1.1. Encapsulação dos agentes terapêuticos

##### 4.1.1.1. Eficiência de encapsulação do pDNA

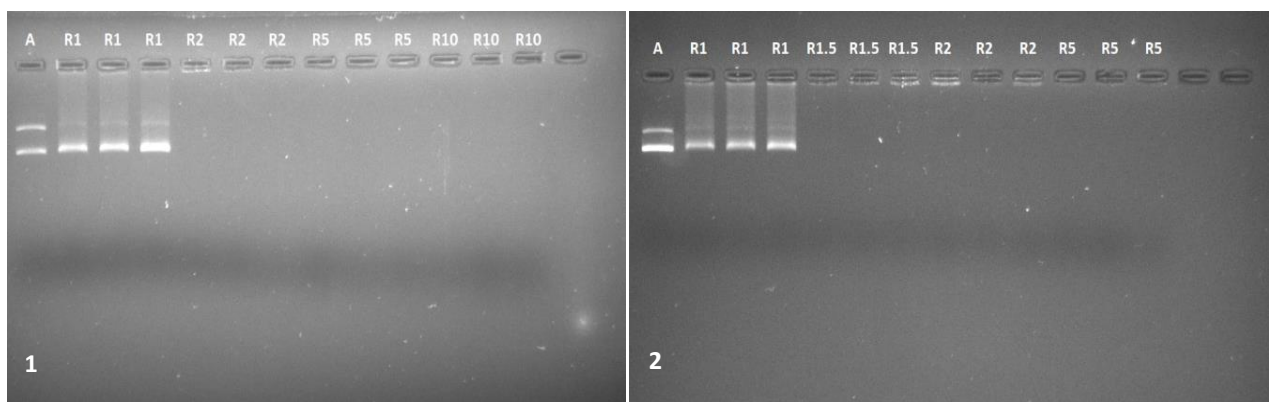
A encapsulação do pDNA foi avaliada tendo em conta a equação 1, apresentada na secção experimental. A medição do pDNA não incorporado, presente nos sobrenadantes resultantes da centrifugação dos sistemas, foi feita através da leitura das absorvâncias a 260 nm recorrendo ao espectrofotómetro UV. Os resultados podem ser consultados nas tabelas 3 e 4, para os vários sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX, respetivamente. Os resultados da eficiência de encapsulação foram complementados através de eletroforese em gel de agarose (Figura 8).

**Tabela 3** - Percentagens de encapsulação do pDNA para os rácios N/P= 1; 1,5; 2; 5 e 10 dos sistemas PEI/pDNA.

Rácio N/P	% Eficiência de encapsulação do pDNA
1	16,72 ± 0,51
1,5	95,87 ± 0,58
2	94,45 ± 0,23
5	87,94 ± 0,61
10	86,84 ± 2,63

**Tabela 4** - Percentagens de encapsulação do pDNA para os rácios N/P= 1; 1,5; 2 e 5 dos sistemas PEI/pDNA/MTX utilizando três concentrações de fármaco (2, 4 e 6 µg/mL).

Rácio N/P   [MTX]	% Eficiência de encapsulação do pDNA
1 2	9,05 ± 1,55
1 4	8,78 ± 1,23
1 6	8,13 ± 0,81
1,5 2	87,61 ± 1,05
1,5 4	84,07 ± 0,43
1,5 6	80,09 ± 0,31
2 2	83,04 ± 0,84
2 4	78,60 ± 0,49
2 6	71,60 ± 0,72
5 2	79,65 ± 0,55
5 4	77,43 ± 0,74
5 6	71,24 ± 0,68



**Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose da amostra de pDNA inicial (A) e do sobrenadante dos sistemas formulados a vários rácios. (R1 - Rácio N/P = 1; R1.5 - Rácio N/P = 1,5; R2 - Rácio N/P = 2; R5 - Rácio N/P = 5; R10 - Rácio N/P = 10) para os sistemas sem (1) e com (2) MTX.

Os resultados apresentados na tabela 3 revelam que o polímero de PEI a partir do rácio 1,5 é capaz de encapsular eficazmente o pDNA. Políplexos preparados a rácio N/P de 1 não são eficientes na encapsulação do pDNA, mostrando taxas de eficiência de encapsulação inferiores a 20%. O aumento do rácio na formulação dos sistemas PEI/pDNA aumenta a compactação do pDNA e conduz a valores superiores de taxa de encapsulação. Para rácios superiores, observa-se uma ligeira diminuição da encapsulação do plasmídeo por parte do polímero. No entanto podemos afirmar que a encapsulação do pDNA neste sistema é quase total, atingindo taxas de encapsulação na ordem dos 94 e 96 %, para os rácios 2 e 1,5 respetivamente. Estes resultados são corroborados pelas imagens de eletroforese apresentadas na figura 8, e que mostram a existência de pDNA livre apenas nos sistemas PEI/pDNA a rácio 1. A não existência de bandas correspondentes ao pDNA para os vetores formulados nos restantes rácios considerados, revela a incorporação deste biofármaco nos complexos poliméricos. A capacidade de compactar o pDNA por parte do polímero PEI de 25kDa evidenciada nas percentagens de encapsulação alcançadas, está de acordo com o que se encontra descrito na literatura para sistemas semelhantes. Em estudos anteriores, encontra-se descrito que o uso de PEI de maiores pesos moleculares leva a uma maior condensação de pDNA em comparação com polímeros de menor peso molecular (2 e 5 kDa) (Mady *et al.*, 2011). O facto do polímero usado apresentar estrutura ramificada em vez de linear contribuiu igualmente para obter taxas de encapsulação do plasmídeo perto dos 90%. Outros estudos demonstraram ainda que o uso de PEI ramificado permite uma maior compactação em comparação com PEI linear de pesos moleculares semelhantes (Costa *et al.*, 2018).

No caso dos sistemas PEI/pDNA/MTX (tabela 4), verifica-se a mesma tendência que nos sistemas PEI/pDNA: o aumento do rácio leva a uma ligeira diminuição da percentagem de encapsulação do pDNA. Em comparação, os sistemas PEI/pDNA/MTX apresentam taxas de encapsulação do pDNA mais baixas do que os sistemas PEI/pDNA para os mesmos rácios N/P. A diminuição da encapsulação do pDNA nos sistemas em que é encapsulado juntamente com outro agente é um resultado já verificado noutros estudos, podendo ser consequência da competitividade entre o pDNA e o fármaco pelos locais de ligação (Mahor *et al.*, 2011).

#### 4.1.1.2. Eficiência de encapsulação da droga MTX

A eficiência de encapsulação do fármaco anticancerígeno MTX foi calculada tendo em conta a equação 2, apresentada na secção experimental. A medição do MTX não encapsulado nas nanopartículas foi realizada através da leitura das absorvâncias a 303 nm (Jingou *et al.*, 2011) dos sobrenadantes, recorrendo uma vez mais ao espectrofotómetro UV, tendo sido posteriormente calculadas as respetivas taxas de encapsulação (tabela 5).

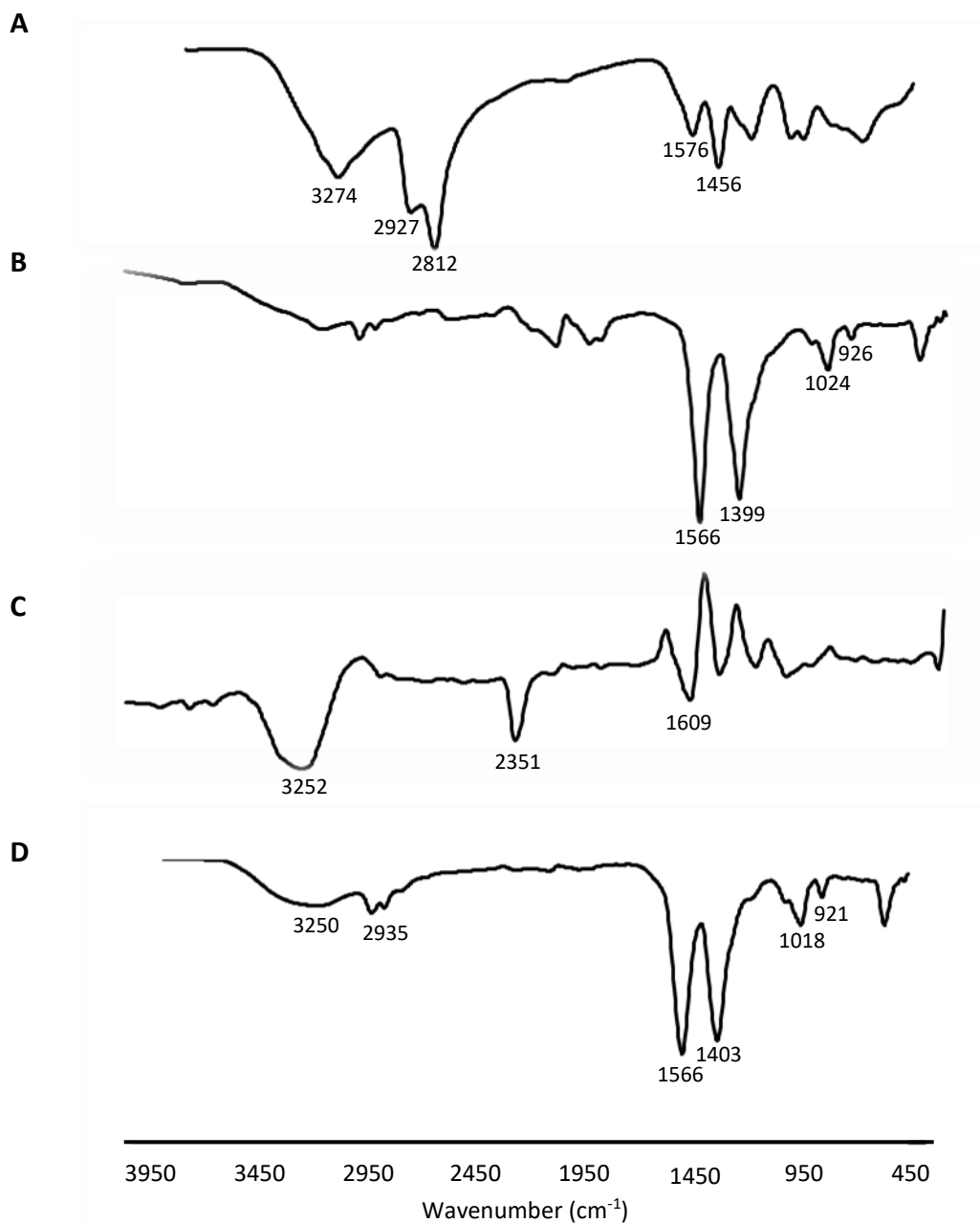
Tabela 5 - Percentagens da eficiência de encapsulação do MTX para os rácios N/P= 1,5; 2 e 5 dos sistemas PEI/pDNA/MTX utilizando três concentrações de fármaco (2, 4 e 6 µg/mL).

Rácio N/P   [MTX]	% Eficiência de encapsulação do MTX
1,5 2	23,00 ± 0,11
1,5 4	27,70 ± 0,52
1,5 6	31,00 ± 0,33
2 2	41,64 ± 0,27
2 4	42,30 ± 0,84
2 6	44,60 ± 0,93
5 2	40,90 ± 0,31
5 4	45,46 ± 1,19
5 6	53,33 ± 1,93

Os sistemas PEI/pDNA/MTX apresentam taxas de encapsulação de MTX que variam entre os 23 e os 53%, existindo um aumento da eficiência de encapsulação com o aumento do rácio N/P e da concentração de MTX que é utilizada. Este resultado pode ser explicado devido ao aumento da quantidade de amins que estão disponíveis para estabelecerem interações quando adicionamos uma maior quantidade de PEI. A adição de concentrações mais elevadas de MTX neste tipo de sistemas leva a que a diferença entre a quantidade do pDNA e do MTX seja menor, havendo uma maior ligação do MTX ao polímero. Curiosamente, esse aumento de encapsulação do MTX para o rácio N/P | [MTX] (53%) observado na tabela 5 é compensado pela diminuição da encapsulação do pDNA para o mesmo sistema (71%) observado na tabela 4. Este aumento das taxas de encapsulação do MTX é suportado por estudos anteriores em sistemas semelhantes que envolvem igualmente grupos amina presentes em determinados polímeros para formar ligações com os dois grupos carboxilo do MTX (Choi *et al.*, 2013).

