



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

Terapia do Cancro do Colo do Útero: Obtenção de um vetor de ADN plasmídico e entrega direcionada às células tumorais

Pedro Jorge Bernardo Moreira de Almeida

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Biotecnologia

(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Doutora Ângela Sousa

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Diana Costa

Covilhã, outubro de 2017

“A ciência é uma disposição de aceitar os factos mesmo quando eles são opostos aos desejos”

Burrhus Frederic Skinner

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais e irmão.

Agradecimentos

Ao terminar este meu trabalho não podia deixar de agradecer à Professora Doutora Ângela Sousa e à Professora Doutora Diana Costa toda a disponibilidade, ajuda, confiança, autonomia e conhecimento que me transmitiram, permitindo assim a conclusão desta etapa da minha vida académica e a todos, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste projeto.

Agradeço à Universidade da Beira Interior, com destaque ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por me terem acolhido e disponibilizado todas as condições necessárias à realização desta dissertação.

Agradeço ao Augusto Pedro, ao Gilson Martins, à Joana Valente, à Margarida Almeida e à Rita Simões pela partilha de saberes, ajuda e disponibilidade e ainda pelo acolhimento simpatia e amizade que construímos ao longo deste ano. Um especial agradecimento à Patrícia Pereira pelo conhecimento, experiência, dedicação, interajuda e paciência demonstrados ao longo deste meu percurso e, não posso deixar de salientar a motivação constante que a Patrícia me transmitia.

Muito agradecido aos amigos e companheiros de laboratório, João Martins, Joana Margarida, Joel Alves, Maria Barreira, por partilharem comigo todos os momentos, principalmente os mais difíceis, que com a compreensão, grande amizade e motivação permitiram alegrar os dias mais “cinzentos” de laboratório. Agradeço, também, a todos os amigos que esta academia me proporcionou, ao longo destes anos, e estiveram sempre ao meu lado quando foi preciso, eles sabem quem são. Um agradecimento aos restantes amigos e cunhada.

O maior agradecimento vai para os meus pais por acreditarem nas minhas capacidades e possibilitarem a conclusão desta etapa. A eles e ao meu irmão, agradeço o amor, o carinho, a compreensão, a dedicação, sempre incondicional, o apoio, a motivação nesta etapa, que muitas vezes, parecia inatingível. Não posso deixar de dizer umas palavras de apreço para os meus avós, tios e primos que me acompanharam com palavras de afeto e amor neste percurso.

Por último, mas não menos importante, um especial agradecimento à minha namorada Sofia pela paciência e compreensão, nos momentos de “mau humor”, e as palavras inspiradoras e motivacionais proferidas nas horas e momentos difíceis, sem nunca duvidar de que era capaz. Muito obrigado pela excelente pessoa que és.

Resumo

Em Portugal estima-se que morrem 350 mulheres por ano com cancro do colo do útero, estando Portugal nos 20 países da Europa com maiores taxas de incidência e mortalidade. Este cancro resulta, geralmente, da infeção pelo vírus do papiloma humano e é a quarta causa de morte, nas mulheres, a nível mundial. A sua progressão resulta da expressão das oncoproteínas E6 e E7, sendo estas capazes de alterar o ciclo celular, interagindo com uma grande variedade de proteínas, nomeadamente com o supressor de tumor p53. Esta interação leva à marcação da p53 com a finalidade de ser degradada pelo proteossoma. Uma vez que a sua função é induzir a apoptose das células com danos no Àcido Desoxirribonucleico (ADN) ou que se encontram infetadas, quando esta proteína não é corretamente produzida ou é inibida, deixa de desempenhar as suas funções permitindo assim que ocorra uma proliferação descontrolada das células malignas, dando origem a tumores. Neste sentido, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas como a terapia génica para a entrega de material genético utilizando vetores não virais de base polimérica, descritos como mais seguros e eficientes, surge como uma alternativa promissora para a terapia do cancro do colo do útero, tendo como objetivo a reposição dos níveis normais de p53 nas células cancerígenas, induzindo a apoptose das mesmas. Para além disto, e tendo em conta os avanços clínicos em terapia do cancro descritos na literatura, a conjugação da terapia génica com a quimioterapia traz inúmeros benefícios. Assim, o foco deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de entrega capaz de incorporar em simultâneo um ADN plasmídico (pADN) e uma droga anti-cancerígena, metotrexato (MTX). O MTX é um fármaco que, não só permite conferir direcionamento e seletividade ao veículo de entrega pelas células cancerígenas, como também apresenta atividade quimioterapêutica, complementando assim o efeito terapêutico pretendido.

O polímero de polietilenimina (PEI) foi escolhido para a formulação dos sistemas que possam condensar e encapsular o pADN em poliplexos. Foi estudado o efeito do peso molecular e da arquitetura do polímero nas propriedades dos complexos PEI/pADN (nomeadamente a morfologia, tamanho, potencial zeta, taxa de encapsulação de pADN e citotoxicidade). Os resultados demonstram uma variação nas características das nanopartículas com o peso molecular e arquitetura do polímero, mas principalmente com o rácio N/P utilizado para cada sistema. O estudo de screening realizado permitiu desenvolver poliplexos biocompatíveis, com morfologia, tamanho e carga superficial adequados para a incorporação de pADN e MTX, com vista à sua entrega direcionada a células tumorais do colo do útero. Os resultados obtidos foram promissores e incentivam à futura realização de testes *in vitro* de transfeção celular.

Palavras chave

MTX; pADN; PEI; Poliplexos; Terapia génica;

Abstract

In Portugal, it is estimated that 350 women die each year with cervical cancer, being Portugal one of 20 countries of Europe with the highest incidence and mortality rates.

This cancer is usually the result of human papilloma virus (HPV) infection and it is the fourth leading cause of death in women worldwide. Its progression results from the expression of HPV E6 and E7 oncoproteins, which are capable of altering the cell cycle, interacting with a wide variety of proteins, namely with the p53 tumor suppressor. This interaction leads to the labeling of p53 for the purpose of being degraded by the proteasome. Since its function is to induce infected cells or with DNA damage in apoptosis, it stops performing its function, leading to the uncontrolled proliferation of the malignant cells, causing tumors. In this sense, gene therapy, using of safe and efficient polymer-based non-viral delivery vectors of gene material, appears as a promising alternative for the therapy of cervical cancer with the aim of restoring normal levels of p53 in the target cells. Furthermore, considering the clinical advances in cancer therapy described in the literature, the combination of gene therapy with chemotherapy brings numerous benefits. Thus, the main goal of this work was the development of a delivery system capable of simultaneously incorporating plasmid DNA (pDNA) and an anti-cancer drug, methotrexate (MTX). MTX is a drug that not only allows to give targeting and selectivity to the delivery vehicle, but also has chemotherapeutic activity complementing the intended therapeutic effect.

The use of polyethyleneimine (PEI) was the strategy chosen to condense and encapsulate the pDNA into polyplexes. The effect of molecular weight and polymer architecture on the properties (morphology, size, zeta potential, pDNA encapsulation rate and cytotoxicity) of the PEI/pDNA complexes, was studied. The results demonstrate a variation in the characteristics of the nanoparticles with the molecular weight and architecture of the polymer, but mainly with the N/P ratio used for each system. The screening study allowed the development of biocompatible polyplexes with morphology, size and surface loading suitable for the incorporation of pDNA and MTX, directed at its delivery to tumor cells of the cervix. The results obtained were promising and encouraged *in vitro* cell transfection tests.

Keywords

Gene therapy; MTX; pADN; PEI; polyplexes;.

Índice geral

1.	Introdução	1
1.1.	O vírus do papiloma humano (VPH), estrutura e organização do genoma	1
1.2.	Da infecção com o vírus ao desenvolvimento do cancro do colo do útero.....	3
1.3.	O Cancro.....	4
1.4.	Cancro do colo do útero.....	5
1.5.	Classificação citológica do colo do útero	6
1.6.	Epidemiologia do cancro do colo do útero pela infecção do VPH.....	8
1.7.	Manifestações clínicas	11
1.8.	Comportamentos de risco e estratégias de prevenção	11
1.9.	Terapia Génica	12
1.9.1.	Utilização de vetores na Terapia Génica	14
1.9.1.1.	Vetores Virais	15
1.9.1.2.	Vetores Não-Virais	15
1.9.2.	Polímeros Catiónicos.....	17
1.9.2.1	Polietilenimina (PEI)	18
1.9.3.	Metotrexato (MTX)	21
2.	Objetivos	23
3.	Materiais e métodos	24
3.1.	Materiais	24
3.2.	Métodos.....	24
3.2.1.	Condições de crescimento bacteriano.....	24
3.2.2.	Lise alcalina	24
3.2.3.	Eletroforese em gel de agarose	25
3.2.4.	Síntese de nanopartículas	25
3.2.5.	Eficiência de encapsulação.....	26
3.2.6.	Tamanho e potencial zeta (ζ) das nanopartículas.....	26
3.2.7.	Morfologia das nanopartículas	26
3.2.8.	Ensaio de citotoxicidade	27
3.2.9.	Adição do fármaco MTX.....	27
4.	Resultados.....	29
4.1.	Metodologia de adição do polímero.....	29
4.2.	Condições de pH	31
4.3.	Complexos PEI/ADN	32

4.3.1.	Complexos IPEI/ADN	32
4.3.2.	Complexos bPEI/ADN	34
4.4.	Tamanho dos complexos.....	36
4.5.	Morfologia dos complexos	38
4.6.	Ensaio de citotoxicidade	39
4.7.	Adição do fármaco metotrexato (MTX)	40
5.	Discussão	42
6.	Conclusões e perspectivas futuras	45
7.	Referências Bibliográficas.....	47

Índice de figuras

Figura 1: Representação do vírus do papiloma humano	1
Figura 2: Representação esquemática do genoma do VPH indicando a disposição da região “early”, região “late” e a região não codificante, URR.....	2
Figura 3: Atuação das oncoproteínas do VPH nos supressores de tumor das células hospedeiras...4	
Figura 4: Representação da anatomia pélvica do sexo feminino.	5
Figura 5: Taxa de mortalidade e incidência na população feminina, compreendida entre 0-50 anos de idade, do cancro do colo do útero mundialmente em 2012.	9
Figura 6: Casos de infeção por VPH, setembro de 2014-dezembro de 2016, segundo o INSA	9
Figura 7: Prevalência da infeção por VPH de fevereiro de 2008 e março de 2009, em função da idade em Portugal.....	10
Figura 8: Ensaios clínicos aprovados mundialmente recorrendo à terapia génica de 1989 a 2016.....	13
Figura 9: Utilização da terapia génica nas diversas patologias e respetivas percentagens.....	13
Figura 10: Vetores usados em ensaios clínicos na terapia génica e respetivas percentagens de utilização	14
Figura 11: Lipossomas (vesículas constituídas por lípidos catiónicos) complexam com o ADN e formam lipoplexos	17
Figura 12: Formação e transfeção dos polioplexos.....	18
Figura 13: Estruturas químicas do PEI	19
Figura 14: <i>Proton Sponge Effect</i>	20
Figura 15: Representação da estrutura do ácido fólico e metotrexato	22
Figura 16: Imagens de SEM para o método <i>Drop by drop</i> , (painel A), <i>Mixing</i> (painel B) e <i>Dropping</i> (painel C) para rácio de N/P=1 utilizando o polímero lPEI de 2,5 kDa.	30
Figura 17: Eletroforese em gel de agarose, em triplicado, para rácios 0,5; 1; 2,5; 5. Painel A: o polímero linear de 2,5 kDa. Painel B: o polímero linear de 8,0 kDa.....	33
Figura 18: Percentagem de encapsulação de ADN (%EE) vs do rácio N/P para o polímero linear de 2,5 e 8,0 kDa.	33
Figura 19: Potencial zeta vs rácio N/P para o polímero linear de 2,5 e 8,0 kDa.	33
Figura 20: Painel A: Eletroforese em gel de agarose, para rácios 0,1; 0,5; 0,8; 1; 2; 2,25; 2,5; 2,75; Para o polímero ramificado de 0,8 kDa. Painel B: Eletroforese em gel de agarose, em triplicado, para rácios 0,1; 0,8; 1; 5; 10; para o polímero ramificado de 1,3 kDa.	35
Figura 21: Percentagem de encapsulação de ADN (%EE) vs do rácio N/P para o para o polímero ramificado de 0,8 e 1,3 kDa.	36
Figura 22: Potencial zeta vs rácio N/P para o polímero ramificado de 0,8 e 1,3 kDa.	36
Figura 23: Tamanhos dos complexos PEI/ADN formados, com os diferentes polímeros em estudo, para diferentes rácios.	37