#### 4.1.2. Detecção do fármaco MTX nos sistemas

A presença da droga anticancerígena metotrexato foi avaliada através de espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR). Para confirmar a presença/incorporação do fármaco foram adquiridos os espectros dos compostos isolados que compõem a formulação dos sistemas estudados e procedeu-se à comparação dos picos característicos com os picos evidenciados no espectro das nanopartículas formuladas (Figura 9).



**Figura 9** - Espectro de FTIR (*Transmittance* (%) vs *Wavenumber* (cm<sup>-1</sup>)) da polietilenimina (A), pDNA (B), metotrexato (C) e do sistema PEI/pDNA/MTX de rácio N/P= 5 e concentração de MTX de 6 µg/mL (D).

O espectro A da figura 9, correspondente ao polímero PEI, mostra bandas a 3274 e 1576  $\text{cm}^{-1}$ , que são características de movimentos de “stretching” e vibrações dos grupos N-H e  $-\text{NH}_2$ , respetivamente. As bandas que se visualizam a 2812  $\text{cm}^{-1}$  e 1456  $\text{cm}^{-1}$  são devidas a “stretching” do grupo C-H e vibrações, respetivamente. A zona da banda a 2927  $\text{cm}^{-1}$  é característica da polietilenimina, tendo sido já indicada na literatura (Bayramoglu *et al.*, 2008).

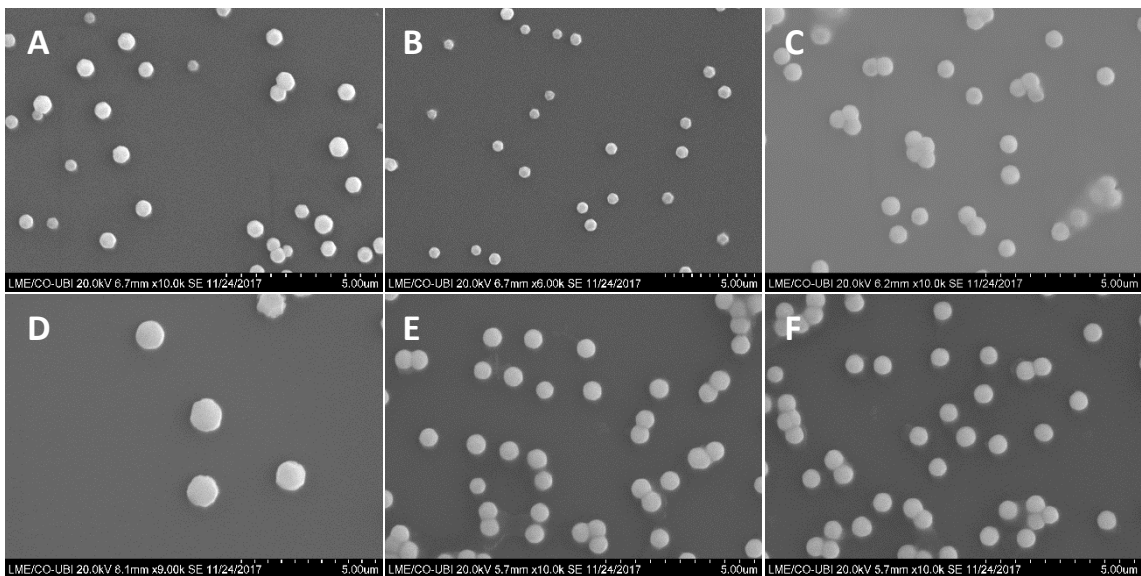
A região de 2000 a 450  $\text{cm}^{-1}$ , do espectro de pDNA (espectro B da figura 9), contem informação relevante acerca do arranjo conformacional desta molécula. Este espectro mostra picos na região 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem às bases nitrogenadas do plasmídeo. A banda visualizada a 1024  $\text{cm}^{-1}$  é tipicamente atribuída à vibração de ribose (açúcar C-C) e a absorção a 926  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença do pDNA (Mady *et al.*, 2011).

O espectro C da figura 9 apresenta os picos característicos da droga MTX neste tipo de análise. As bandas a 3252  $\text{cm}^{-1}$  e 1609  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a picos de absorção correspondente ao MTX muito semelhantes a valores já identificados em outros estudos (Kohler *et al.*, 2006; Rasouli *et al.*, 2013)

O espectro D da figura 9, que corresponde ao espectro das nanopartículas liofilizadas, permite detetar que os sistemas PEI/pDNA/MTX não só possuem na sua constituição a droga MTX como também a presença do pDNA. A presença do MTX comprova-se pela observação do pico característico deste fármaco de absorção a 3250  $\text{cm}^{-1}$  e 1403  $\text{cm}^{-1}$  no espectro das nanopartículas formuladas (Kohler *et al.*, 2006; Rasouli *et al.*, 2013). No caso do pDNA, a sua presença é comprovada pelos picos de absorção a aproximadamente 1018  $\text{cm}^{-1}$  que é tipicamente atribuída à vibração de ribose (açúcar C-C) e à absorção a 921  $\text{cm}^{-1}$  que indica a existência de DNA íntegro nos poliplexos formados (Mady *et al.*, 2011). O polímero de PEI também apresenta no espectro do sistema PEI/pDNA/MTX o seu pico de absorção mais importante a, aproximadamente, 1566  $\text{cm}^{-1}$ , representando as ligações N-H que ocorrem da encapsulação com os dois agentes terapêuticos. O pico que se observa a aproximadamente 2935  $\text{cm}^{-1}$  já foi identificado noutros estudos como sendo um pico correspondente a este polímero (Bayramoglu *et al.*, 2008).

#### 4.1.3. Morfologia das nanopartículas

A morfologia dos diversos sistemas foi analisada através da microscopia eletrónica de varrimento (SEM). As imagens representadas na figura 3 foram selecionadas a partir das formulações preparadas a vários rácios N/P = 1,5; 2 e 5, na ausência e presença de MTX com concentração de 6 µg/mL.



**Figura 10** - Imagens SEM das nanopartículas formuladas. A - PEI rácio N/P = 1,5; B - PEI rácio N/P = 1,5 e MTX 6 µg/mL; C - PEI rácio N/P = 2; D - PEI rácio N/P = 2 e MTX 6 µg/mL; E - PEI rácio N/P = 5; F - PEI rácio N/P = 5 e MTX 6 µg/mL.

Ao analisar a figura 10, podemos constatar que a interação de PEI com pDNA resulta na formação de políplexos à escala nanométrica com morfologia definida. As nanopartículas formadas apresentam uma forma aproximadamente esférica ou oval com tamanhos, de forma geral, inferiores a 400 nm. A presença da droga nos sistemas formados parece não influenciar a sua morfologia. A morfologia/forma exibida pelas nanopartículas indica que podem ser consideradas viáveis para uso num processo de internalização celular. Estudos anteriores revelaram que a forma esférica de nano-transportadores de bioativos favorece a sua captação celular e internalização (Arnida *et al.*, 2009). No entanto, não só a morfologia dos sistemas de entrega pode influenciar a eficiência destes processos celulares, mas também as suas propriedades físico-químicas (Chen *et al.*, 2018).

#### 4.1.4. Tamanho dos complexos

Os tamanhos dos poliplexos em estudo foram avaliados através do Zetasizer Nano Zs, depois de confirmada a sua formulação por microscopia eletrónica de varrimento. Os resultados correspondentes aos tamanhos dos sistemas foram apresentados nas tabelas 6, 7 e 8.

**Tabela 6** - Tamanho das nanopartículas de PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX (2, 4 e 6 µg/ml) formuladas a rácio N/P = 1,5.

Rácio N/P   [MTX]	1,5	1,5 2	1,5 4	1,5 6
Tamanho (nm)	374 ± 9,3	372 ± 0,9	369 ± 11,3	366 ± 6,1

**Tabela 7** - Tamanho das nanopartículas de PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX (2, 4 e 6 µg/ml) formuladas a rácio N/P = 2.

Rácio N/P   [MTX]	2	2 2	2 4	2 6
Tamanho (nm)	267 ± 7,2	263 ± 10,3	262 ± 8,5	258 ± 12,3

**Tabela 8** - Tamanho das nanopartículas de PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX (2, 4 e 6 µg/ml) formuladas a rácio N/P = 5.

Rácio N/P   [MTX]	5	5 2	5 4	5 6
Tamanho (nm)	158 ± 10,6	156 ± 8,4	153 ± 3,9	151 ± 7,1

A análise dos resultados evidenciados nas tabelas 6, 7 e 8 revela que o tamanho das nanopartículas para os sistemas PEI/pDNA diminui à medida que aumenta o rácio N/P. Isto é, as dimensões destes sistemas passam de 374 nm para 158 nm quando se aumenta o rácio N/P de 1,5 para 5. A mesma tendência mantém-se quando dentro do mesmo rácio N/P se incrementa a quantidade do fármaco MTX usada para formular os sistemas PEI/pDNA/MTX. Exemplificando com o rácio N/P = 5, à medida que se utiliza MTX na formulação dos poliplexos, ocorre uma ligeira diminuição dos tamanhos, passando de 158 nm sem adição de MTX para 151 nm com adição de 6 µg/mL da droga à formulação dos sistemas.

A redução das dimensões dos complexos à medida que os sistemas são formulados com maiores rácios N/P é um resultado que vai de encontro ao que já foi descrito na literatura, uma vez que isso leva a que haja uma maior quantidade de amins primárias disponíveis para condensar o pDNA e o MTX, resultando numa maior densidade de cargas e consequente formulação de complexos mais pequenos (Costa *et al.*, 2018).

A avaliação dos tamanhos dos sistemas de entrega utilizados na terapia génica foi sempre muito importante, uma vez que partículas mais pequenas podem favorecer e melhorar a eficiência da transfeção e internalização celular, particularmente *in vivo* (Mady *et al.*, 2011). Polímeros catiónicos como PEI podem ser combinados com o pDNA para formar complexos adequados a este tipo de terapias em termos de dimensões. A utilização do polímero PEI de 25 kDa, escolhido para este trabalho, tinha já demonstrado em testes anteriores, ser melhor opção na formulação de complexos mais pequenos do que PEI de menor peso molecular (Mady *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2018).

#### 4.1.5. Potenciais de superfície

No desenvolvimento de um sistema de entrega adequado para terapia génica, a informação da carga superficial é relevante pois esta pode condicionar a atração do sistema pela membrana da célula e o desempenho intracelular de tal sistema (Wang *et al.*, 2013). Neste sentido, o potencial zeta dos vários sistemas PEI/pDNA foi determinado e os resultados estão presentes na tabela 7.

**Tabela 9** - Potenciais Zeta dos sistemas PEI/pDNA para os diversos rácios.

Rácio N/P	Potenciais (mV)
1	- 9,09 ± 1,88
1,5	21,90 ± 1,47
2	25,07 ± 1,68
5	32,20 ± 0,53
10	35,97 ± 0,49

Os potenciais zeta dos complexos PEI/pDNA revelaram uma grande diferença para os diversos rácios N/P testados. Pela análise dos valores descritos na tabela 9, é possível constatar que ocorreu um incremento da carga à superfície dos sistemas quando se aumentou o rácio N/P utilizado na formulação das nanopartículas. O rácio N/P = 1 apresenta valores negativos (-9,09 mV) enquanto que os vetores de maior rácio testado (rácio N/P = 10) possuem valores de potencial zeta positivos, aproximadamente +36 mV.