Figura 24: Imagem SEM dos complexos formados com o polímero linear 2,5 kDa, no painel A utilizando um rácio N/P=2 e no painel B um rácio de N/P=6 e, imagens dos complexos formados com o polímero ramificado 1,3 kDa, onde no painel C foi utilizado um rácio N/P=2,25 e no painel D um rácio N/P=2,5..... 38

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação das NIC	7
Tabela 2: Percentagem de encapsulação de ADN para rácio N/P=0,5 e N/P=1, utilizando o polímero lPEI de 2,5 kDa, de acordo com os diferentes métodos de adição do agente condensante (<i>Drop by drop, Mixing e Dropping</i>).	29
Tabela 3: Percentagem de encapsulação de ADN para rácio N/P=2, 2,25 e 2,5 com a formação dos complexos a diferentes condições de pH (4.5, 6 e 8).	31
Tabela 4: Percentagem de encapsulação e potencial zeta (Média ± Desvio Padrão) para cada polímero linear (2,5 e 8,0 kDa) de acordo com o rácio praticado de N/P.	32
Tabela 5: Percentagem de encapsulação e potencial zeta (Média ± Desvio Padrão) para cada polímero de acordo com o rácio praticado de N/P. À esquerda: polímero ramificado de peso molecular de 0,8 kDa. À direita: polímero ramificado de peso molecular de 1,3 kDa. .	35
Tabela 6: Tamanhos dos complexos PEI/ADN formados, com os diferentes polímeros em estudo, para diferentes rácios.	37
Tabela 7: Viabilidade celular, às 72 h, em células de fibroblastos para os diferentes polímeros (lineares de 2,5 e 8,0 kDa e ramificados de 0,8 e 1,3 kDa) para diferentes rácios: 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 8; 10; 15; 20. Os valores foram calculados para os dados obtidos com 3 medições independentes.....	39
Tabela 8: Percentagem de eficiência de encapsulação de pADN e de MTX (concentrações de 2, 4 e 6 µg/mL), utilizando o polímero bPEI de 1,3 kDa com rácio N/P de 2,25 e 2,5, recorrendo ao método A.	40
Tabela 9: Percentagem de eficiência de encapsulação de ADN e de MTX, com concentrações de 2, 4 e 6 µg/mL, utilizando o polímero bPEI de 1,3 kDa com rácio N/P de 2,25 e 2,5, recorrendo ao método B.	40

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico
ARN: Ácido Ribonucleico
ATPase: Adenosinatrifosfatases
bPEI: Polietilenimina ramificada
CCU: Cancro do Colo do Útero
CDKIs: Inibidores de Cinases dependentes de Ciclinas
CIC: Carcinoma invasivo cervical
CIN: Neoplasia Intraepitelial Cervical
CIS: Carcinoma *in situ*
Cl: Cloro
CO₂: Dióxido de Carbono
DO₆₀₀: Densidade Ótica a 600 nm
DP: Desvio padrão
E. coli: *Escherichia coli*
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl: Ácido clorídrico
HLIS: Lesões Intraepiteliais de alto grau
IARC: Agência Internacional de Investigação Cancro
INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
IST: Infeções sexualmente transmissíveis
kDa: quilo dalton
LPEI: Polietilenimina linear
LLIS: Lesões Intraepiteliais de baixo grau
MTT: Brometo de (3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio)
MTX: Metotrexato
NaH₂PO₄: Dihidrogenofosfato de sódio
Na₂HPO₄: Hidrogenofosfato disódico
ORF: *Open Reading Frames*
PEI: Polietilenimina
pADN: ADN plasmídico
PAMAM: poliamidoamina
PDMAEMA: poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato]
PLL: poli(L-lisina)
PNV: Plano Nacional de Vacinação
pRB: Proteína Retinoblastoma
PBAE: poli(β-amino éster)
SEM: Microscopia Eletrónica de Varrimento

LIS: Lesões Intraepiteliais

URR: *Upstream Regulatory Region*

UV: Ultra-violeta

VPH: Vírus do Papiloma Humano

°C : Graus Celsius

1. Introdução

1.1. O vírus do papiloma humano (VPH), estrutura e organização do genoma

O Vírus do Papiloma Humano (VPH) é constituído por ADN (Ácido desoxirribonucleico) de cadeia dupla com cerca de 8000 pares de bases, envolvida numa cápside icosaédrica com 72 capsómeros, constituída por duas moléculas proteicas (L1 e L2), representado na figura 1 (Muñoz et al., 2003).

Todos os tipos de VPH codificam 8 “*open reading frames*” (ORF), sequências que codificam as proteínas numa primeira fase, “*early*” e numa fase tardia, “*late*”. A região “*early*” contém os genes E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e a região “*late*” compreende a L1 e a L2. A L1 inclui 80% da proteína viral total e a L2 é um elemento em minoria (Muñoz *et al.*, 2003). Ambas são responsáveis por sintetizar proteínas da cápside viral (Fernando, 2012; Thierry, 1993), como apresentado na figura 2. A região não codificante, URR (*upstream regulatory region*) inclui a origem de replicação, elementos promotores e sequências que auxiliam a replicação do vírus (Fernando, 2012).

De acordo com as suas funções, as ORF são associadas em: E1 e E2 que são responsáveis pela regulação da replicação viral; em E3 e E4, que têm como função codificar proteínas cujo objetivo é a destruição do citoesqueleto celular; E5, que estimula a proliferação celular; E6 que é responsável por degradar o gene supressor de tumor p53 do hospedeiro e E7 que inativa o gene supressor de tumor pRb do hospedeiro (Finnen, et al., 2003; Pfister et al., 1991).

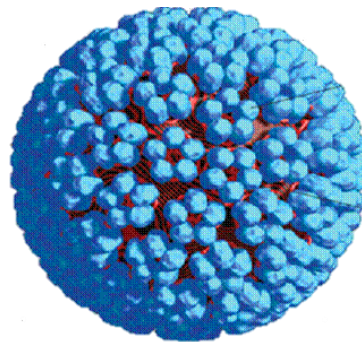


Figura 1: Representação do vírus do papiloma humano. Fonte: <http://removewartsfast.com/complete-guide-hpv-warts>. Acedido em 26-05-2017.

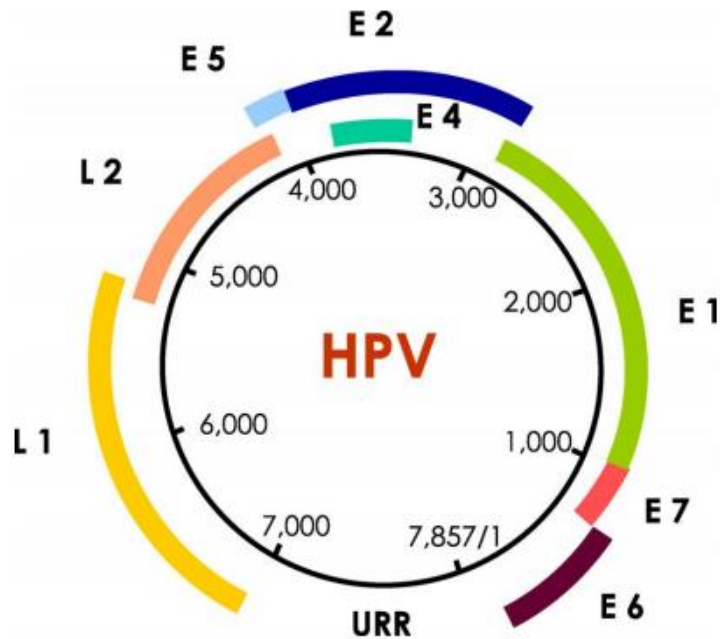


Figura 2: Representação esquemática do genoma do VPH indicando a disposição da região “early”, região “late” e a região não codificante, URR. Fonte: *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine* (2006).

O VPH é capaz de infetar vários tecidos epiteliais, pode replicar-se nas camadas estratificadas da pele e mucosas e causar lesões benignas como as verrugas e papilomas (Evander et al., 1997). É transmitido sexualmente e entra nas células epiteliais através da integrina $\alpha 6$ que atua como um recetor para a entrada do vírus (Li et al., 2005).

Existem cerca de 200 tipos de VPH dos quais cerca de 40 infetam o trato anogenital, como a vagina, vulva, colo do útero, pênis e zonas perianais (Ventura et al., 2008). Os vírus de “baixo risco” correspondem às estirpes menos perigosas e estão na origem da formação de verrugas genitais e lesões da orofaringe, (Lyon et al., 2007). Os genótipos de vírus de “alto risco” são responsáveis por cerca de 99,7% dos casos de cancro do colo do útero, sendo os mais comuns os genótipos VPH 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 (Fernandes et al., 2013; Rocha et al., 2017). Nomeadamente, os genótipos VPH 16 e 18 apresentam um potencial oncogénico mais elevado, representando 70 a 75% de todos os cancros cervicais (Lorincz et al., 1992). O VPH 16 é um tipo de vírus com maior prevalência nos carcinomas epidermóides e o VPH 18 nos adenocarcinomas do colo do útero. Assim, o VPH é considerado o mais agressivo, devido à sua fácil integração no genoma da célula epitelial hospedeira, e pela habilidade que as suas oncoproteínas E6 e E7 possuem de inibir as proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb, que desempenham funções cruciais no controlo da proliferação e divisão celular (Bulk et al., 2006; Fernando, 2012).

1.2. Da infecção com o vírus ao desenvolvimento do cancro do colo do útero

A infecção pelo VPH surge, maioritariamente, por transmissão sexual, iniciando-se na camada basal do epitélio do colo do útero, tendo como possível origem a perda da integridade da mucosa do colo do útero ou outras lesões causadas neste órgão (Doorbar, 2006).

Tal como já mencionado, a entrada do vírus nas células epiteliais é via integrina $\alpha 6$; assim sendo a infecção do epitélio genital inicia-se após penetração dos viriões nas células basais do epitélio pavimentoso do colo do útero que, através de pequenas fissuras ou traumatismos, levam à perda da integridade da mucosa (Doorbar, 2006; Fehrmann et al., 2003; Ganguly et al., 2009; Grm et al., 2009; Stanley, 2009). O ciclo de infecção pelo VPH compreende as seguintes etapas: 1) Infecção, 2) Manutenção do genoma, 3) Fase proliferativa, 4) Amplificação genómica e 5) Síntese e libertação de novas partículas virais (Doorbar, 2005). Inicialmente, os genes “early” são expressos e dá-se a replicação do genoma do VPH sob a forma episossomal, na maioria dos casos, dando-se a proliferação de células infetadas. Seguidamente, ocorre a montagem da cápside, após expressão dos genes L1 e L2 nas camadas superficiais do epitélio, formando-se as partículas virais VPH que após serem libertadas, estão aptas para nova infecção (Woodman et al., 2007). A velocidade de proliferação das células infetadas diferencia a gravidade das lesões, classificando-as de lesões de baixo grau, como a Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC1), as lesões de alto grau, NIC 2 e 3, e cancro com origem em vírus de alto risco oncogénico (Doorbar, 2005; Snijders et al., 2006).

O potencial oncogénico do vírus é diretamente proporcional à expressão dos genes E6 e E7, cujos produtos vão interagir com uma variedade de proteínas que regulam o ciclo celular codificadas por genes supressores de tumor, como se exemplifica na figura 3 (Ferraz et al., 2012).

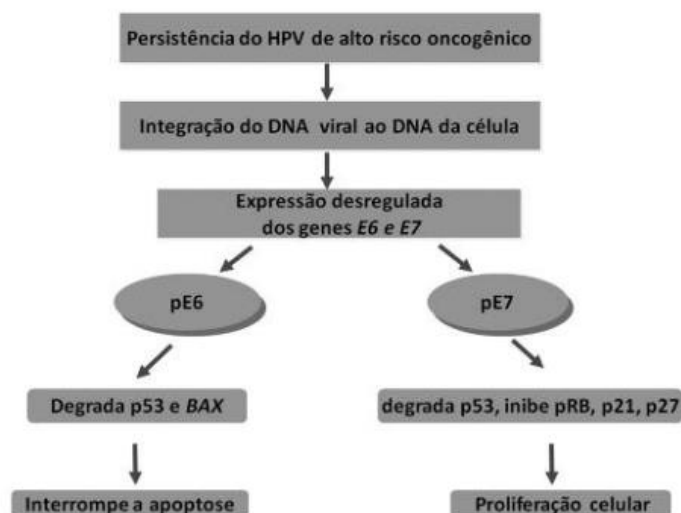


Figura 3: Atuação das oncoproteínas do VPH nos supressores de tumor das células hospedeiras.
Fonte: Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos, Journal of the Health Sciences Institute (2012).

Mais detalhadamente, a oncoproteína E7 atua como inibidor da atividade da pRb, cujo papel é fundamental na manutenção da célula em fase G1 do ciclo celular formando complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. A oncoproteína E7 vai impedir a formação do complexo pRb-E2F, e quando este fator de transcrição se encontra livre vai desencadear o processo de replicação do ADN e dar continuidade ao ciclo celular. A oncoproteína E7 pode ligar-se ainda aos Inibidores de Cinasas dependentes de Ciclinas (CDKIs), p21 e p27, impedindo o controlo do ciclo celular em diversos pontos de verificação (Ferraz et al., 2012; Ganguly et al., 2009; Klaes et al., 2001). Além de intervir no controlo do ciclo celular, a oncoproteína E7 bem como a oncoproteína E6, interferem na apoptose, pois, são capazes de se ligar à p53 marcando-a para posterior degradação pelo proteossoma (Ganguly et al., 2009). Está também descrito que a proteína E6 se encontra envolvida na degradação da proteína BAX em queratinócitos humanos, proteína esta que é previamente ativada pela p53 e vai estar envolvida no mecanismo de indução da apoptose em células cujo ADN sofreu danos irreversíveis (Ferraz et al., 2012; Ganguly et al., 2009). O gene p53 é primordial para impedir a transformação neoplásica recorrendo a 3 mecanismos: 1) Em caso de ADN alterado em células, ele interrompe o ciclo celular, 2) Repara o ADN e 3) por último, caso não tenha sido possível reparar o ADN, provoca a morte programada das células (apoptose) (Ferraz et al., 2012).

O facto de a viabilidade e integridade do ADN replicado estar comprometida por degradação/inibição de proteínas essenciais ao controlo do ciclo celular leva a que ocorra uma proliferação anormal e descontrolada das células, provocando o desenvolvimento do tumor.

1.3. O Cancro

O cancro, atualmente, é considerado uma das principais causas de morte em todo o mundo. Apresentando ainda, um grande impacto no que diz respeito à incapacidade e aos cuidados hospitalares. Assim, as doenças oncológicas, consideradas como a grande epidemia dos últimos anos pelo facto da elevada morbilidade e elevadas taxas de mortalidade, é uma das principais prioridades das políticas de saúde em Portugal (Jemal et al., 1999).

Geralmente, o cancro tem origem numa única célula, cujos mecanismos de controlo do ciclo celular e apoptose deixaram de atuar, resultando num crescimento descontrolado e proliferação dessas células malignas. Com este contínuo crescimento desequilibrado, as células cancerígenas multiplicam-se e dão origem a uma massa de tecido, intitulada de

tumor, podendo invadir e causar a destruição de tecidos contíguos normais (Macedo et al., 2008).

A biópsia é o exame clínico adequado para a confirmação do diagnóstico de uma lesão tumoral, permitindo a classificação de algum tipo de tumor maligno e as suas características, conforme o tipo de células envolvidas. O cancro pode ser considerado carcinoma se as células forem epiteliais e 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 cancerígenas entrarem na corrente sanguínea, podendo ser denominado por cancro de sangue, ou então melanomas que têm origem em células da pele. Existem ainda, tumores do sistema nervoso central, do cérebro e espinal medula, como é o caso por exemplo dos glioblastomas (Fernando, 2012; ICO, 2017).

1.4. Cancro do colo do útero

O útero é o órgão em forma de pera onde cresce o feto. O colo do útero é a porção inferior mais estreita do útero (Seeley et al., 2001), como apresentado na figura 4.

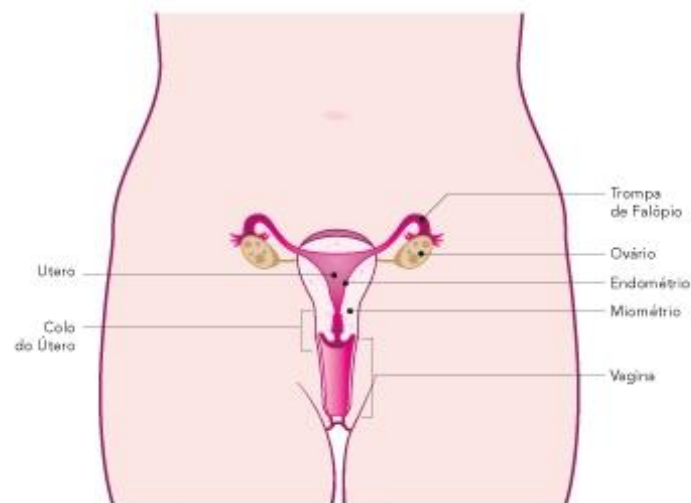


Figura 4: Representação da anatomia pélvica do sexo feminino. Fonte: <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-colo-do-utero/o-orgao>. Acedido em: 17-06-2017.

Cerca de 70 a 75% dos cancros do colo do útero (CCU) são carcinomas epidermoides que são localmente invasivos e requerem a excisão cirúrgica. Este tipo de cancro também pode ser denominado de carcinoma escamoso, malpighiano ou espinho-celular, quando a origem ocorre no epitélio escamoso pluriestratificado do exocolo (caracterizado na sua maioria por células

grandes que podem ser queratinizantes ou não queratinizantes). Também podem ocorrer raros carcinomas verrucosos com aspeto “couve-flor”. Por último, outro tipo de carcinoma epidermoide raro é o carcinoma papilar, tumor de células de transição da bexiga (Robert et al., 1990). Os restantes cancros que podem surgir no colo do útero são vários tipos de adenocarcinomas (15 a 25%), que se desenvolvem nas células glandulares do endocolo. Também existem outros tumores epiteliais, tais como, os carcinomas adenoescamosos (3 a 5%), que neste caso, estão associados a um componente epidermoide e glandular maligno. Os carcinomas vítreos têm um comportamento biológico muito agressivo, sendo tumores radioresistentes.

Os carcinomas de pequenas células, são outro grupo raro e heterogéneo de cancros do colo do útero, extremamente agressivos que geralmente, promovem metastização precoce para órgãos como o cérebro, fígado e ossos, sendo necessário recorrer a quimioterapia e/ou radioterapia.

Para finalizar, os tumores secundários, também são raros mas têm probabilidade de extensão direta para o colo do útero através de um tumor primitivo do endométrio do reto ou bexiga (Hoskins et al., 2003).

Conclui-se, assim, que os adenocarcinomas são habitualmente considerados mais radioresistentes, mostrando um pior prognóstico da doença em comparação aos carcinomas epidermoides (Landoni et al., 1997).

1.5. Classificação citológica do colo do útero

A infeção pelo vírus VPH provoca alterações morfológicas nas células do colo do útero que podem ser observadas através de um exame médico designado por citologia, permitindo assim avaliar o aspeto das células, o seu crescimento e a sua função, de modo a classificar estas lesões. Como já mencionado, os carcinomas epidermoides, são o resultado da progressão de estádios não invasivos. Assim, estas lesões de pré-malignidade podem ser classificadas através de diversos sistemas (ICO, 2017):

- **Citologia normal (Negativa para lesão intraepitelial maligna)** - quando o resultado do exame indica que as células do colo do útero não apresentarem qualquer anomalia.
- **Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) / Lesões intraepiteliais (LIS)** - quando o resultado do exame indica que existem lesões cervicais pré-malignas. Estas lesões foram designadas por Reagan em 1953, por displasias malpighianas e carcinoma *in situ* (CIS). Também foram classificadas em três estádios por Richart em 1967 e em dois estádios por Bethesda em 1988, de acordo com a tabela1.

Tabela 1: Classificação das NIC. *Origem: Mota, F. (2012). Compêndio de Ginecologia Oncológico. (pp.34 Lidel, Ed.). Lisboa-Porto.*

Classificação das neoplasias intraepiteliais cervicais e suas interrelações		
REAGAN (1953)	RICHART (1967)	BETHESDA (1988)
Displasia ligeira	NIC 1	LLIS
Displasia moderada	NIC 2	HLIS
Displasia grave	NIC 3	
Carcinoma <i>in situ</i>		

O sistema de Richart refere que os três estádios são definidos de acordo com a proporção da espessura do epitélio malpighiano com diferenciação celular anormal, evidenciada quer por alterações da maturação e estratificação celular, quer pela atipia citológica. O sistema de Bethesda é utilizado para classificar esfregaços citológicos cervicais, propondo a terminologia LIS (lesões intraepiteliais escamosas) de baixo (*low*) e de alto (*high*) grau. Como está apresentado na tabela anterior, as lesões de baixo grau (LLIS) englobam a coilocitose e/ou a NIC 1, e as lesões de alto grau (HLIS) incluem a NIC 2 e/ou a NIC 3 (Solomon, 1989).

Os critérios histopatológicos implícitos à classificação NIC/LIS, representados seguidamente, são fundamentados na maturação celular, polaridade e organização das células, figuras nucleares e atividade mitótica das lesões (ICO, 2017):

- **Lesões de baixo grau do colo do útero (NIC-1/ LLIS):** os núcleos deste tipo de células encontram-se geralmente arredondados ou ovais e ligeiramente irregulares quanto ao tamanho e forma, e com o progredir da patologia estes tornam-se mais irregulares e ocupam a metade superior do epitélio. As figuras de mitose para além de terem uma morfologia normal são pouco numerosas e restringem-se ao terço inferior do epitélio.
- **Lesões de alto grau do colo do útero (HLIS/ NIC 2 / NIC 3/ CIS):** o número de figuras mitóticas aumenta e alongam-se às camadas superiores do epitélio, aparecendo formas anormais. Estas lesões são denominadas por displasia moderada ou severa, HLIS, NIC-2, NIC-3 ou carcinoma cervical *in situ* (CIS) porque estas células têm potencial para se tornarem em células cancerígenas e invadirem tecidos mais profundos do colo do útero.

- **Carcinoma *in situ* (CIS):** é utilizado para indicar que as células cancerígenas ainda não invadiram outros tecidos, ou seja, que ainda não houve ruptura da membrana basal do epitélio. Neste estágio as células são designadas de células pré-cancerígenas.
- **Carcinoma invasivo cervical (CIC):** nesta fase as células pré-cancerígenas invadem tecidos mais profundos do colo do útero ou outros tecidos ou órgãos. Deste tipo de carcinoma invasivo, fazem parte o carcinoma espinocelular composto por células com semelhança às células do epitélio escamoso e o adenocarcinoma com composição de células glandulares.

Com o desuso da antiga terminologia (displasia e carcinoma *in situ*), a adoção do sistema de Bethesda contribuiu para melhorar a reprodutibilidade do diagnóstico das lesões de NIC e para a evolução da doença, nomeadamente para as implicações terapêuticas. Demonstrou-se que a NIC 1 está associada tanto como VPH de baixo risco como de alto risco, enquanto as NIC 2 e 3 estão mais relacionadas com VPH de alto risco (Lorincz et al., 1992).