Este aumento dos potenciais de superfície resulta do incremento da densidade de cargas positivas proveniente do polímero de PEI utilizado. Quanto maior a diferença da quantidade de aminas primárias provenientes do polímero em relação à quantidade de grupos fosfato provenientes do plasmídeo, maior será a carga positiva à superfície dos sistemas. Resultados semelhantes foram descritos na literatura, onde se verifica que os pesos moleculares e a estrutura do polímero têm influência no potencial zeta das nanopartículas (Mady *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2018). Analisando resultados de estudos anteriores, os complexos formulados usando PEI de 2, 5 e 25 kDa revelaram cargas médias à superfície de  $12.4 \pm 1.4$  mV,  $17.6 \pm 3.1$  mV e  $27.9 \pm 0.6$  mV, respetivamente (Mady *et al.*, 2011). Os resultados demonstrados no estudo de Mady e co-autores para PEI de 25kDa são muito idênticos aos resultados alcançados neste trabalho e apresentados na tabela 9.

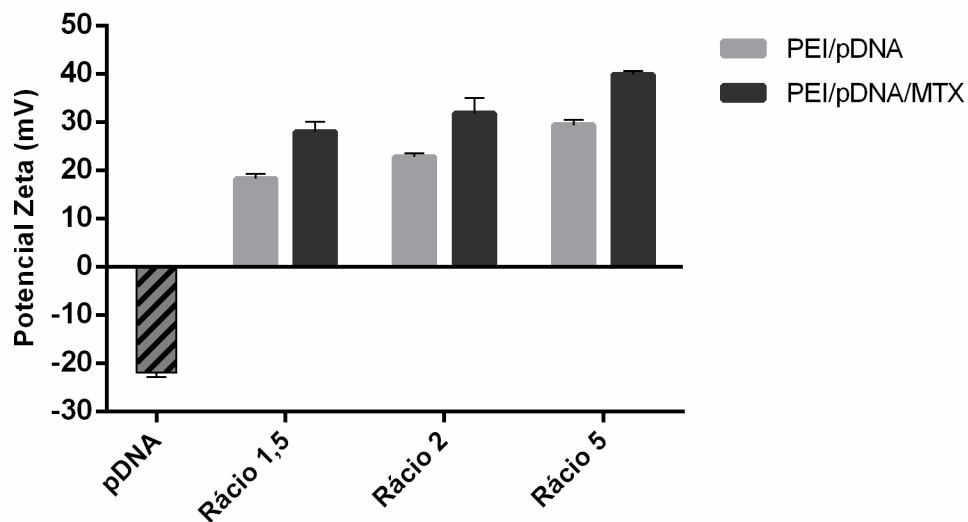
De maneira a avaliar a carga à superfície dos sistemas PEI/pDNA/MTX e verificar a influência do fármaco nesta propriedade, foram medidos os potenciais zeta das nanopartículas preparadas com os diversos rácios N/P em estudo e com diferentes concentrações de MTX. Os resultados estão sumariados na tabela 10.

**Tabela 10** - Potenciais Zeta dos sistemas PEI/pDNA/MTX para os diversos rácios.

Rácio N/P   [MTX]	Potenciais (mV)
1,5 2	25,60 ± 0,73
1,5 4	26,33 ± 2,09
1,5 6	27,83 ± 2,49
2 2	30,47 ± 1,18
2 4	31,77 ± 2,29
2 6	32,20 ± 1,80
5 2	35,30 ± 1,00
5 4	35,90 ± 0,40
5 6	39,80 ± 0,53
10 2	39,93 ± 0,49
10 4	41,60 ± 0,67
10 6	42,03 ± 0,49

A presença da droga anticancerígena MTX na encapsulação dos sistemas induziu um aumento do potencial zeta em relação aos sistemas PEI/pDNA. Verifica-se que a presença e o aumento da concentração da solução de MTX levou a um incremento da carga superficial positiva dos complexos. Por exemplo, a utilização do MTX na formulação dos sistemas faz com que a carga positiva à superfície de vetores de rácio N/P = 2 e MTX com concentração 6 µg/mL seja muito semelhante à carga dos vetores de rácio N/P = 5 sem MTX. O incremento do potencial zeta em sistemas de entrega devido à utilização do MTX foi já referenciado em publicações anteriores. Este aumento do potencial zeta nos sistemas formulados com MTX pode explicar-se com o facto de a pH baixo o MTX apresentar uma carga ligeiramente positiva (Rasouli *et al.*, 2013) e também pela capacidade do MTX receber/aceitar ligações de hidrogénio (Zhang *et al.*, 2017).

De forma a visualizar melhor as diferenças de potencial à superfície dos sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX e analisar a influência da presença da droga MTX nos vetores, foi feita uma representação gráfica dos resultados apresentados nas tabelas 9 e 10. O gráfico dos potenciais zeta pode ser analisado na figura 11.



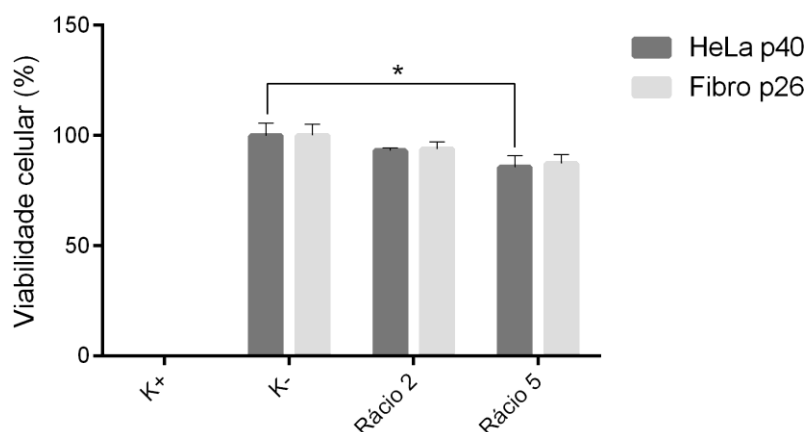
**Figura 11** - Potencial zeta vs. rácio N/P dos sistemas formulados. Os sistemas PEI/pDNA/MTX foram formulados utilizando uma concentração de MTX de 6 µg/mL. A análise estatística foi elaborada recorrendo ao teste de “two-way ANOVA” de dados com n = 3.

A análise gráfica representada na figura 11 sobre os dados das tabelas 9 e 10 permite afirmar que ocorre a encapsulação do pDNA por parte do polímero catiónico em todos os sistemas formulados uma vez que a carga final à superfície dos diversos sistemas é positiva em contraste com a carga negativa correspondente à amostra de pDNA. A representação gráfica da figura 11 permite ter uma melhor percepção da influência do aumento do rácio N/P assim como da concentração de MTX no incremento dos potenciais zeta dos sistemas.

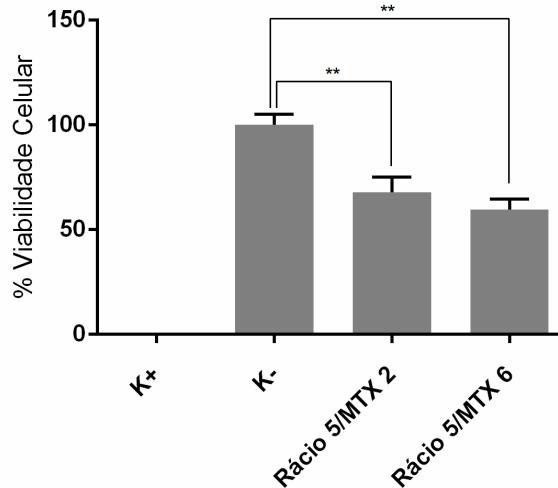
A entrada de vetores não virais no interior das células é dificultada, entre outros aspetos, pela barreira oferecida pela membrana celular. Para ultrapassar este obstáculo, diversas estratégias podem ser consideradas de modo a promover a internalização deste tipo de vetores. Devido à sua bicamada lipídica, a membrana celular apresenta carga negativa, sendo uma estratégia a utilização de vetores com carga positiva à superfície para que possa existir atração entre cargas opostas e, deste modo, a captação e internalização nas células ser facilitada (Wang *et al.*, 2013).

#### 4.1.6. Citotoxicidade

A biocompatibilidade de vetores é um aspeto fundamental no desenvolvimento de novos sistemas para uso em protocolos de terapia génica. Deste modo, o perfil citotóxico das nanopartículas formuladas foi avaliado em células HeLa e fibroblastos, através do ensaio da resazurina. Este ensaio consiste na conversão da resazurina azul não fluorescente em resorufina fluorescente rosa que ocorre em células metabolicamente ativas saudáveis (Mallory *et al.*, 2016). A incubação dos vários sistemas formulados nas células HeLa e nos fibroblastos foi feita durante 48 horas e a percentagem da viabilidade celular de cada sistema foi calculada através do ensaio da resazurina (figura 12 e 13).



**Figura 12** - Percentagens da viabilidade celular das células HeLa e dos fibroblastos após 48 h de transfeção com os sistemas PEI/pDNA de rácio N/P = 2 e 5. A análise estatística foi elaborada recorrendo ao teste de “two-way ANOVA” de dados com n = 4. A significância estatística foi calculada em relação ao controlo negativo (k-) e tem um valor p = 0,0223.



**Figura 13** - Percentagens da viabilidade celular das células HeLa após 48 h de transfeção com os sistemas PEI/pDNA/MTX de rácio N/P = 5 e concentrações de MTX 2 e 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A análise estatística foi elaborada recorrendo ao teste de “one-way ANOVA” de dados com  $n = 5$ . A significância estatística representada pelos asteriscos “\*\*\*” foi calculada em relação ao controlo negativo (k-) e tem um valor  $p = 0,0015$  e  $0,0011$  para os sistemas de MTX 2 e 6 respetivamente.

A representação gráfica das percentagens de viabilidade celular para os rácios N/P = 2 e 5 da figura 12 permite constatar que com o aumento do rácio N/P existe um ligeiro efeito citotóxico tanto para as células HeLa como para os fibroblastos. Este efeito citotóxico pode dever-se não só à toxicidade do rácio N/P = 5 ser maior que a do rácio N/P = 2 mas também devido à maior carga superficial evidenciada pelos sistemas de rácio 5, havendo maior internalização das nanopartículas nas células.

No entanto o efeito citotóxico foi maior nas células HeLa do que nos fibroblastos, efeito este demonstrado pela significância estatística entre os valores da viabilidade celular dos rácios N/P = 2 e 5 e o controlo das células HeLa. A maior incidência da toxicidade nas células tumorais em comparação com os fibroblastos pode indicar que os sistemas PEI/pDNA estão a internalizar em maior número nas células HeLa devido ao seu crescimento descontrolado, induzindo a expressão do gene de interesse. Contudo, as percentagens da viabilidade celular demonstram que os sistemas PEI/pDNA de rácios N/P = 2 e 5 não são citotóxicos para as células HeLa, uma vez que a viabilidade celular ronda os 91% e 84% respetivamente.

O polímero de PEI de 25 kDa usado neste trabalho não é apenas mais eficiente em termos de transfeção, mas também mais citotóxico do que os homólogos de menor peso molecular. Devido ao seu elevado peso molecular, este polímero apresenta uma grande densidade de amins primárias protonadas. Isto permite a lise do endossoma e confere uma elevada capacidade de transfeção ao PEI de 25kDa (Cheraghi *et al.*, 2017; Hall *et al.*, 2015). No entanto este elevado peso molecular pode apresentar citotoxicidade celular.