1.6. Epidemiologia do cancro do colo do útero pela infeção do VPH

A infeção pelo vírus do papiloma humano, constitui um grande problema para a saúde pública devido à taxa de morbilidade e mortalidade elevada da população feminina, após o início da atividade sexual, sendo a infeção genital pelo VPH a doença mais sexualmente transmissível, verificando-se este aumento com maior incidência nos países pouco desenvolvidos, figura 5 (Burchel et al., 2006; Rocha et al., 2017).

Estima-se que existam cerca de 528.000 novos casos de cancro derivados da infeção pelo VPH, por ano a nível mundial, sendo o cancro do colo do útero o quarto cancro mais comum (Ferlay et al., 2010, 2015).

Em Portugal, a incidência é de 12,2 novos casos de cancro do colo do útero e a mortalidade é de 3,6 óbitos por 100.000 mulheres, ou seja, 350 portuguesas morrem com cancro do colo do útero por ano (Ferlay et al., 2010). Segundo um estudo recente realizado pelo Laboratório do Vírus do Papiloma Humano da Unidade de Infeções Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), de setembro de 2014 a dezembro de 2016, com uma amostra de 152 mulheres vacinadas contra a infeção por VPH e com atividade sexualmente ativa, de idade entre os 14 e 30 anos (sendo a média de 21 anos). Desta amostra de mulheres jovens, 43 apresentaram infeção pelo VPH com uma prevalência de 28,3%, figura 6, (Rocha et al., 2017).

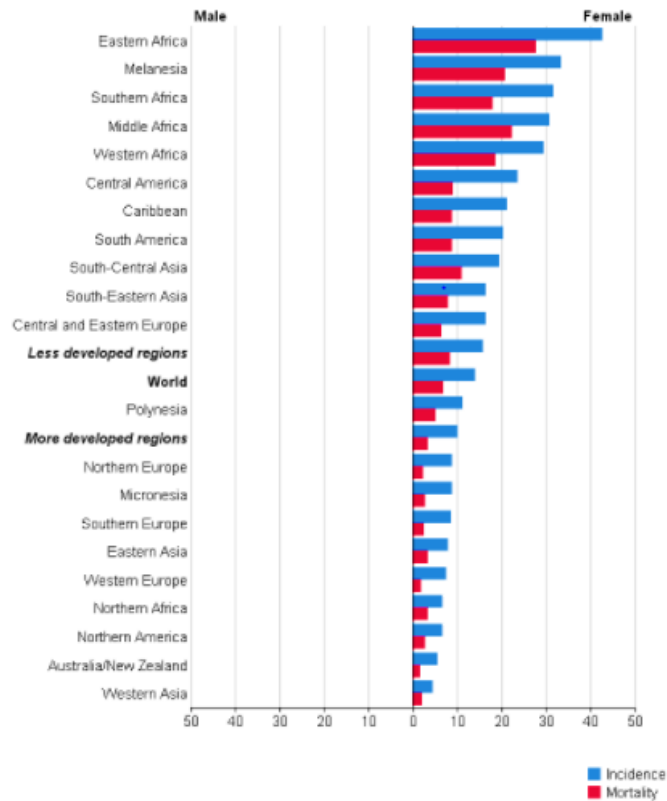


Figura 5: Taxa de mortalidade e incidência na população feminina, compreendida entre 0-50 anos de idade, do cancro do colo do útero mundialmente em 2012. Fonte: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>. Acedido em 20-06-2017.

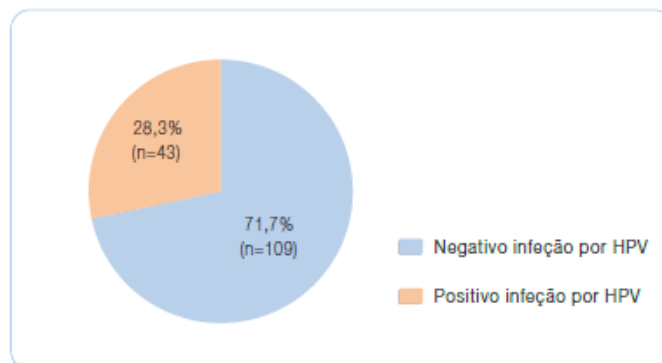


Figura 6: Casos de infeção por VPH, setembro de 2014-dezembro de 2016, segundo o INSA. Fonte: Primeiro estudo em Portugal sobre a identificação dos genótipos do vírus do papiloma humano (VPH). Observações: Boletim Epidemiológico (2017).

É de salientar outro estudo, o estudo Cleopatre, realizado em Portugal de fevereiro de 2008 a março de 2009, que foi realizado com uma amostra de 2326 mulheres com idades compreendidas entre 18 e os 64 anos, revelou que a percentagem mais elevada de

prevalência da infeção genital por VPH (28,8%) atinge o grupo etário entre 20 e 24 anos (figura 7) (Burchel et al., 2006; Pista et al., 2011). Comparando ambos os estudos descritos, a percentagem de casos infetados com o VPH ainda é significativa, estando Portugal situado entre os 20 países da Europa com maiores taxas de incidência e mortalidade por cancro do colo do útero (Ventura et al., 2008). Esta percentagem de casos com cancro seria reduzida se as mulheres fossem vacinadas contra os tipos de VHP de “alto risco” antes da primeira atividade sexual. Atualmente, ficou disponível na Europa a vacina nonavalente, que inclui os genótipos VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58, permitindo um espectro mais alargado de proteção/prevenção contra o aparecimento destes tipos de vírus (Rocha et al., 2017).

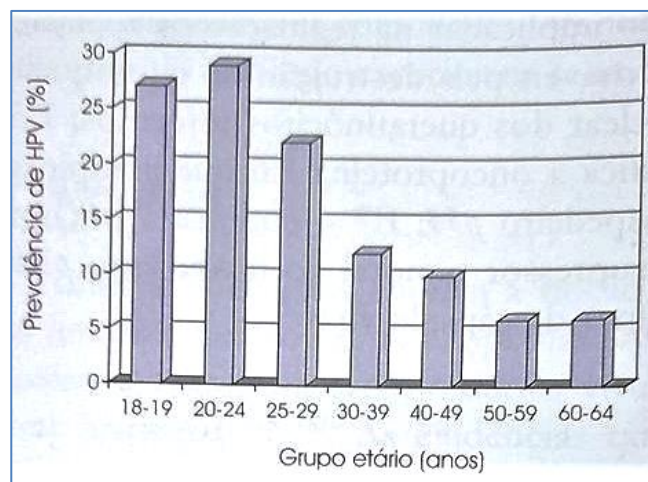


Figura 7: Prevalência da infeção por VPH de fevereiro de 2008 e março de 2009, em função da idade em Portugal. Fonte: Fernando, M. (2012). *Compêndio de Ginecologia Oncológica*. p.38. (Lidel, Ed.). Lisboa-Porto.

Como já referido, as variações de VPH de alto risco incluem os tipos 16 e 18, que de acordo com estimativas, a incidência destes tipos de vírus de alto risco situa-se entre 3 e 25% da população feminina. Este tipo de infeção pode durar vários meses podendo desenvolver lesões precursoras de alto grau ou carcinoma invasivo (Ho et al., 1998). Sendo o VPH 16 o mais prevalente a nível mundial nos cancros do colo do útero (50% a 60%), seguido pelo VPH 18 (10% a 12%), ambos contribuem para mais de metade das infeções detetadas em lesões intraepiteliais de alto grau (Bosch et al., 2003; Muñoz et al., 2003).

1.7. Manifestações clínicas

Clinicamente, o cancro do colo do útero, na fase inicial do seu desenvolvimento, é um tumor assintomático. Porém esta patologia apresenta sintomatologia, como as metrorragias sob a forma de coitorragias, hemorragias intermenstruais ou metrorragias pós-menopausa (Fernando, 2012).

Como já referido, as infeções pelo VPH são muito comuns em mulheres jovens com atividade sexual ativa. O facto de a infeção ser assintomática torna a sua deteção dificultada. Apesar deste facto, tem sido descrito que alguns sintomas poderão evidenciar a possibilidade de infeção pelo vírus, nomeadamente a sensação de prurido, ardor durante o ato sexual, corrimento anormal ou aparecimento de verrugas genitais (Leto et al., 2011).

No caso de infeção avançada, ocorrem manifestações como a leucorreia fétida como consequência da infeção tumoral, desencadeando odor desagradável. A dor pélvica, uropatia obstrutiva, disúria, hematúria ou retrorragias quando existe invasão da bexiga e reto, podendo levar à obstrução das vias urinárias. Outro tipo de sintomas comuns são a astenia, perda de peso e anemia, a ocorrência de lombalgias, dor na região inguinal e nas extremidades inferiores e, edema das extremidades quando existe envolvimento ganglionar (Carter, 2013; Govindappagari et al., 2011).

1.8. Comportamentos de risco e estratégias de prevenção

Em relação aos fatores de risco do cancro do colo do útero, a infeção pelo VPH é muito influente e determinante. Como já foi dito, a transmissão do vírus acontece, principalmente, através da atividade sexual (Barasso et al., 1987). Posteriormente, o vírus acede às células basais do epitélio em áreas de metaplasia cervical imatura ou microtraumatismo. O genoma viral penetra a membrana celular, após a libertação da cápside, sendo transportado até ao núcleo. A divisão das células com capacidade clonogénica acelera a replicação viral. O período de incubação deste vírus ronda, em média, 3 meses (Jenison et al., 1990).

No entanto, a infeção pelo vírus do papiloma humano não é por si só suficiente para o desenvolvimento de cancro do colo do útero. Existem outros co-fatores que simultaneamente influenciam o desenvolvimento deste cancro, tais como: 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 (Fernando, 2012).

A diminuição de ocorrência da infeção por VPH e consequentemente do cancro do colo do útero, só será viável com estratégias de prevenção utilizadas antes de contrair a infeção. Existem várias vacinas convencionais, disponíveis comercialmente, que podem ser usadas

como prevenção primária (Claeys et al., 2008; Merck et al., 2014; Riethmuller et al., 2015). Este ano foi desenvolvida e disponibilizada uma vacina de nove valências (tipos de VHP 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58), que é recomendada pelo Plano Nacional de Vacinação (PNV) em Portugal, e deve ser administrada em duas doses com intervalo de meio ano, às crianças com 10 anos de idade, maximizando assim a imunidade contra a infeção por VPH. A vacinação precoce previne o aparecimento de casos de cancro de colo do útero, diminuindo assim a taxa de incidência e mortalidade no nosso país (Direção Geral da Saúde, 2017).

Outras intervenções recomendadas são a “Educação para a Saúde” (no sentido de promover a saúde e prevenir a doença) sobre as práticas sexuais seguras como a utilização do preservativo, advertência para os perigos do tabaco, que muitas vezes começam na adolescência.

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 para este 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).

1.9. Terapia Génica

Quer a medicina quer a abordagem terapêutica estão em constante evolução, acompanhadas pela intensa investigação que se faz notar em diversas áreas científicas como a biotecnologia e a engenharia genética, tornando a terapia génica uma alternativa promissora para os doentes que sofrem de determinadas patologias. Este crescimento fez-se notar após a descoberta da tecnologia de ADN recombinante, revolucionando a forma de pensar da comunidade científica em relação às doenças (Mulligan, 1993).

O facto da terapia génica tratar ou eliminar as causas das doenças e não os sintomas provocados por estas, como verificado pela maioria das terapias atuais, faz desta metodologia de tratamento uma alternativa aos métodos convencionais e uma esperança para os doentes (Mountain, 2000).

A terapia génica permite entregar/transferir material genético a células específicas, para desta forma, curar a doença ou atenuar o seu processo (Verma et al., 2005). Tem sido descrito que esta nova terapêutica pode ser vantajosa nomeadamente para doenças genéticas hereditárias ou adquiridas, tais como: hemofilia, fibrose cística, distrofia muscular, doenças cardiovasculares, doenças infecciosas e neurológicas e no cancro (Pack et al., 2005).

Apesar de ser uma terapia promissora, muitos obstáculos devem ser ultrapassados. O primeiro ensaio clínico, recorrendo a esta terapia, realizou-se no ano de 1990. Desde então, têm sido efetuados anualmente diversos ensaios clínicos, tal como está representado na figura 8

(Blaese et al., 1995) e com aplicações em diferentes patologias, como se pode ver na figura 9.

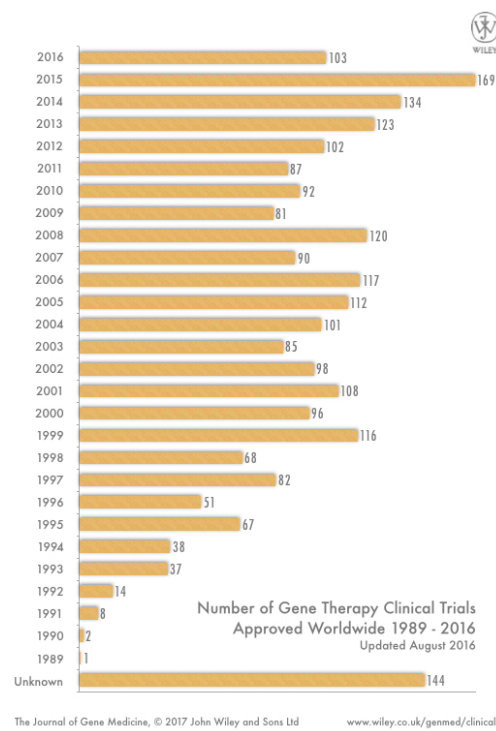


Figura 8: Ensaios clínicos aprovados mundialmente recorrendo à terapia genética de 1989 a 2016.

Fonte: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. Acedido em: 08-07-17.

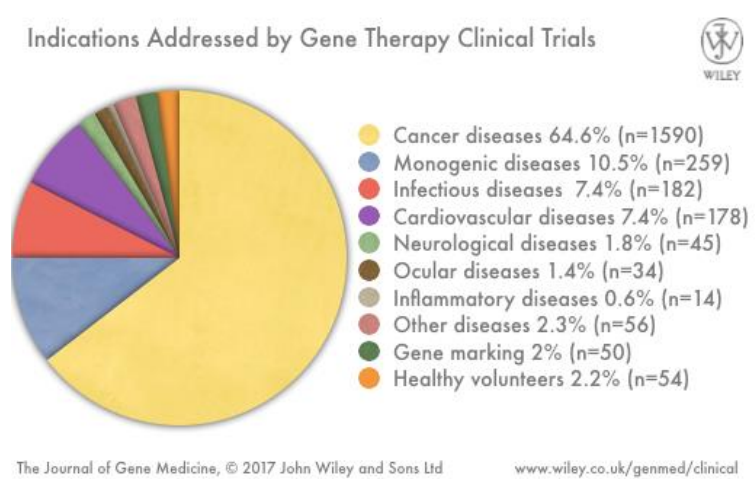


Figura 9: Utilização da terapia génica nas diversas patologias e respetivas percentagens.

Fonte: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. Acedido em: 01/09/2017.

A utilização de agentes terapêuticos como o ADN ou ARN (Ácido Ribonucleico), não é, de todo, trivial. Estes têm de ser estáveis em fluidos biológicos e ultrapassarem inúmeras barreiras biológicas que se interpõem no trajeto até aos seus alvos de atuação, como barreiras celulares (membranas plasmáticas e nucleares), degradação por enzimas citoplasmáticas, via endocítica, sistema imunitário e fenómenos de “clearance”. Devido a estes obstáculos, torna-se primordial a formulação de sistemas de entrega de material genético, para garantir uma transfeção segura e eficaz, sem comprometer a viabilidade do agente terapêutico e garantindo que a entrega ocorre nas células alvo onde se pretende que o material genético vá atuar (Faneca et al., 2013).

1.9.1. Utilização de vetores na Terapia Génica

A designação de vetores é dada aos veículos usados na transferência e transporte de material genético para o interior das células onde após ser descodificado resulta na produção de uma proteína terapêutica, tratando ou inibindo uma determinada patologia. Por exemplo, o uso de ADN plasmídico (pADN) como vetor de entrega de genes tem sido alvo de grande estudo, tendo como objetivo final a expressão de transgenes terapêuticos nas células alvo (Kim et al., 2013; Yue et al., 2013). O principal desafio da terapia génica passa pelo desenvolvimento de um vetor de entrega “ideal” que seja seguro e eficaz (Jones et al., 2013). A figura 10 mostra a diversidade de vetores (virais e não virais) que têm sido aplicados na terapia génica.

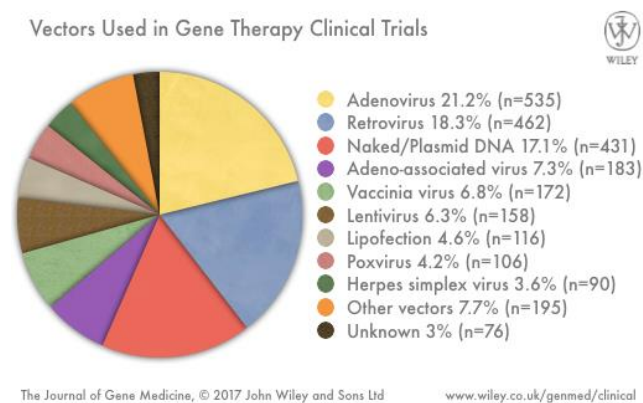


Figura 10: Vetores usados em ensaios clínicos na terapia génica e respetivas percentagens de utilização. Fonte: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. Acedido em: 12/08/17

1.9.1.1. Vetores Virais

Os vetores virais foram os primeiros vetores usados nos estudos de terapia gênica devido à alta eficiência de evasão celular e de transdução e expressão dos genes (Jones et al., 2013). A escolha destes veículos deve-se ao facto dos vírus possuírem mecanismos de infeção naturais e altamente desenvolvidos. No entanto, para a aplicação como vetores de entrega de genes, estes têm de ser manipulados geneticamente para não constituírem riscos para a saúde dos doentes e poderem então introduzir genes de interesse para promover a cura de determinadas doenças (Menck et al., 2007).

Os vetores virais também têm a vantagem de proteger o gene de interesse dentro das suas cápsides impedindo a sua degradação até à internalização nas células-alvo (Giacca et al., 2012). Exemplos destes vetores são: adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, lentivírus, poxvírus, vírus *vaccinia*, e vírus Herpes-simplex, como observado na figura 10 (Chira et al., 2015). Os vírus são divididos em duas categorias: **Não-líticos** - fazendo parte desta categoria os retrovírus e os lentivírus, responsáveis por produzir viriões na membrana celular das células infetadas, e não causam o rebentamento da célula alvo; **Líticos** - como os adenovírus e herpesvírus que, após, se replicarem e libertarem os viriões destroem as células hospedeiras. Na escolha de um vetor viral para entrega de material genético em determinadas células de interesse, essas características são extremamente importantes e ditam quais as opções mais viáveis (Davison et al., 2007).

Apesar das elevadas possibilidades terapêuticas e vantagens destes vetores, estes não são 100% viáveis e apresentam desvantagens/limitações, tais como: a carcinogénese, a imunogenicidade, tecidos inflamados, a impossibilidade de haver uma eliminação de todas as interações não desejadas entre o genoma das células-alvo e o genoma viral, a dificuldade de produção e os elevados custos associados. Assim, devido a estas possibilidades e devido ao facto de, durante o processo de recombinação, o vírus poder reestabelecer a sua capacidade de se proliferar e perder o gene de interesse, os vectores virais constituem um grande risco quando administrados ao doente (Sack et al., 2009; Yin et al., 2014; Zhi et al., 2013).

1.9.1.2. Vetores Não-Virais

Os vetores não-virais são normalmente constituídos por ácidos nucleicos não codificantes (que vão silenciar a expressão de determinados genes) e ácidos nucleicos codificantes (que vão levar à expressão de uma proteína específica).

Estes vetores à base de ácidos nucleicos apresentam características vantajosas, tais como: a baixa imunogenicidade para as células hospedeiras, facilidade de produção em larga escala e administração nos doentes, ilimitada dimensão do transgene a utilizar, não há indução de mutações e, uma vez inserido na célula hospedeira, a expressão do gene de interesse é

controlada pelos sistemas de transcrição e tradução desta, constituindo assim uma alternativa simples e segura à utilização dos vetores virais (Gardlík et al., 2005; Lundstrom et al., 2003; Schatzlein, 2001).

Dos ácidos nucleicos mais estudados, recentemente, o ARN de interferência tem surgido como uma opção para a expressão de transgenes terapêuticos, no entanto o pADN tem sido o mais abordado devido à sua estabilidade (Kim et al., 2013). Os plasmídeos são compostos por ADN circular, que recorrendo a técnicas de ADN recombinante são constituídos pelo gene de interesse, sequências promotoras e indutoras, responsáveis por controlar a expressão desse mesmo gene (Xu et al., 2005).

Mesmo com os recentes avanços tecnológicos, a eficiência de transfeção destes vetores precisa de ser melhorada, bem como a sua capacidade de direcionamento.

Existem diferentes métodos que podem ser usados para a entrega dos vetores não-virais, divididos em duas classes: métodos físicos e métodos químicos. No que diz respeito aos métodos físicos, os cientistas têm aplicado forças físicas, de modo a tentarem aumentar a entrega de genes fazendo parte desta classe métodos como a Eletroporação, Microinjeção e Injeção Hidrodinâmica. Contudo, estes não são uma alternativa viável para aplicação clínica devido à sua ineficiente transfeção e por serem metodologias evasivas e difíceis de atingir determinadas partes do organismo (Faneca et al., 2013). Devido a este facto, os métodos químicos têm surgido como uma alternativa promissora. Estes envolvem essencialmente sistemas/métodos de entrega químicos com componentes catiónicos, tendo sido, ultimamente utilizados lípidos catiónicos, polímeros catiónicos como a polietilenamina (PEI), péptidos ou dextrano e nanopartículas inorgânicas (Al-Dosari et al., 2009).

Os vetores de origem lipídica ou polimérica, uma vez que possuem geralmente cargas positivas, têm capacidade de estabelecer ligações eletrostáticas com os ácidos nucleicos, condensando-os e formando nanopartículas com tamanhos compreendidos entre algumas dezenas a centenas de nanómetros. À semelhança dos vetores virais, estas nanopartículas também conferem proteção aos genes e medeiam a sua entrada na célula alvo. As designações atribuídas aos complexos formados podem diferir tendo em conta a natureza do material usado, tomando a designação de lipoplexos, quando formados com lípidos, ou poliplexos caso sejam formados com polímeros catiónicos (Pack et al., 2005).

Os lipoplexos representados na figura 11, apresentam características menos favoráveis devido à estabilidade e baixa eficiência na entrega do gene de interesse. Tem sido descrito também que estes podem apresentar alguns riscos para a saúde pelo facto de formar *clusters* após administração e têm uma rápida depuração o que pode ostentar alguma toxicidade (Rehman et al., 2013; Yin et al., 2014).