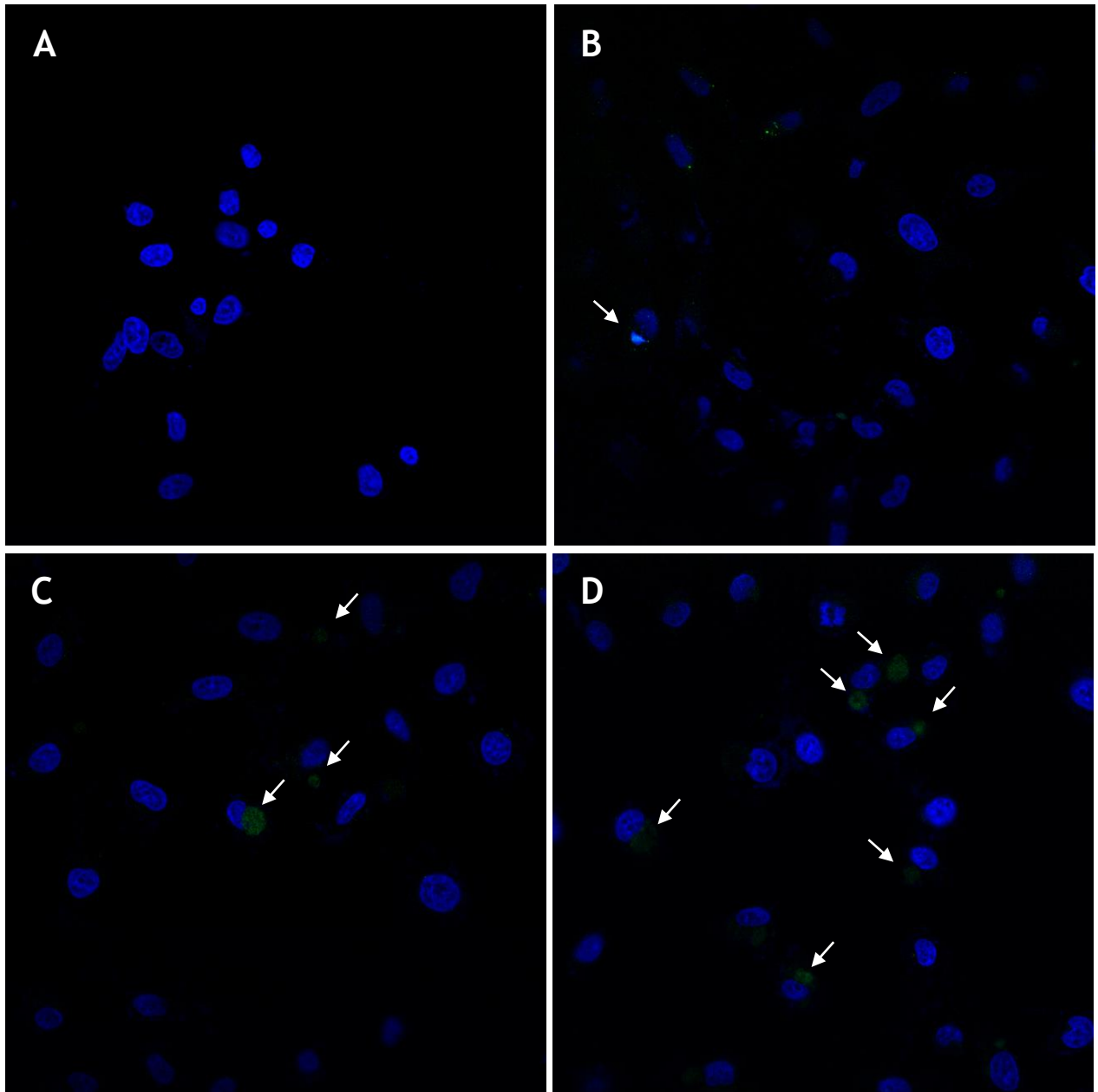
A possível citotoxicidade deste polímero deve-se ao grau de ramificação e peso molecular que apresenta, contudo, o peso molecular em geral, leva a pequenas variações na viabilidade celular. Está relatado na literatura que a relação N/P utilizada na formulação dos sistemas é que tem um grande impacto e pode modificar profundamente o perfil citotóxico dos complexos (Costa *et al.*, 2018). Estas propriedades evidenciadas vão de encontro aos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que a utilização de rácios N/P baixos revelaram sistemas que não apresentam citotoxicidade relevante e que este parâmetro aumenta quando existe um incremento da relação N/P.

Os sistemas PEI/pDNA/MTX representados na figura 13 revelam um maior efeito citotóxico do que os sistemas PEI/pDNA. Esta diminuição da viabilidade celular poderá estar relacionada com a presença do fármaco MTX. A primeira razão deve-se ao facto do MTX ser uma droga anticancerígena já utilizada para o tratamento de diversos tipos de cancro, pelo que será de esperar que quanto maior a concentração da droga, maior seja o seu efeito terapêutico (Kohler *et al.*, 2006; Infarmed, 2017). A segunda razão resulta da semelhança do MTX com o ácido fólico e consequentemente este se ligar aos recetores do ácido fólico, facilitando a internalização do polímero com os agentes terapêuticos encapsulados (Rubino, 2001). Deste modo, os sistemas PEI/pDNA/MTX apresentam uma diminuição da viabilidade celular em relação aos sistemas sem MTX e o sistema com 6 µg/mL de MTX apresenta menor viabilidade celular do que o sistema com 2 µg/mL de MTX.

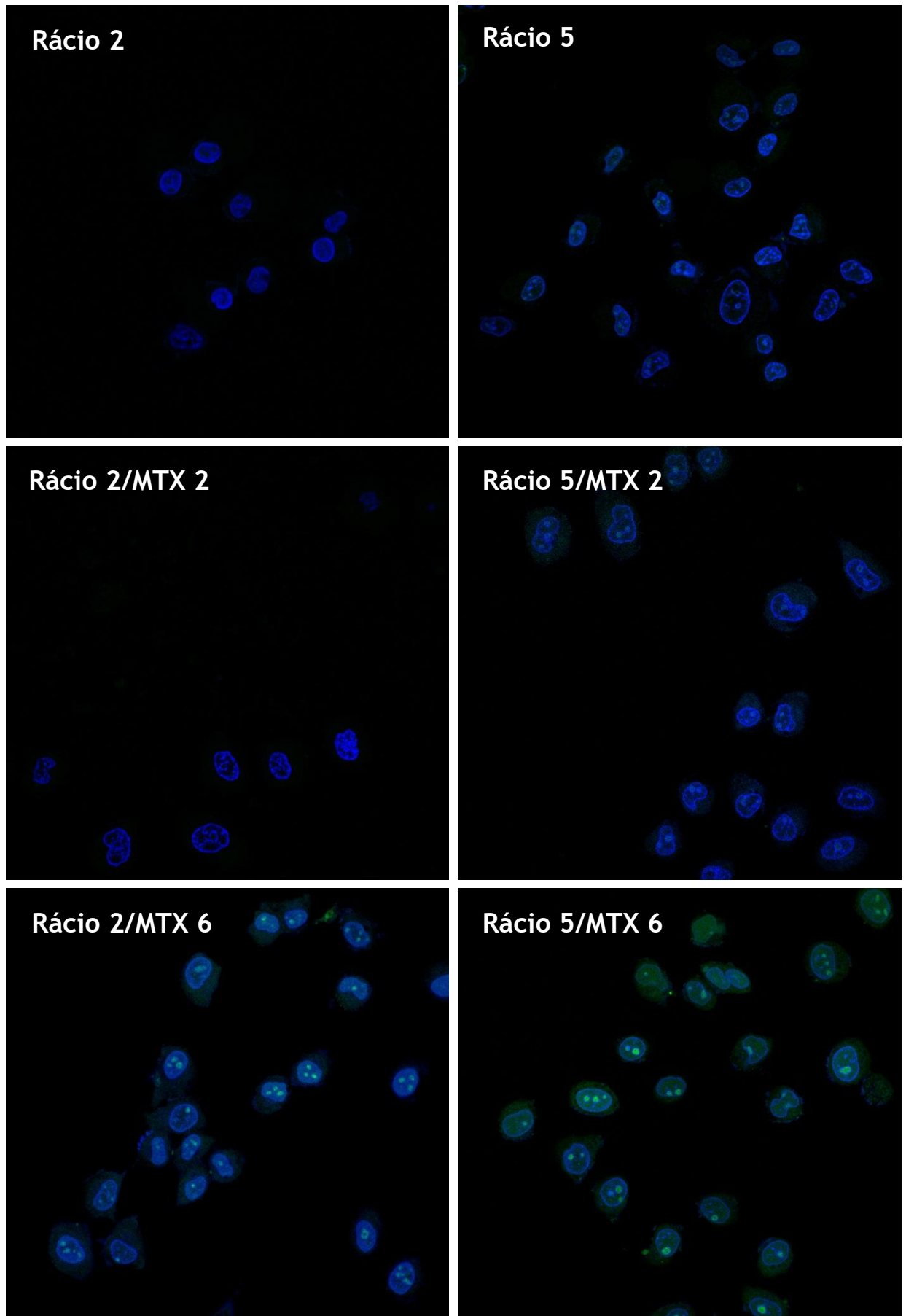
## 4.2. Eficiência de transfeção

O polímero PEI de 25 kDa foi escolhido para este trabalho devido à sua carga positiva, o que permite encapsular os agentes terapêuticos como já foi demonstrado. Para além disto, este polímero possui formular sistemas com capacidade de transfeção elevada, já identificada em estudos anteriores (Hall *et al.*, 2015; Mady *et al.*, 2011).

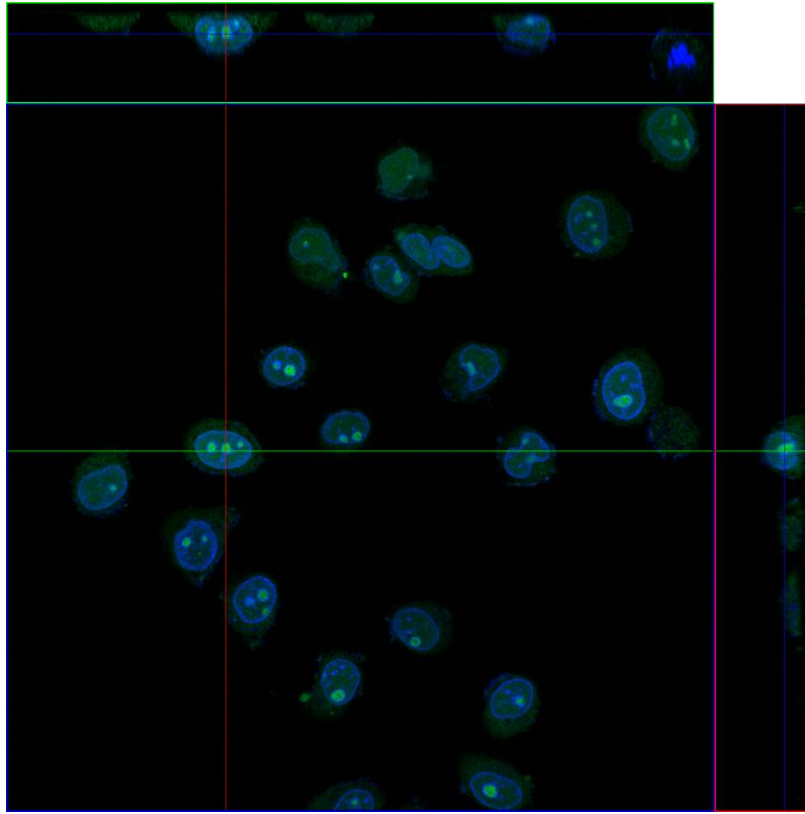
Assim, para avaliar a capacidade de penetração dos complexos formulados nas células HeLa, foram realizados ensaios de imunocitoquímica e de *live cell imaging*. Os ensaios de imunocitoquímica serviram inicialmente para verificar se existia captação e internalização celular dos sistemas PEI/pDNA e posteriormente foram realizados ensaios de *live cell imaging*, para acompanhar a entrada nas células e no núcleo dos vários sistemas formulados. Ambos os ensaios foram realizados utilizando a microscopia confocal de fluorescência, e os resultados estão apresentados nas figuras 14, 15, 16 e 17. Como complemento, e para aprofundar o estudo de transfeção *in vitro*, a intensidade de fluorescência do pDNA nas imagens da figura 15 foi calculada e a análise gráfica encontra-se na figura 18.