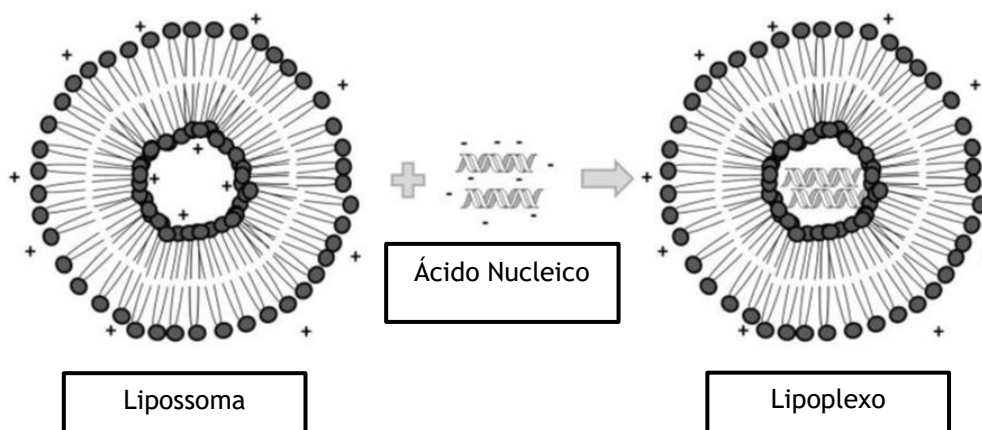


Figura 11: Lipossomas (vesículas constituídas por lípidos catiónicos) complexam com o ADN e formam lipoplexos. Adaptada de: Cordeiro, R. A. Development of non-viral vectors based on poly(B-amino ester) segments for gene delivery. University of Coimbra, Coimbra, 2015.

Por outro lado, os polímeros catiónicos apresentam uma grande diversidade química e capacidade de funcionalização, tornando-se um potencial material para o desenvolvimento de sistemas de entrega de vetores não virais.

1.9.2. Polímeros Catiónicos

Recentemente, a utilização de polímeros catiónicos como vetores de entrega de material genético tem sido alvo de grande investigação, devido ao facto de possuírem propriedades físicas e químicas que podem ser ajustadas, como a arquitetura do polímero, o peso molecular, a composição química e até mesmo a inserção de grupos funcionais que conferem seletividade e direcionamento, aumentando assim a eficiência de transfeção dos genes de interesse. A formulação de sistemas com destes polímeros catiónicos é um processo simples e de elevada estabilidade (Liu et al., 2010).

Os átomos de azoto presentes no polímero são responsáveis por lhe conferir carga positiva, e estes interagem electrostaticamente com os grupos fosfato presentes nos ácidos nucleicos, os quais conferem cargas negativas, formando-se partículas espontaneamente assim que é adicionado o polímero à solução de ácido nucleico. Aos complexos formados é atribuída a designação de poliplexos (Ilarduya et al., 2010).

A formação de complexos com polímeros de elevado tamanho molecular permite proteger e condensar de forma mais eficiente o ADN. O facto de conferirem melhor protecção pode tornar-se um aspeto negativo, pois a libertação do ácido nucleico do complexo é dificultada e

a eficiência da terapia é comprometida, devendo-se evitar a formulação com polímeros de pesos moleculares muito elevados. (Forrest et al., 2002). Na figura 12, podemos observar de uma forma geral a formação e transfeção do ADN usando políplexos.

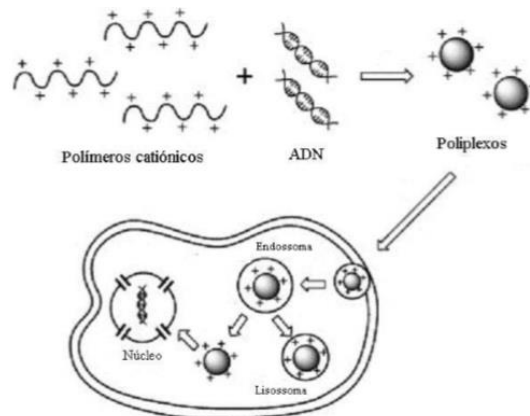


Figura 12: Formação e transfeção dos políplexos. Adaptada de (Lin et al., 2008).

Os polímeros catiónicos podem ter alguma citotoxicidade associada que está diretamente relacionada com o peso molecular e densidade de cargas positivas do agente condensante utilizado, bem como, da sua influência nas membranas celulares (Fischer et al., 2003).

Diversos polímeros têm sido alvo de estudo em ensaios de transfeção, como por exemplo a polietilenimina (PEI), poli(L-lisina) (PLL), poliamidoamina (PAMAM), poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato (PDMAEMA), poli(β-amino éster) (PBAE) e quitosano (Lynn et al., 2000; Pack et al., 2005; Park et al., 2006).

1.9.2.1 Polietilenimina (PEI)

Apesar do primeiro artigo, que demonstrou as capacidades de transfeção do PEI, ter sido publicado há mais de 2 décadas (Boussif et al., 1995), este é considerado, ainda, o “*gold standard*” entre os diversos polímeros catiónicos existentes (Mahato et al., 2013). Inúmeras razões fazem despertar grande interesse neste polímero: 1) o PEI pertence à família de polímeros que são usados como agentes de transferência gênica mais competentes e desenvolvidos até agora; 2) tem capacidade de transfetar diferentes linhas celulares com reprodutibilidade; 3) a formulação de complexos PEI/ADN é muito simples; 4) ao contrário de alguns vetores como péptidos e lípidos, a solução de PEI mantém-se estável durante vários anos e não necessita de condições específicas de armazenamento, podendo mesmo ser armazenado a uma temperatura de 4°C; 5) estes polímeros não são caros e apresentam uma grande diversidade de pesos moleculares e tipo de arquitetura (ramificada ou linear, tal como

se vê na figura 13 e 6) a modificação química destes polímeros é relativamente facilitada devido à presença de vários grupos amina (Larsen et al., 2010; Neuberg et al., 2014).

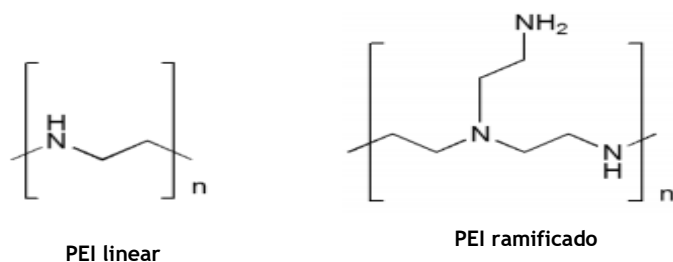


Figura 13: Estruturas químicas do PEI. Adaptada de: (Di Gioia & Conese, 2008)

Como já foi referido, a formulação dos complexos PEI/ADN ocorre por interações eletrostáticas entre as aminas do polímero que apresentam carga positiva e os grupos fosfato do ADN com carga negativa (Tang et al. 1997). O tamanho destes políplexos vai depender do peso molecular e estrutura do PEI utilizado ou da presença ou ausência de sal (Wightman et al., 2001).

O PEI ramificado contém um rácio de 1:2:1 de aminas primárias, secundárias e terciárias, respetivamente, enquanto que, o PEI linear é composto exclusivamente por aminas secundárias (Von Harpe et al., 2000). As aminas primárias são as principais responsáveis pela capacidade de ligação e consequente formação dos complexos PEI/ADN, ou seja, quanto maior o conteúdo de aminas primárias maior a capacidade do polímero condensar o ADN. Estas aminas conferem ainda estabilidade aos complexos formados, o que se irá refletir numa eficiência de transfeção superior (Reschel et al., 2002). As aminas secundárias e terciárias estão envolvidas na disrupção endossomal devido ao seu efeito tampão a valores de pH inferiores ao pH fisiológico (Ahn et al., 2002; Remy et al., 1998).

Neste trabalho foi selecionada a polietilenimina como agente condensante não só devido às razões mencionadas anteriormente neste tópico, mas também, pelo facto de condensar e proteger o ADN, e, ainda coadjuvar a sua saída dos endossomas para o espaço intracelular, aspetos fundamentais para uma entrega eficaz de ADN. Estas características devem-se à elevada densidade de grupos amina que se encontram parcialmente protonadas a pH fisiológico (Boussif et al., 1995; Suh et al., 1994).

Os complexos PEI/ADN formados são absorvidos pela membrana celular, penetrando a célula através de vesículas denominadas de endossomas, através de um dos vários caminhos possíveis: por fagocitose, endocitose dependente de clatrina ou caveolina, endocitose mediada por moléculas de adesão celular e macropinocitose (Bareford et al., 2007; Mishra et al., 2004). Após ocorrer a internalização nas células, o processo de acidificação nos endossomas inicia-se com a captura de protões, por parte das aminas do polímero PEI. A acumulação de protões transportados pela ATPase endossomal é acoplada a um influxo de

ões cloreto que, por sua vez, induz a entrada de água, causando inchaço osmótico e consequente ruptura do endossoma, permitindo que os complexos PEI/ADN escapem para o citosol, como podemos verificar na figura 14. Este fenómeno é denominado de *Proton Sponge Effect* (Boussif et al., 1995).

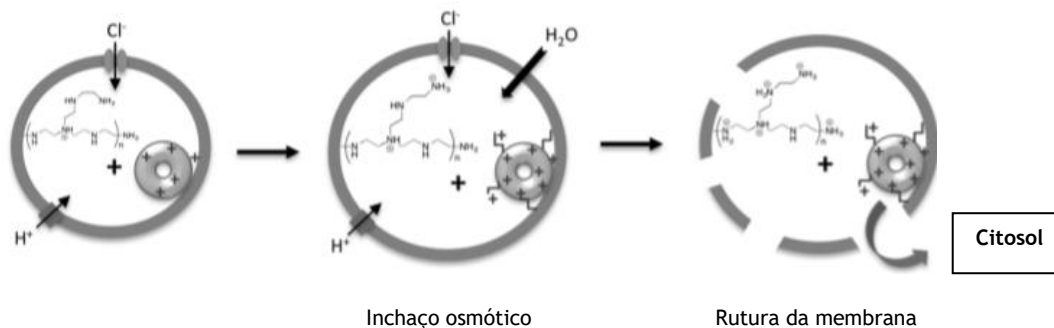


Figura 14: *Proton Sponge Effect*. Adaptada de (Neuberg et al., 2014)

Para que se verifique o efeito anteriormente descrito, são necessárias as seguintes condições: 1) elevada concentração do polímero dentro dos endossomas; 2) capacidade de interação dos políplexos com as membranas e 3) o polímero deve apresentar alguma flexibilidade (capacidade de inchar) (Kang et al., 2011). Uma vez no citosol, o ADN deve manter-se protegido para evitar a degradação pelas nucleases (Lechardeur et al., 1999), tendo este facto sido demonstrado com a utilização de PEI (Pollard et al., 2001). Seguidamente o ADN necessita de ser transportado até ao núcleo. Acerca deste transporte citoplasmático dos complexos, existe pouca informação na literatura, no entanto, estudos recentes reportaram a capacidade do PEI permeabilizar a membrana nuclear (Grandinetti et al., 2012).

Curiosamente, tem sido descrito que, os rácios N/P utilizados comumente na transfeção, entre 6 e 10, apresentam uma grande quantidade de PEI livre (Clamme et al., 2003). Estas moléculas na sua forma livre são responsáveis por causar toxicidade, mas, apesar desse efeito negativo, também têm uma grande influência na eficiência de transfeção dos políplexos (Boeckle et al., 2004; Dai et al., 2011; Yue et al., 2011). Muitos estudos têm sido realizados no que diz respeito aos mecanismos “*uptake*” celular (Gabrielson et al., 2009; Kopatz et al., 2004; Rejman et al., 2005), no entanto, muitas disparidades são encontradas na literatura devido ao facto das condições experimentais variarem quer na formulação das nanopartículas quer no tipo de células utilizado. No geral, vários estudos verificaram que, elevados pesos moleculares de PEI apresentam maiores eficiências de transfeção, no entanto levam a uma maior citotoxicidade devido à alta densidade de carga destes polímeros (Fischer et al., 2003; Fischer et al., 1999; Hong et al., 2006).

Contudo, vários estudos continuam a ser desenvolvidos no sentido de formular complexos com polímeros de PEI de peso molecular mais baixo, objetivando obter elevadas percentagens de

encapsulação de ADN, altas eficiências de transfeção e, contrariamente aos polímeros de elevado peso molecular, apresentarem baixa citotoxicidade.

1.9.3. Metotrexato (MTX)

No que diz respeito à terapia do cancro, o grande desafio para os vetores sintéticos é a entrega direcionada e eficiente ao tecido tumoral (Costa et al., 2015). De modo a conferir maior seletividade e absorção celular dos complexos formados, ou seja, para que estes sejam direcionados de forma eficaz para o alvo terapêutico, diferentes modificações com ligandos têm sido descritas, desde a utilização de anticorpos, fragmentos de anticorpos, pequenas moléculas e péptidos (Allen, 2002; Dohmen et al., 2012). Uma estratégia promissora seria a utilização de um ligando multifuncional com a capacidade de conferir direcionamento às nanopartículas e possuir ainda atividade quimioterapêutica.

Uma molécula que pode apresentar esta dualidade é o metotrexato (MTX), um fármaco que pertence à classe dos agentes terapêuticos antifolatos (Dervieux et al., 2004; Kukowska-Latallo et al., 2005), tendo sido muito utilizado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda e meníngea, tumores trofoblásticos, osteossarcoma, linfomas Burkitt e não-Hodgking, cancro da mama, bexiga, pescoço e ovário. Também é utilizado como um agente imunossupressor em transplante de órgãos e tratamento de doenças autoimunes (artrite reumatóide e psoríase), e asma severa (Allison, 2000; Goodman et al., 2001; Rubino, 2001).

O MTX é um antimetabolito que atua por inibição competitiva da desidrofolato reductase, enzima que reduz o ciclo dihidrofólico a tetrahidrofólico no processo de síntese do ADN e replicação celular. Presentemente, tem sido utilizado em variados protocolos de quimioterapia antineoplásica (Infarmed, 2017). A quimioterapia tem como principal estratégia o tratamento de vários tipos de cancro, com a finalidade de aumentar a qualidade de vida dos doentes, no entanto, tal como as demais terapias, apresentam benefícios mas também inconvenientes (Dietrich et al., 2008), devendo ter uma administração e acompanhamento terapêutico rigorosos carecendo, assim, de serem controlados parâmetros como: a eficácia, tolerância, toxicidade e direcionamento (no sentido de evitar atuar sobre as células saudáveis).

O MTX para além da sua ação terapêutica, é um antifolato, ou seja, um análogo ao ácido fólico com pequenas variações na estrutura, consistindo na substituição do grupo hidroxilo por um grupo amina no carbono C₂ e uma metilação no N₁₀, como representa a figura 15 (Rubino, 2001).

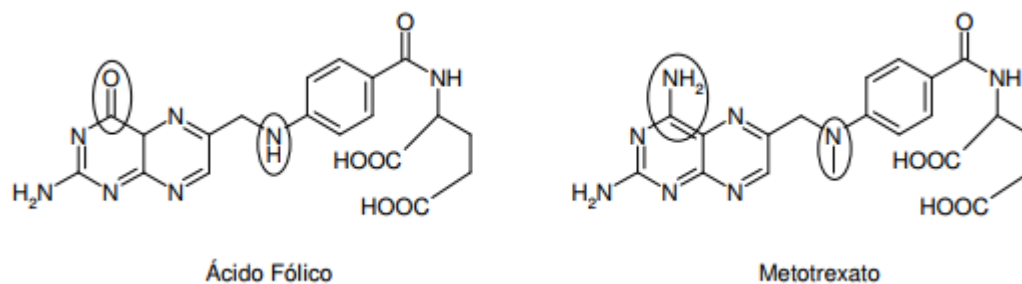


Figura 15: Representação da estrutura do ácido fólico e metotrexato. Adaptada de RUBINO, 2001, p. 219-220.

Os recetores de ácido fólico encontram-se mais evidenciados nas células tumorais. Devido ao facto de o MTX apresentar grande semelhança ao ácido fólico, espera-se que este fármaco tenha afinidade pelos referidos recetores, estabelecendo assim, a ligação/reconhecimento às células tumorais (Wong et al., 2015). Já foram realizados estudos com este fármaco e verificou-se que, tecidos com atividade proliferativa são mais sensíveis ao efeito do MTX, devido ao facto da proliferação celular ser superior em células malignas do que em células normais. Este fármaco tem a capacidade de impedir o crescimento das células cancerígenas sem causar danos irreversíveis às células normais (Infarmed, 2017).

Assim, a formulação de sistemas de entrega de material genético, incluindo o MTX como agente complementar de direcionamento e de quimioterapia, poderá ser uma abordagem promissora para o tratamento de várias doenças, como por exemplo o cancro do colo do útero.

2. Objetivos

O principal objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de entrega simultâneo de ADN plasmídico e de uma droga anti-cancerígena. Para formular um sistema que permita a entrega eficiente do gene terapêutico às células alvo, é fundamental estudar e caracterizar as propriedades dos complexos formados, tais como, a carga à superfície, o tamanho e a capacidade de condensação do ADN.

Assim, o presente trabalho engloba a formulação de sistemas de PEI para condensar o pADN que codifica o gene da p53 e o estudo das propriedades referidas acima dos políplexos quando estes são formados sob diferentes metodologias de adição do agente condensante e diferentes condições de pH. Além disso, também foi realizado um *screening* de polímeros PEI com diferentes pesos moleculares e diferentes estruturas, a arquitetura linear (lPEI) e a ramificada (bPEI). Após a seleção do sistema considerado mais vantajoso, realizaram-se estudos de adição do fármaco MTX aos complexos.

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

O plasmídeo utilizado nesta experiência “6.07-kb *pcDNA3-FLAG-p53 Addgene 144 plasmid 10838*” foi obtido da Addgene (Cambridge, MA, 146 USA). O agitador orbital utilizado foi o Agitorb 200 da Aralab (Albarraque, Portugal). A polietilenimina (PEI) linear (2,5 e 8,0 kDa) e ramificada (0,8 e 1,3 kDa) e o fármaco MTX foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). O kit NZY Maxi Prep Kit e o Greensafe Premium foram adquiridos na NZYTech, Lda.- Genes and Enzymes (Lisboa, Portugal). A triptona e o extrato de levedura foram adquiridos à empresa Bioakar Diagnostics (PANTIN Cedex, França). O meio LB foi obtido da Panreac (Barcelona, Espanha). Todas as soluções 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

O plasmídeo *pcDNA3-FLAG-p53* foi amplificado numa cultura de células de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a. Numa primeira fase, procedesse à inoculação da estirpe em placas de LB-agar com ampicilina (100 µg/mL) a 37°C, “overnight”. Após 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 KH₂PO₄, 0.072 M K₂HPO₄) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. O crescimento foi realizado a 37°C num agitador orbital a 250 rpm. O crescimento bacteriano foi interrompido a uma Densidade Ótica a 600 nm (DO₆₀₀)≈7, e as células recolhidas por centrifugação e armazenadas a -20°C (Valente et al., 2014).

3.2.2. Lise alcalina

De modo a obter o pADN anteriormente amplificado pela *E.coli* DH5a, foi utilizada a lise alcalina destas células e a pré-purificação do pADN com NZY Maxi Prep Kit, utilizando o

protocolo fornecido pelo fabricante. Brevemente, no final da lise celular, as condições de sal e pH das colunas de troca iónica do Kit foram ajustadas de modo a promover a ligação do pADN. Após a ligação do plasmídeo às colunas, impurezas como ARN, proteínas e outras moléculas de baixo peso molecular foram eluídas através de uma lavagem com concentração média de sal. Por último, o pADN foi eluído utilizando uma solução de elevada concentração de sal e posteriormente precipitado (concentrado) através da adição de isopropanol. Deste modo, foi obtida a amostra de pADN pré-purificada, para posteriormente ser utilizada na formulação dos poliplexos.

3.2.3. Eletroforese em gel de agarose

As amostras adquiridas no fim do processo de pré-purificação de pADN bem como as amostras recolhidas do sobrenadante após o processo de formulação de nanopartículas foram observadas por electroforese horizontal, utilizando um gel de agarose a 0,8% (Hoefer, Holliston, MA, USA) corado com 0,6 µL de GreenSafe. A electroforese 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), com utilização do sistema Uvitec Cambridge Fire-Reader UV (UVITEC Cambridge, Cambridge, UK).

3.2.4. Síntese de nanopartículas

A formulação dos complexos PEI/ADN foi realizada de acordo com o seguinte procedimento: a um volume fixo de solução de ADN (400 µL) foram adicionadas diferentes concentrações da solução de PEI (100 µL) (Pereira et al., 2012), a diferentes valores de pH: pH 4.5 (tampão acetato de sódio 0,1 M), pH 6 (tampão fosfato 0,2 M Na₂HPO₄ e 0,2 M NaH₂PO₄) e pH 8 (tampão fosfato 0,2 M Na₂HPO₄ e 0,2 M NaH₂PO₄). Primeiro é adicionado o PEI ao ADN e é deixado a equilibrar durante 15 minutos, à temperatura ambiente. A concentração final de ADN para todos os sistemas formulados é de 20 µg mL⁻¹, determinada pela respetiva absorvância UV a 260 nm. Foram testados 3 métodos de adição da solução de polímero à solução de ADN: *Drop by drop*, adição gota a gota durante 1 minuto, com agitação no vórtex; *Mixing*, adição do polímero de uma só vez e posterior “*up and down*” durante 1 minuto sem vórtex; e por último, o método de *Dropping*, adição de uma só vez do polímero e de seguida uso de vórtex durante 1 minuto. Todas as formulações dos complexos, foram realizadas em triplicados. Após a incubação de 15 minutos referida anteriormente, a solução é centrifugada a 10000 g, durante 20 minutos, a 4 °C e o sobrenadante é recolhido para posterior análise da eficiência de encapsulação e electroforese 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 ADN (P).

3.2.5. Eficiência de encapsulação

No final do protocolo da formulação das nanopartículas, é quantificado o pADN que se encontra no sobrenadante e que corresponde ao ADN livre, não condensado pelo polímero. Esta quantificação é realizada através do *Ultrospec 3000 UV-Visible Spectrophotometer* (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) a 260 nm. As medições foram realizadas em triplicados.

A eficiência de encapsulação foi determinada utilizando a seguinte fórmula:

$$\%EE = \frac{\text{Total de pADN adicionado} - \text{pADN livre no sobrenadante}}{\text{Total de pADN adicionado}} \times 100$$

3.2.6. Tamanho e potencial zeta (ζ) das nanopartículas

Informação relativa ao tamanho e potencial zeta das nanopartículas foi adquirida usando o *Zetasizer Nano Zs*, a 25°C. Para tal, após as nanopartículas formadas se encontrarem precipitadas por centrifugação, o sobrenadante resultante é retirado na sua totalidade e as nanopartículas são ressuspendidas em água Milli Q.

A determinação do tamanho dos complexos foi realizada através do *dynamic light scattering* (DLS) com laser He-Ne a 633nm com *non-invasive backscatter optics* (NIBS). Para avaliarmos a carga superficial das nanopartículas (ζ) foi utilizado *electrophoretic light scattering* utilizando um laser denominado de M3-PALS (Phase analysis Light Scattering). Foi utilizado o *software* Malvern Zetasizer. Os valores médios dos tamanhos bem como dos valores de potencial zeta, foram obtidos através de 3 medições e os desvios padrão apresentados como \pm DP.

3.2.7. Morfologia das nanopartículas

Para analisar a morfologia das nanopartículas formadas, após a precipitação das nanopartículas e remoção do sobrenadante, procede-se à lavagem das mesmas. Para tal, adicionou-se 200 μ L de água Milli Q ao pellet e centrifugou-se a 13000 rpm, durante 12 minutos. Este processo foi repetido 5 vezes. Posteriormente, o pellet de nanopartículas foi

ressuspendido em 40 µL de tungsténio 1% e foi feita uma diluição de 1:20. Desta solução diluída, foram retirados 10 µL e colocados numa lamela redonda e deixaram-se secar à temperatura ambiente, “overnight”. Após secagem da amostra, esta foi revestida com ouro usando um Emitech K550 sputter coater (London, England) e a morfologia das nanopartículas foi analisada por microscopia electrónica de varrimento (SEM) (Hitachi S-2700, Tokyo, Japan).