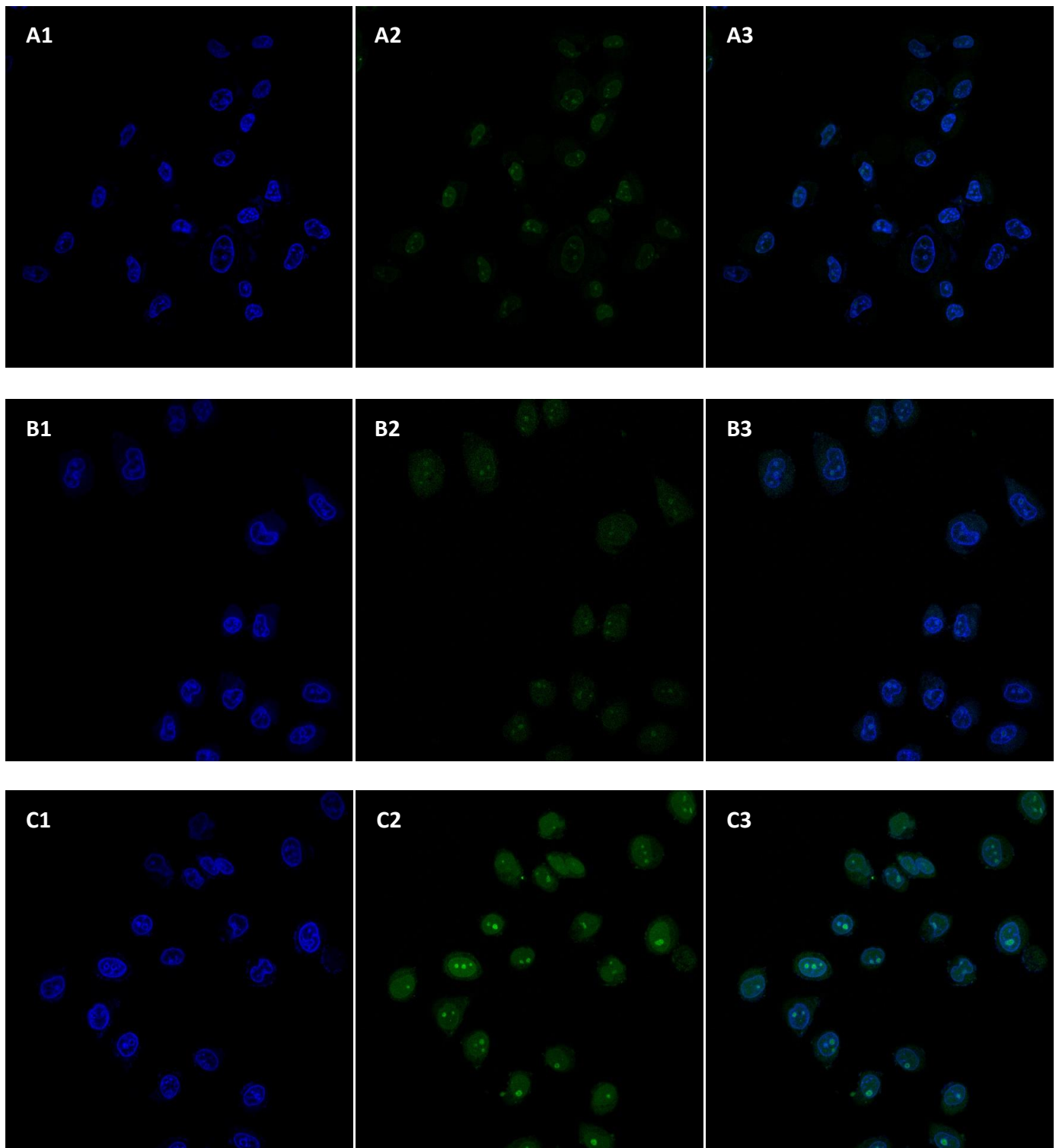
**Figura 14** - Imagens relativas à transfeção das células HeLa (6 horas de transfeção) utilizando o pDNA livre (A) e os vários sistemas PEI/pDNA de rácio N/P = 1,5; 2 e 5, correspondendo às imagens B, C e D respetivamente. As imagens foram obtidas através da técnica de imunocitoquímica, utilizando a microscopia de confocal.



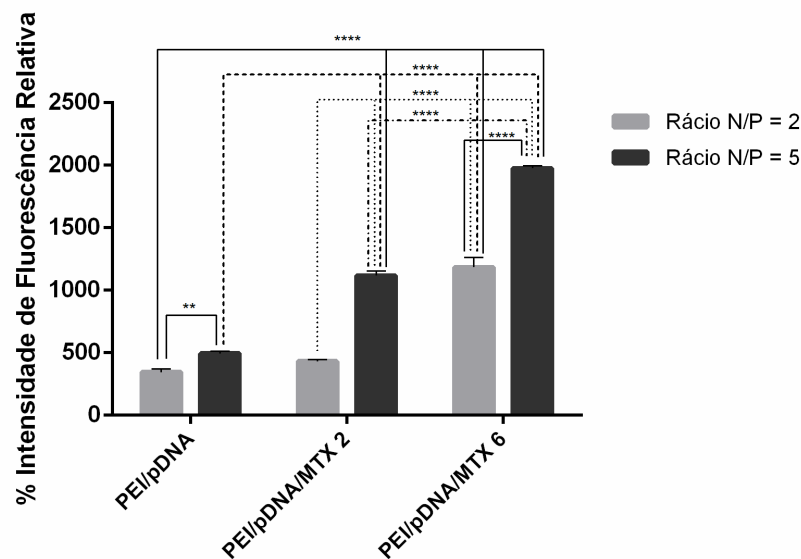
**Figura 15** - Imagens relativas à transfeção das células HeLa utilizando os vários sistemas em estudo. As imagens foram obtidas através da técnica de *live cell imaging*, utilizando a microscopia de confocal.



**Figura 16** - Imagem ortogonal relativa à transfeção das células HeLa utilizando o sistema PEI/pDNA/MTX de rácio N/P = 5 e concentração de MTX 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A imagem foi obtida utilizando o programa ZEN e analisada com a opção "Ortho".



**Figura 17** - Avaliação da diferença de transfeção dos vetores formulados a rácio N/P = 5 para os sistemas PEI/pDNA (A) e PEI/pDNA/MTX com concentração de MTX de 2 $\mu$ g/mL (B) e 6 $\mu$ g/mL (C). As imagens 1 correspondem apenas à marcação dos núcleos das células HeLa, enquanto que as 2 corresponde à marcação do plasmídeo e as 3 à co-localização.



**Figura 18** - Intensidade de fluorescência relativa do plasmídeo marcado com FITC. A análise estatística foi elaborada recorrendo ao teste de “two-way ANOVA” de dados com  $n = 3$ . A significância estatística representada pelos asteriscos “\*\*\*\*” e “\*\*\*\*\*” tem um valor de  $p = 0,0082$  e  $p < 0,0001$  respetivamente.

Os resultados da captação e internalização nas células HeLa dos sistemas PEI/pDNA, presentes na figura 14, revelam que os vetores formulados a rácios N/P = 2 e 5 conseguiram ultrapassar a membrana celular e entrar no citoplasma das células. No entanto, as imagens parecem indicar que, após 6 horas de transfeção, o pDNA ainda não se encontrava no núcleo, sendo este facto essencial para haver transcrição do gene de interesse. Os complexos de rácio N/P = 5 apresentam, ainda assim, uma maior capacidade de transfeção do que os sistemas de rácio N/P = 2, uma vez que as células transfetadas por estes poliplexos evidenciam uma maior quantidade de vetores no citoplasma. Este resultado pode ser comprovado pela análise das imagens B e C da figura 14. A entrada destes sistemas nas células pode ser explicada através dos tamanhos e morfologia adequados para este tipo de vetores, mas essencialmente às cargas superficiais positivas que possuem. Estas cargas positivas facilitam a captação dos sistemas pelas células devido à atração de cargas que ocorre com as cargas negativas da membrana celular (Mady *et al.*, 2011). Isto explica o facto dos poliplexos de rácio 5 apresentarem melhores resultados do que os de rácio 2, uma vez que já foi demonstrado que o seu potencial zeta é superior.

As imagens da figura 15 demonstram as diferenças entre os sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX. Os sistemas sem MTX apresentam uma baixa capacidade de transfeção, revelando menor capacidade de fazer chegar o pDNA ao núcleo das células alvo. Em contrapartida, os sistemas com MTX, mesmo os que foram formulados com a menor concentração da droga (2 µg/mL), apresentam melhor captação por parte das células. No entanto, pode verificar-se que é com a maior concentração de MTX (6 µg/mL) e o maior rácio N/P testado (N/P = 5) que se observa uma transfeção significativa das células e que são estes os complexos que permitem a chegada de grandes quantidades de pDNA ao núcleo das células alvo. A análise da capacidade de transfeção dos sistemas pela técnica *de live cell imaging* (figura 15) permitiu concluir que o uso da droga MTX não só facilita a entrega dos agentes terapêuticos às células alvo como acelera o processo de transfeção. A presença do MTX nos complexos permitiu diminuir o tempo de entrada nas células de duas horas para cerca de quinze minutos.

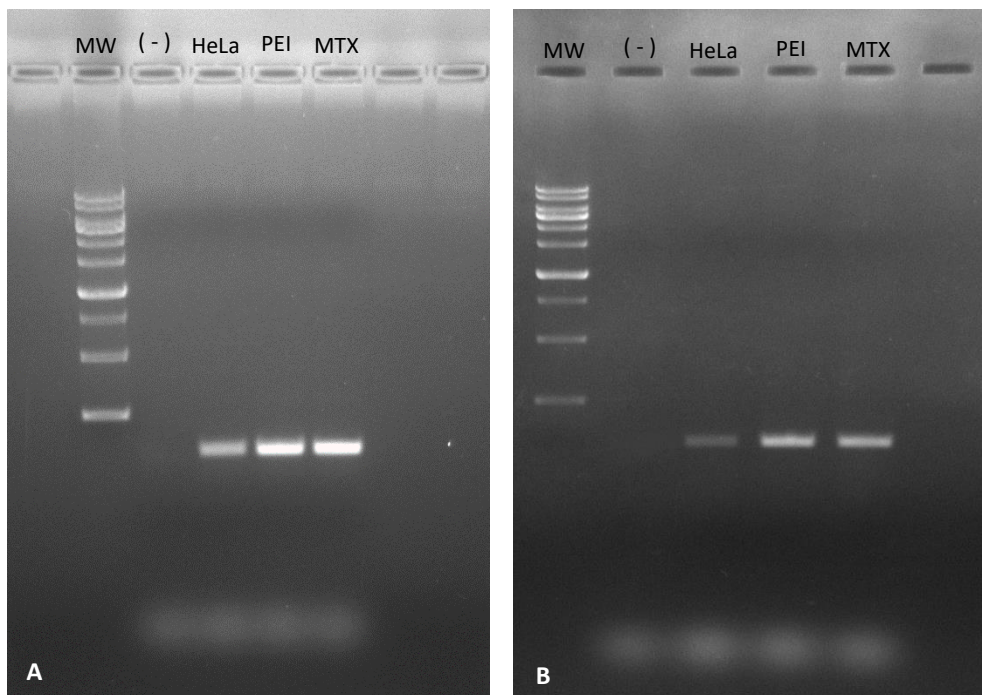
A imagem da figura 16 foi apresentada para comprovar a localização dos sistemas, isto é, que a marcação observada se deve à presença dos sistemas com pDNA dentro do núcleo, onde depois vai ocorrer a transcrição do gene de interesse em RNA mensageiro e tradução deste na proteína p53.

As imagens da figura 17 permitem compreender melhor as diferenças de transfeção celular por parte dos três vetores de rácio N/P = 5 analisados. Pode-se observar a influência da presença do MTX nos sistemas na capacidade de captação e internalização celular destes vetores. O incremento da concentração de MTX usada na formulação dos poliplexos leva a um aumento do número de vetores presentes no citoplasma e de pDNA no núcleo das células HeLa.

Para compreender ainda melhor as diferenças de transfeção dos diversos sistemas estudados, procedeu-se à quantificação da fluorescência do sinal correspondente ao pDNA nas imagens da figura 15. A análise estatística destes dados foi apresentada num gráfico de barras (figura 18). Ao analisarmos a figura 18, podemos verificar que quanto maior o rácio N/P utilizado para formular os sistemas, maior a capacidade de captação e internalização por parte das células. No entanto é evidente que o uso do fármaco MTX e o aumento da sua concentração induzem uma maior capacidade dos sistemas para entrarem e entregarem o pDNA no núcleo das células cancerígenas. Este resultado vem reforçar a teoria referida anteriormente, de que o MTX é estruturalmente muito semelhante ao ácido fólico, o que permite que as nanopartículas sejam reconhecidas pelos recetores do ácido fólico. O facto de estes recetores estarem abundantemente presentes nas células cancerígenas facilita a internalização dos sistemas PEI/pDNA/MTX (Kohler *et al.*, 2006).

### 4.3. Transcrição do gene da p53

Comprovada a internalização dos sistemas nas células HeLa e a presença do pDNA no núcleo, pretendeu-se de seguida avaliar a presença de transcritos do gene da proteína (p53). Para avaliar a presença de RNA mensageiro de p53 nas células transfetadas após 12 e 24h, foi efetuada a técnica de RT-PCR, começando por extrair o RNA total, converter em cDNA e por fim realizar um PCR com primers específicos. Os produtos de PCR obtidos foram visualizados em gel de agarose. Os resultados, para a transfeção mediada por nanopartículas baseadas em PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX, estão representados na figura 19. Células HeLa não tratadas foram usadas como controlo.



**Figura 19** - Resultados de RT-PCR para células HeLa após 12 (A) e 24 (B) horas de transfeção. (MW - marcador de peso molecular; (-) - controlo negativo (todos os reagentes da reação de PCR exceto a amostra); HeLa - células HeLa não transfetadas; PEI - células transfetadas com nanopartículas PEI/pDNA de ratio N/P = 5; MTX - células transfetadas com nanopartículas PEI/pDNA/MTX de ratio N/P = 5 com MTX de concentração 6 µg/mL).

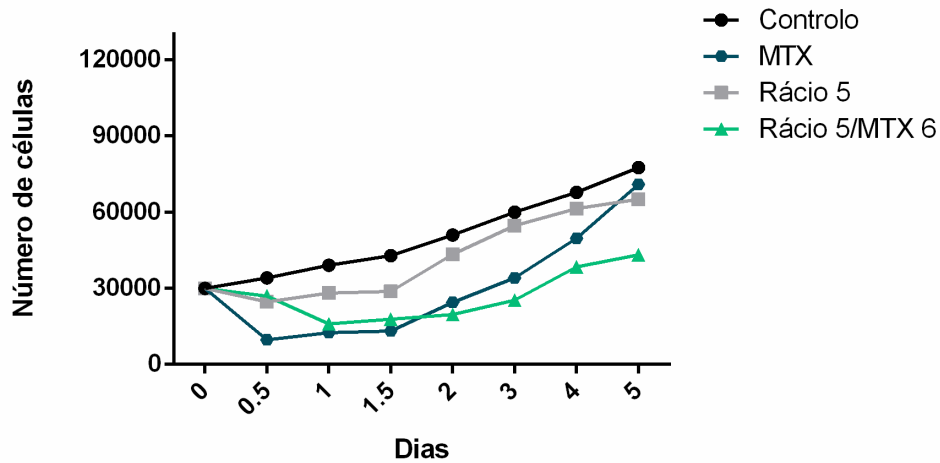
Os resultados apresentados na figura 19 mostram a presença de elevados níveis de RNA mensageiro da proteína p53 proveniente das células transfetadas com ambos os sistemas, em relação à banda observada para a amostra controlo. Por análise relativa da intensidade de bandas, também parece existir maior quantidade de mRNA da p53 nas células que foram transfetadas com os sistemas PEI/pDNA/MTX em comparação com os sistemas PEI/pDNA após 12 h (figura 19 A). No caso da figura 19 B (24 horas após a transfeção), a intensidade da banda dos transcritos para o sistema PEI/pDNA parece ser ligeiramente mais intensa que a banda das células que foram transfetadas com o sistema PEI/pDNA/MTX.

Os resultados verificados na figura 19 A parecem acompanhar os resultados de microscopia de confocal. Isto é, os sistemas PEI/pDNA/MTX apresentam maior capacidade de transfeção, levando a uma maior quantidade de pDNA no interior do núcleo das células e consequentemente maior transcrição do gene da p53. Os resultados evidenciados na figura 19 B e as diferenças de intensidade entre as duas figuras podem ser explicados pelo facto de ter sido feita a extração dos transcritos apenas 24 horas depois da transfeção (em comparação com as 12 horas da figura 19 A), havendo mais tempo para se dar o efeito terapêutico do fármaco MTX, uma vez que já foi verificado acima que este agente apresenta citotoxicidade para as células cancerígenas (Kohler *et al.*, 2006).

A técnica de RT-PCR permitiu verificar que as nanopartículas produzidas têm o efeito pretendido, levando a um aumento da quantidade de mRNA da p53 no interior das células HeLa, essencial para a indução da apoptose das mesmas. A transcrição do gene de interesse, que está presente no pDNA usado, revela também que os sistemas formulados protegem o pDNA ao longo do processo de transfeção e chegada ao núcleo.

#### **4.4. Efeito terapêutico dos sistemas**

Após o desenvolvimento e caracterização dos sistemas formulados e a análise da sua capacidade de transfeção *in vitro*, torna-se essencial avaliar o seu efeito terapêutico. Para avaliar este efeito, realizou-se um estudo preliminar de proliferação celular em células HeLa através da realização do ensaio de azul de tripano. As células HeLa foram transfetadas com os vetores PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX e a proliferação celular foi monitorizada ao longo do tempo. Para comparação, estas células foram também tratadas com a droga MTX. A tendência de crescimento das células está representada, em gráfico, na figura 20.



**Figura 20** - Proliferação das células HeLa transfetadas com os sistemas PEI/pDNA e PEI/pDNA/MTX, incubadas em meio com MTX 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e não transfetadas. A análise estatística foi elaborada com um  $n = 5$  e representada recorrendo a um gráfico de linhas.

O gráfico da figura 20 mostra a proliferação das células HeLa em função do tempo decorrido após transfeção com as várias nanopartículas consideradas. Esta proliferação apresenta um ritmo diferente consoante o sistema usado para mediar a transfeção. As células tratadas com a adição de MTX, com uma concentração de 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , demonstraram uma diminuição brusca inicial do número de células, no entanto com o passar dos dias as células voltaram a crescer normalmente. O uso isolado do fármaco MTX demonstrou apenas efeito numa fase inicial, levando à morte das células que estiveram em contacto com a droga, mas esse efeito não se perpetua ao longo do tempo. A diminuição do efeito do fármaco pode ser explicada pela conhecida resistência das células cancerígenas a compostos tóxicos. Depois de estarem algum tempo em contacto com drogas, as células criam mecanismos de defesa e através de transportadores de efluxo localizados na membrana celular, reduzem a concentração da droga no seu interior. Outro dos motivos da resistência a fármacos por parte das células cancerígenas advém das mutações que ocorrem no genoma dessas células. O aparecimento de genes mutados confere resistência às drogas, deixando as células menos sensíveis à toxicidade do fármaco (Lin Kang *et al.*, 2015).

Em relação aos vetores poliméricos, observa-se uma clara inibição do crescimento celular nas primeiras 12 h, com um efeito mais pronunciado para o sistema PEI/pDNA/MTX 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e rácio 5. Após as primeiras 12 h, as nanopartículas parecem induzir efeitos diferentes. O tratamento com partículas baseadas em PEI/pDNA vai recuperando a capacidade de proliferação celular das células HeLa, enquanto o sistema PEI/pDNA/MTX continua a inibir a proliferação destas células, pelo menos, até 3 dias após a transfeção. Deste modo, o PEI/pDNA/MTX 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  formulado a rácio 5 parece evidenciar um maior efeito terapêutico e consequentemente uma menor proliferação das células HeLa.

A co-entrega de genes e fármacos às células tumorais HeLa têm revelado inibição da proliferação celular em outros estudos. A indução da apoptose de células tumorais através da aplicação de vetores não virais que carregam os dois agentes terapêuticos tem sido maior do que em comparação com tratamentos individuais (Costa *et al.*, 2014). À semelhança do que se encontra reportado na literatura, neste estudo também se pôde constatar o efeito sinérgico do uso de um sistema bifuncional gene/droga. A utilização dos dois agentes terapêuticos em simultâneo revelou melhores resultados do que as suas utilizações individuais.

## 5. Conclusão e perspetivas futuras

O desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do cancro do colo do útero tem surgido como objeto de estudo em diversas investigações. O uso de terapias génicas de co-entrega tem revelado enormes benefícios ao nível da diminuição dos efeitos secundários, aumento da eficácia dos tratamentos e na resolução dos problemas/limitações associados às terapias convencionais.

Com o intuito de contribuir para o progresso de terapias oncológicas, nomeadamente tendo como alvo o tratamento do cancro do colo do útero, a abordagem deste projeto de mestrado centrou-se no desenvolvimento de sistemas poliméricos para entregar simultaneamente DNA plasmídico que codifica para o supressor de tumor p53 e a droga anticancerígena MTX às células cancerígenas. A co-entrega direcionada e a consequente promoção de efeito sinérgico na inibição do crescimento tumoral foram a prioridade do estudo.

As nanopartículas baseadas em polietilenimina/pDNA e polietilenimina/pDNA/metotrexato foram desenvolvidas a vários rácios N/P e as suas propriedades estudadas. Os resultados obtidos revelam que as nanopartículas possuem elevadas taxas de encapsulação de pDNA, tamanhos nanométricos, morfologia esférica e carga superficial positiva, características adequadas a protocolos de terapia génica para o tratamento do cancro do colo do útero. Com o objetivo de aumentar o efeito terapêutico e direcionar os sistemas para as células alvo, foi associado a esta terapia génica o uso de uma droga anticancerígena. Os sistemas PEI/pDNA/MTX permitiram colmatar algumas lacunas dos sistemas PEI/pDNA, como por exemplo, aumentar as cargas positivas à superfície dos vetores e consequentemente melhorar a capacidade de captação e internalização por parte das células tumorais. Os poliplexos demonstraram ser biocompatíveis, proteger o pDNA da degradação e condensar quantidades adequadas e significativas em simultâneo dos dois agentes terapêuticos utilizados. Estas propriedades podem ser adaptadas tanto pela relação molar (N/P) do azoto do polímero PEI para os grupos fosfato do pDNA, quer pela quantidade de MTX que é utilizada para formular os complexos. Os sistemas desenvolvidos mostraram ainda capacidade de entregar o pDNA, que contem o gene da p53, ao núcleo das células HeLa e levar à produção de transcritos de mRNA da proteína. Estudos que avaliaram a proliferação celular de células transfetadas com os sistemas PEI/pDNA/MTX demonstraram maior capacidade terapêutica e de inibição da proliferação das células tumorais.

O presente trabalho demonstrou que os sistemas de entrega formulados com o polímero PEI podem ser considerados como bons candidatos para desenvolver potenciais sistemas de co-administração de fármacos e genes, a fim de alcançar o efeito sinérgico das terapias químicas e génicas, contribuindo para a evolução e sucesso do tratamento médico contra o cancro do colo do útero. No entanto, é preciso ainda aprofundar a investigação nestes sistemas a fim de complementar os resultados obtidos com a determinação da proteína p53 pela técnica de *western blot* ou kit de ELISA. Os ensaios de proliferação que permitem avaliar o efeito terapêutico dos sistemas podem ser complementados com o uso de kits de deteção de apoptose como por exemplo o “Annexin V Apoptosis Detection Kit”. Outro dos temas que pode ser futuramente explorado é a incorporação de diferentes resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e ligantes de direcionamento na superfície do polímero PEI de 25k, com o intuito de aumentar a sua eficiência de transfeção. De forma complementar, o desenvolvimento de novas estratégias de combinação de bioagentes terapêuticos avançados pode também representar uma área de investigação importante e promover a eficácia dos tratamentos na área do cancro. O direcionamento dos agentes terapêuticos, diminuição da toxicidade e dos efeitos secundários nas células saudáveis podem ser considerados para alcançar o objetivo final de melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## 6. Referências bibliográficas

- Aied, A., Greiser, U., Pandit, A., Wang, W. (2013). Polymer gene delivery: Overcoming the obstacles. *Drug Discovery Today*, 18(21-22), 1090-1098.
- Arnida, Malugin, A., Ghandehari, H. (2009). Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Applied Toxicology*, 30, 212-217.
- Bajpai A. K., Bajpai J., Saini R. K. (2014). Design and Development of Biopolymeric Nanocarriers for Gene Delivery. In: GOVIL J., KUMAR A., *Biotechnology Volume 10 Nanobiotechnology*, Boston: Studium Press LLC, p.151-177.
- Bao, X., Wang, W., Wang, C., Wang, Y., Zhou, J., Ding, Y., *et al.* (2014). A chitosan-graft-PEI-candesartan conjugate for targeted co-delivery of drug and gene in anti-angiogenesis cancer therapy. *Biomaterials*, 35(29), 8450-8466.
- Barasso, R., Brux, J., Croissant, O., Orth, G. (1987). High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*, 317, 916-923.
- Bayramoglu G., Arica, M. Y. (2008). Adsorption of Cr (VI) onto PEI immobilized acrylate-based magnetic beads: Isotherms, kinetics and thermodynamics study. *Chemical Engineering Journal*, 139, 20-28.
- Best, S. R., Niparko, K. J., Pai, S. I. (2012). Biology of Human Papillomavirus Infection and Immune Therapy for HPV-Related Head and Neck Cancers. *Otolaryngologic Clinics of NA*, 45, 807-822.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., de Sanjosé, S. (2018). Human Papillomavirus and Related Diseases in Americas. Summary Report. HPV Information Centre, 1-164.
- Bruni, L., Barrionuevo-Rosas L., Albero G., Serrano B., Mena M., Gómez D., Muñoz J., Bosch F.X., de Sanjosé S. (2017). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre).
- Carter, J. (2013). A contemporary review of uterine cancer management. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 53(6), 517-524.
- Cevher, E., Sezer, A. D., Çaglar, E. S. (2012). Gene delivery systems: Recent progress in viral and non-viral therapy. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, 437-469.

- Chabeda, A., Yanez, R. J. R., Lamprecht, R., Meyers, A. E., Rybicki, E. P., Hitzeroth, I. I. (2018). Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Research*, 5, 46-58.
- Chen, L., Li, X., Zhang, Y., Chen, T., Xiao, S., Liang, H. (2018). Morphological and mechanical determinants of cellular uptake of deformable nanoparticles. *Nanoscale*, 1-11.
- Cheraghi, R., Alipour, M., Nazari, M., Hosseinkhani, S. (2017). Optimization of conditions for gene delivery system based on PEI, 4(1), 8-16.
- Chira, S., Jackson, C. S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M. S., Diaconu, I., Berindan-Neagoe, I. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget*, 6(31), 30675-703.
- Choi, Y., Kim, M., Cho, Y., Yun, E., Song, R. (2013). Synthesis, characterization and target protein binding of drug-conjugated quantum dots in vitro and in living cells. *Nanotechnology*, 24, 1-9.
- Costa, D., Briscoe, W. H., Queiroz, J. (2015). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Polyethylenimine coated plasmid DNA - surfactant complexes as potential gene delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 133(2015), 156-163.
- Costa, D., Costa, C., Caldeira, M., Cortes, L., Queiroz, J. A., Cruz, C. (2017). Targeting of Cellular Organelles by Fluorescent Plasmid DNA Nanoparticles. *Biomacromolecules*.
- Costa, D., Valente, A. J. M., Miguel, M. G., Queiroz, J. (2012). Plasmid DNA microgels for a therapeutical strategy combining the delivery of genes and anticancer drugs. *Macromolecular Bioscience*, 12(9), 1243-1252.
- Costa, D., Valente, A. J. M., Miguel, M. G., Queiroz, J. (2014). Plasmid DNA microgels for drug/gene co-delivery: A promising approach for cancer therapy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 181-190.
- Costa, D., Valente, A. J. M., Queiroz, J. A., Sousa, Â. (2018). Finding the ideal polyethylenimine-plasmid DNA system for co-delivery of payloads in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1-31.
- Dervieux, T., Furst, D., Lein, D. O., Capps, R., Smith, K., Walsh, M., Kremer, J. (2004). Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 50(9), 2766-2774.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., Prazeres, D. M. F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 1069(2005), 3-22.

- Direção Geral da Saúde. (2017). Norma no 016/2016, de 16/12/2016. Novo Programa Nacional de Vacinação - PNV.
- Dochez, C., Bogers, J. J., Verhelst, R., Rees, H. (2014). HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts: an update. *Vaccine*, 32, 1595-1601.
- Dohmen, C., Edinger, D., Frohlich, T., Schreiner, L., Lachelt, U., Troiber, C., ... Wagner, E. (2012). Nanosized multifunctional polyplexes for receptor-mediated SiRNA delivery. *ACS Nano*, 6(6), 5198-5208.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525-541.
- Dumoga, S., Rai, Y., Bhatt, A. N., Tiwari, A. K., Singh, S., Mishra, A. K., Kakkar, D. (2017). Block Copolymer Based Nanoparticles for Theranostic Intervention of Cervical Cancer: Synthesis, Pharmacokinetics, and in Vitro/in Vivo Evaluation in HeLa Xenograft Models. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(27), 22195-22211.
- Ferreira, G. N. M., Monteiro, G. A., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S. (2000). Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications, 18, 380-388.
- Foldvari, M., Chen, D. W., Nafissi, N., Calderon, D., Narsineni, L., Rafiee, A. (2015). Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *Journal of Controlled Release*.
- Gaspar, V. M., Gonçalves, C., de Melo-Diogo, D., Costa, E. C., Queiroz, J. A., Pichon, C., Correia, I. J. (2014). Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-g-PEI amphiphilic triblock micelles for co-delivery of minicircle DNA and chemotherapeutics. *Journal of Controlled Release*, 189, 90-104.
- Goldie, S. J., Gaffikin, L., Goldhaber-Fiebert, J. D., Gordillo-Tobar, A., Levin, C., Mahé, C., Wright, T. C. (2005). Cost-effectiveness of cervical-cancer screening in five developing countries. *The New England Journal of Medicine*, 353(20), 2158-68.
- Govindappagari, S., Schiavone, M., Whight, J. (2011). Cervical neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54, 528-536.
- Hall, A., Parhamifar, L., Lange, M. K., Meyle, K. D., Sanderhoff, M., Andersen, H., ... Moghimi, S. M. (2015). Polyethylenimine architecture-dependent metabolic imprints and perturbation of cellular redox homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1847(3), 328-342.
- Han, K., Chen, S., Chen, W. H., Lei, Q., Liu, Y., Zhuo, R. X., Zhang, X. Z. (2013). Synergistic gene and drug tumor therapy using a chimeric peptide. *Biomaterials*, 34(19), 4680-4689.

- Han, L., Huang, R., Li, J., Liu, S., Huang, S., Jiang, C. (2011). Plasmid pORF-hTRAIL and doxorubicin co-delivery targeting to tumor using peptide-conjugated polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials*, 32(4), 1242-1252.
- Han, Y., Liu, S., Ho, J., Danquah, M. K., Forde, G. M. (2009). Using DNA as a drug – Bioprocessing and delivery strategies. *Chemical Engineering Research and Design*, 87, 343-348.
- Hennessey, P. T., Westra, W. H., Califano, J. A. (2009). Human Papillomavirus and Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Recent Evidence and Clinical Implications. *CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY MEDICINE*, 88(4), 300-306.
- Ibraheem, D., Elaissari, A., Fessi, H. (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 459, 70-83.
- Infarmed. (2017). Folheto informativo: Informação para o doente.
- Jenison, S., Yu, X., Valentine, J., Col, E. (1990). Evidence of prevalent genital-type human papillomavirus infections in adults and children. *J Infect Diseases*, 162, 60-69.
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 4(3), 240-255.
- Jingou, J., Shilei, H., Weiqi, L., Danjun, W., Tengfei, W., Yi, X. (2011). Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83, 103-107.
- Kamimura, K., Suda, T., Zhang, G., Liu, D. (2011). Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceut Med*, 25(5), 293-306.
- Kaneshiro, T. L., Lu, Z.-R. (2009). Targeted intracellular codelivery of chemotherapeutics and nucleic acid with a well-defined dendrimer-based nanoglobular carrier. *Biomaterials*, 30(29), 5660-5666.
- Kang, L., Gao, Z., Huang, W., Jin, M., Wang, Q. (2015). Nanocarrier-mediated co-delivery of chemotherapeutic drugs and gene agents for cancer treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(3), 169-175.
- Khatri, S., Das, N. G., Das, S. K. (2014). Effect of methotrexate conjugated PAMAM dendrimers on the viability of MES-SA uterine cancer cells, 6(4), 297-302.
- Kohler, N., Sun, C., Fichtenholtz, A., Gunn, J., Fang, C., Zhang, M. (2006). Methotrexate-Immobilized Poly (ethylene glycol) Magnetic Nanoparticles for MR Imaging and Drug Delivery. *Small*, 2(6), 785-792.

- Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological Reviews*, 32(4), 403-430. <https://doi.org/10.1152/physrev.1952.32.4.403>
- Leto, M. G., Santos, J., Gildo, F., Maria, A., Tomimori, J. (2011). Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(2), 306-317.
- Li, L., Wei, Y., Gong, C. (2015). Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11, 739-770.
- Limberger, A., Oliveira, C. F. De, Correa, M. P., Reus, L., Massayo, J., Oda, M., Carneiro, N. K. (2012). Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) Immunological aspects of human papiloma virus (HPV) infection, 33(1), 111-122.
- Liu, C., Liu, F., Feng, L., Li, M., Zhang, J., Zhang, N. (2013). The targeted co-delivery of DNA and doxorubicin to tumor cells via multifunctional PEI-PEG based nanoparticles. *Biomaterials*, 34(10), 2547-2564.
- Liu, M. (2003). DNA vaccines: a review. *Journal of Internal Medicine*, 253, 402-410.
- Liu, M. A., Ulmer, J. B. (2005). Human Clinical Trials of Plasmid DNA Vaccines. *Advances in Genetics*, 55, 25-40.
- Liu, T., Xue, W., Ke, B., Xie, M. Q., Ma, D. (2014). Star-shaped cyclodextrin-poly(L-lysine) derivative co-delivering docetaxel and MMP-9 siRNA plasmid in cancer therapy. *Biomaterials*, 35(12), 3865-3872.
- Lorincz, A., Rei, R., Jenson, A. e col. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: Relative risk association of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*, 94, 328-373.
- Macedo, A., Andrade, S., Moital, I., Moreira, A. et al. (2008). Perfil da Doença Oncológica em Portugal: Racional, Objetivos e Metodologia - Estudo Perfil. *Acta Médica Portuguesa*, 21(4), 329-334.
- Mady, M. M., Mohammed, W. A., El-guendy, N. M., Elsayed, A. A. (2011). EFFECT OF POLYMER MOLECULAR WEIGHT ON THE DNA / PEI POLYPLEXES PROPERTIES, 21(2), 151-165.
- Mady, M. M., Mohammed, W. A., El-guendy, N. M., Elsayed, A. A. (2011). Interaction of DNA and polyethylenimine: Fourier- transform infrared (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) studies, 6(32), 7328-7334.
- Mahor, S., Collin, E., Dash, B. C., Pandit, A. (2011). Controlled release of plasmid DNA from hyaluronan nanoparticles. *Current Drug Delivery*, 8, 354-362.
- Mallory, C. M., Carfi, R. P., Moon, S., Cornell, K. A., Warner, D. L. (2016). Modification of cellular DNA by synthetic aziridinomitosenes. *Bioorg Med Chem*, 23(23), 7378-7385.

- Misra, R., Das, M., Sahoo, B. S., Sahoo, S. K. (2014). Reversal of multidrug resistance in vitro by co-delivery of MDR1 targeting siRNA and doxorubicin using a novel cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoformulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 475(1-2), 372-384.
- Mota, F. (2012). *Compêndio de Ginecologia Oncológica*. (Lidel, Ed.). Lisboa-Porto
- Nikitenko, N. A., Prassolov, V. S. (2013). Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta Naturae*, 5(3), 35-53.
- Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., Stayton, P. S. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 4(7), 581-93.
- Pereira, P., Jorge, A. F., Martins, R., Pais, A. A. C. C., Sousa, F., Figueiras, A. (2012). Characterization of polyplexes involving small RNA. *Journal of Colloid and Interface Science*, 387(1), 84-94.
- Pereira P., Sousa F., Figueiras A. (2014). Polyplexes as Nanovectors for Gene Therapy. In: GOVIL J. N., KUMAR A., *Biotechnology Volume 10 Nanobiotechnology*, Boston: Studium Press LLC, p. 179-223.
- Prather, K. J., Sagar, S., Murphy, J., Chartrain, M. (2003). Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(2003), 865-883.
- Qu, M. H., Zeng, R. F., Fang, S., Dai, Q. S., Li, H. P., Long, J. T. (2014). Liposome-based co-delivery of siRNA and docetaxel for the synergistic treatment of lung cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1-2), 112-122.
- Rahimian, S., Fransen, M. F., Kleinovink, J. W., Christensen, J. R., Amidi, M., Hennink, W. E., Ossendorp, F. (2015). Polymeric nanoparticles for co-delivery of synthetic long peptide antigen and poly IC as therapeutic cancer vaccine formulation. *Journal of Controlled Release*, 1-21.
- Ramakrishnan, S., Patricia, S., Mathan, G. (2015). Overview of high-risk HPV's 16 and 18 infected cervical cancer: Pathogenesis to prevention. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 70, 103-110.
- Ramamoorth, M., Narvekar, A. (2015). Non viral vectors in Gene therapy - An overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(1), GE01-GE06.
- Rasouli, S., Davaran, S., Rasouli, F., Mahkam, M., Salehi, S. (2013). Synthesis, characterization and pH-controllable methotrexate release from biocompatible polymer/silica nanocomposite for anticancer drug delivery. *Drug Delivery*, 1-9.

- Rehman, Z. U., Zuhorn, I. S., Hoekstra, D. (2013). How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: Recent advances. *Journal of Controlled Release*, 166(1), 46-56.
- Riethmuller, D., Jacquard, A.-C., Lacau St Guily, J., Aubin, F., Carcopino, X., Pradat, P., Prétet, J.L. (2015). Potential impact of a nonavalent HPV vaccine on the occurrence of HPV-related diseases in France. *BMC Public Health*, 15(1), 453.
- Rubino, F. M. (2001). Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 764(1-2), 217-254.
- Saad, M., Garbuzenko, O. B., Minko, T. (2008). Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer. *Nanomedicine*, 3(6), 761-776.
- Skandrani, N., Barras, A., Legrand, D., Gharbi, T., Boulahdour, H., Boukherroub, R. (2014). Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging. *Nanoscale*, 6(13), 7379-7390.
- Solomon, D. (1989). The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *Acta Cytol*, 33: 567-574.
- Sousa, Â., Sousa, F., Queiroz, J. A. (2012). Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. *Journal of Separation Science*, 1-13.
- Sousa, F., Prazeres, D. M. F., Queiroz, J. A. (2008). Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 518-525.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, 1-3.
- Sun, J., Ren, K., Zhu, L., Ji, J. (2013). Multilayers based on cationic nanocomplexes for co-delivery of doxorubicin and DNA. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 67-73.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Woodward, J., Sanchis, D. M., Ma, H., ... Mitalipov, S. (2013). Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 493, 627-631.
- Verma, I. M., Weitzman, M. D. (2005). GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 711-738.
- Vineis, P., Wild, C. P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *The Lancet*, 1-9.
- Wang, J. W., Roden, R. B. S. (2013). Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Reviews*, 12(2), 129-142.

- Wang, Y., Gao, S., Ye, W.-H., Yoon, H. S., Yang, Y.-Y. (2006). Co-delivery of drugs and DNA from cationic core-shell nanoparticles self-assembled from a biodegradable copolymer. *Nature Materials*, 5(10), 791-796.
- Wong, P. T., Choi, S. K. (2015). Mechanisms and implications of dual-acting methotrexate in folate-targeted nanotherapeutic delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1772-1790.
- Xu H., Li Z., Si J. (2014). Nanocarriers in Gene Therapy: A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(12), 483-507.
- Yang, B., Jia, H., Wang, X., Chen, S., Zhang, X., Zhuo, R., Feng, J. (2013). Self-Assembled Vehicle Construction via Boronic Acid Coupling and Host-Guest Interaction for Serum-Tolerant DNA Transport and pH-Responsive Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 3(4), 596-608.
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., Anderson, D. G. (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet*, 15(8), 541-555.
- Ylä-Herttua, S. (2012). Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Molecular Therapy*, 20(10), 1831-1832.
- Zhang, F., Correia, A., Mäkilä, E. M., Li, W., Jarno, J., Hirvonen, J., Santos, H. A. (2017). Receptor-Mediated Surface Charge Inversion Platform Based on Porous Silicon Nanoparticles for Efficient Cancer Cell Recognition and Combination Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1-41.
- Zhao, D., Wang, C. Q., Zhuo, R. X., Cheng, S. X. (2014). Modification of nanostructured calcium carbonate for efficient gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- Zhao, F., Yin, H., Li, J. (2014). Supramolecular self-assembly forming a multifunctional synergistic system for targeted co-delivery of gene and drug. *Biomaterials*, 35(3), 1050-1062.
- Zhu, L., Perche, F., Wang, T., Torchilin, V. P. (2014). Matrix metalloproteinase 2-sensitive multifunctional polymeric micelles for tumor-specific co-delivery of siRNA and hydrophobic drugs. *Biomaterials*, 35(13), 4213-4222.

## 7. Anexos

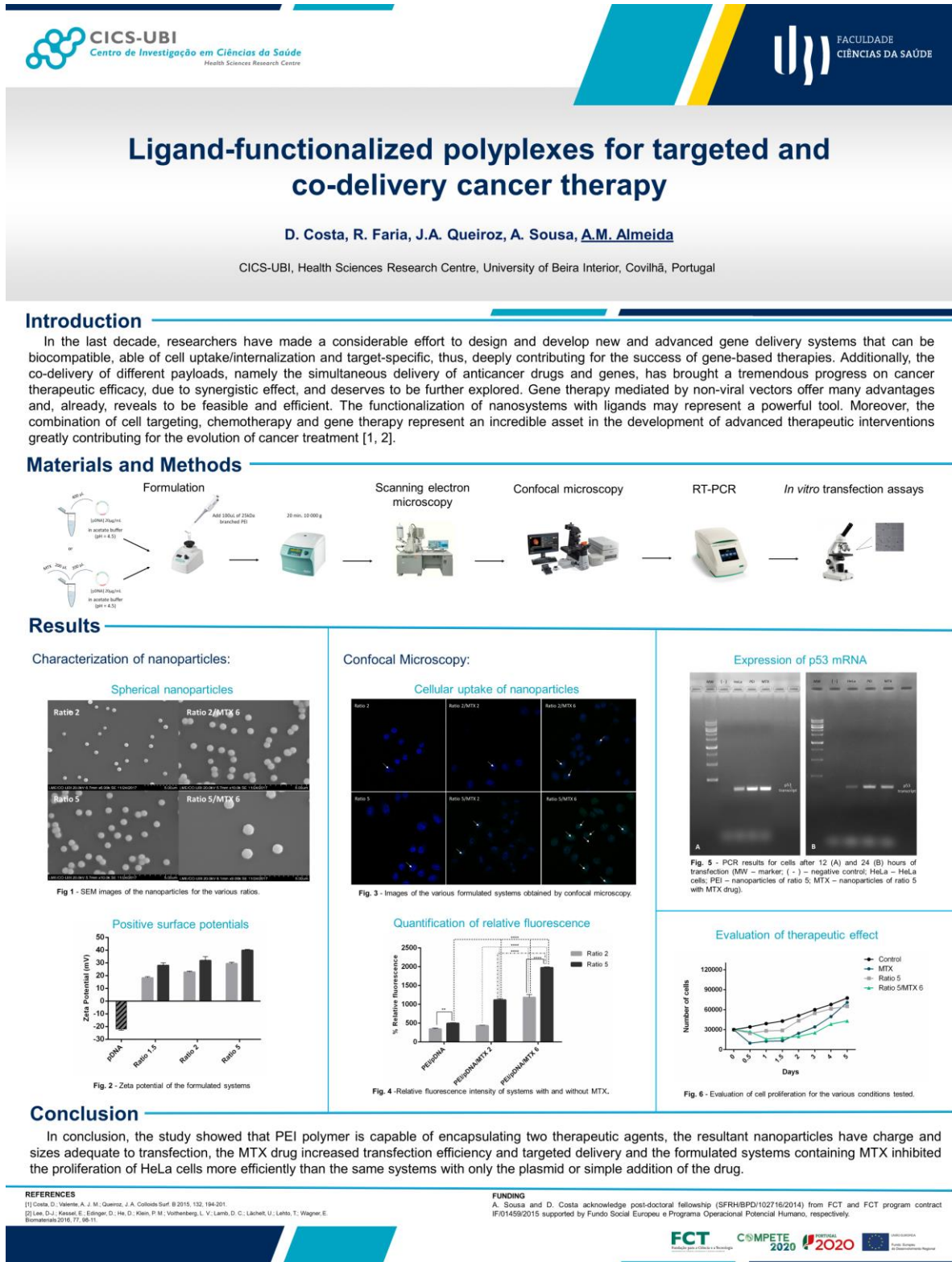


Figura 21 - Poster apresentado no 12º Simpósio da Sociedade Europeia de Ciências da Engenharia Bioquímica (ESBES).