3.2.8. Ensaios de citotoxicidade

A biocompatibilidade dos vários sistemas PEI/pADN foi avaliada em células de fibroblastos, pelo ensaio de brometo de (3- [4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio) (MTT). Este ensaio colorimétrico permite a quantificação de células metabolicamente ativas. Resumidamente, os políplexos foram aplicados numa placa de 96 poços. Antes de se semear as células, as placas foram irradiadas com luz ultravioleta durante 30 minutos. As células de fibroblastos humanos foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 por poço com crescimento a 37 °C numa atmosfera humidificada com 95% de ar / 5% CO₂ durante 72 horas. Após a incubação, a atividade redox foi avaliada através da redução do MTT. Adicionou-se 100 µL de solução de corante MTT (0,05 mg mL⁻¹ em Krebs) a cada poço, seguido de incubação durante 2 horas a 37 °C, numa atmosfera de CO₂ a 5%. O meio foi aspirado e as células foram tratadas com 50 µL de isopropanol / HCl (0,04 N) durante 20 minutos. A absorvância a 570 nm foi medida usando um leitor de microplacas Biorad Benchmark. O branco do espectrofotómetro foi calibrado usando meio de cultura sem células. A viabilidade celular relativa (%) em relação ao controlo foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{[A]_{teste}}{[A]_{controlo}} \times 100$$

onde a [A]_{teste} é a absorvância da amostra teste e o [A]_{controlo} é a absorvância da amostra de controlo. Todas as experiências foram repetidas três vezes em triplicado. A análise estatística dos dados experimentais utilizou o teste T-Student e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. O significado estatístico foi aceite num nível de p <0,05.

3.2.9. Adição do fármaco MTX

Foram utilizados 2 métodos de adição do fármaco MTX, e testadas diferentes concentrações, tais como 2,4 e 6 µg/mL. O primeiro método consistiu na formulação das nanopartículas (400 µL de pADN + 100 µL de polímero), e após o equilíbrio dos complexos durante 15 minutos foram adicionados 100 µL de MTX seguido de nova incubação por mais 15 minutos (método A).

De seguida, foi realizado o procedimento referido anteriormente para a determinação da percentagem de encapsulação de pADN e determinação de potencial zeta da formulação. O segundo método consistiu na adição de 200 μL de MTX nas diferentes concentrações a 200 μL de pADN. Posteriormente, foram adicionados 100 μL do polímero para se dar a formação dos complexos. Procedeu-se à incubação das nanopartículas durante 15 minutos, à temperatura ambiente e, realizou-se o restante procedimento, já descrito (método B). De referir que para a quantificação de MTX no sobrenadante, a leitura foi realizada no *Ultrospec 3000 UV-Visible Spectrophotometer* (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) a 303 nm (Chen et al., 2014).

4. Resultados

4.1. Metodologia de adição do polímero

Neste trabalho, numa primeira fase, optou-se por testar diferentes metodologias de adição do agente condensante ao ADN, de forma a avaliar em que aspetos estas influenciavam a formulação dos complexos e que características proporcionavam aos sistemas polímero/pADN. Assim sendo, foram testados 3 métodos de adição do polímero: *Drop by drop*, adição gota a gota durante 1 minuto com agitação no vórtex; *Mixing*, adição do polímero de uma só vez e posterior “*up and down*” durante 1 minuto, sem vórtex; e por último, o método de *Dropping*, adição de uma só vez do polímero e de seguida uso de vórtex durante 1 minuto. Após formulação das nanopartículas baseadas em pADN, foram analisadas as suas propriedades, nomeadamente, a taxa de encapsulação do plasmídeo, a morfologia e o tamanho. Os resultados obtidos com o polímero PEI linear de peso molecular de 2,5 kDa, para rácios N/P de 0,5 e 1, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Percentagem de encapsulação de ADN para rácio N/P=0,5 e N/P=1, utilizando o polímero LPEI de 2,5 kDa, de acordo com os diferentes métodos de adição do agente condensante (*Drop by drop*, *Mixing* e *Dropping*).

Metodologia	PEI 2500	
	%EE	
	<u>Rácio 0,5</u>	<u>Rácio 1</u>
<i>Drop by drop</i>	11,67	84,25
<i>Mixing</i>	36,67	93,08
<i>Dropping</i>	26,33	86,83

Analisando os estudos realizados para o polímero PEI de 2,5 kDa verificou-se que a eficiência de encapsulação foi maior para o método *Mixing*, seguido pelo *Dropping* e por último o *Drop by drop*. Estes estudos também foram realizados para o LPEI 8,0 kDa e para os bPEI 0,8 e 1,3 kDa aplicando as mesmas condições e os resultados obtidos seguiram a mesma tendência do LPEI 2,5 kDa. Apesar de ser uma informação crucial, por si só, não era conclusiva e a análise

da morfologia por SEM tornou-se imperativa para inferir qual o método mais viável para a formação dos políplexos.

Considerou-se o rácio N/P=1 para o estudo de SEM pelo facto de apresentar maior eficiência de encapsulação nas três metodologias. Assim, através da análise da figura 16, verificou-se que, apesar de se obter uma encapsulação do ADN maior para o método de *Mixing*, este é de todos o menos promissor pelo facto de não formar partículas esféricas bem definidas (figura 16, painel B). Relativamente ao método *Drop by drop* (figura 16, painel A) e, comparando com o método de *Dropping* (figura 16, painel C), é possível verificar que as partículas formadas possuem tamanhos menores e com forma esférica mais definida, ao contrário do que acontece com o método de *Dropping*.

Os dados obtidos permitiram assim considerar que o método de formulação dos nano-sistemas de PEI/pADN que apresentam um conjunto de características mais satisfatórias é o método *Drop by drop*, pois apesar de apresentar taxas de encapsulações de ADN mais baixas, revelou ser um método com resultados coerentes em termos de morfologia esférica bem definida, em relação às outras metodologias testadas. Este método tem sido muito utilizado pelo facto de ser simples, rápido, económico e com facilidade no controlo do tamanho e composição das nanopartículas bem como com inúmeras possibilidades de modificação da sua superfície, apresentando ainda grande homogeneidade das populações (Shi et al., 1999).

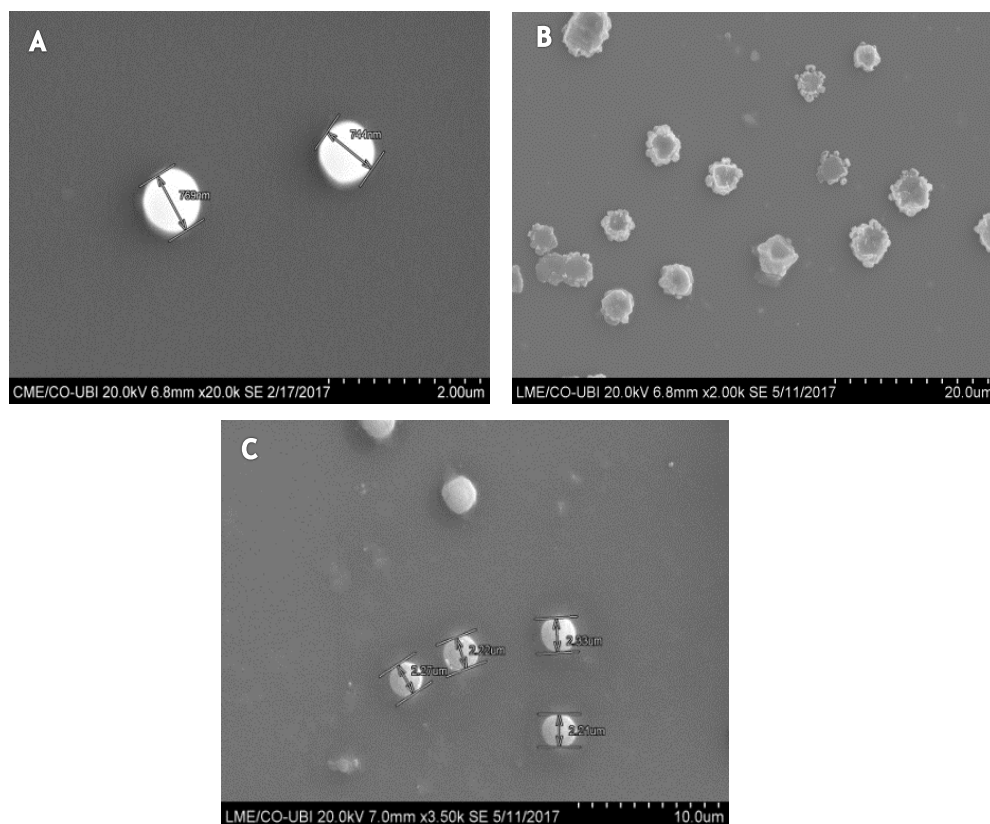


Figura 16: Imagens de SEM para o método *Drop by drop*, (painel A), *Mixing* (painel B) e *Dropping* (painel C) para rácio de N/P=1 utilizando o polímero IPEI de 2,5 KDa.

4.2. Condições de pH

Para avaliar de que forma o pH influenciaria a percentagem de encapsulação do ADN foram testados diferentes valores de pH na formação dos complexos: pH 4.5 (tampão acetato de sódio 0,1 M), pH 6 (tampão fosfato 0,2 M Na_2HPO_4 e 0,2 M NaH_2PO_4) e pH 8 (tampão fosfato 0,2 M Na_2HPO_4 e 0,2 M NaH_2PO_4), com diferentes rácios de N/P utilizando o polímero bPEI de 1,3 kDa. Os resultados estão apresentados na tabela 3. Verificou-se que, apenas se obtêm resultados coerentes para pH 4.5, com uma eficiência de encapsulação de cerca de 91%. Para pH 6 verificou-se um perfil de encapsulação não esperado, pelo facto de, à medida que se aumenta o rácio N/P, observa-se uma redução da percentagem de encapsulação de ADN. Por último, verificamos que para pH 8 não há qualquer condensação do ADN e posterior formação de complexos. A explicação para este fenómeno deverá estar relacionada com o facto do ADN e do PEI, para valores de pH mais altos, não interagirem fortemente, uma vez que a quantidade de aminas protonadas é mais baixa. Por outro lado, os complexos formados a valores de pH mais baixos resultam numa maior quantidade de aminas protonadas, estabelecendo-se interações mais fortes entre o ADN e o PEI, sendo possível encapsular maior quantidade de pADN em solução (Santos et al., 2016).

Tabela 3: Percentagem de encapsulação de ADN para rácio N/P=2, 2,25 e 2,5 com a formação dos complexos a diferentes condições de pH (4.5, 6 e 8).

pH	PEI 1,3 kDa		
	%EE		
	<u>Rácio 2</u>	<u>Rácio 2,25</u>	<u>Rácio 2,5</u>
4,5	90,50	91,17	90,58
6	75,17	61	49,75
8	0	0	0

Por falta de reprodutibilidade para as experiências realizadas considerando os valores de pH 6 e 8, foi selecionado o pH de 4,5 para posterior trabalho experimental.

4.3. Complexos PEI/ADN

Posteriormente, procedeu-se à análise dos diferentes PEI's, quer do PEI linear (2,5 e 8,0 kDa) quer do ramificado (0,8 e 1,3 kDa), de modo a avaliar a correlação entre a capacidade de condensação do ADN, percentagem de encapsulação e o potencial zeta, com o peso molecular dos polímeros.

Por si só, quer o PEI quer o ADN são solúveis quando isolados, mas após junção destas duas soluções, os respetivos componentes começam a interagir e a neutralizar-se, formando complexos insolúveis à medida que a carga superficial destes se aproxima de zero. Este fenómeno leva à precipitação dos políplexos formados, podendo ser observado através de medições no espectrofotómetro UV em conjugação com a eletroforese em gel de agarose.

4.3.1. Complexos lPEI/ADN

Foram testados dois polímeros com estrutura linear de peso molecular 2,5 e 8,0 kDa. De modo a avaliar a capacidade de condensação e formação dos complexos quando em contacto com o ADN, foram realizados estudos de encapsulação recorrendo ao espectrofotómetro UV, complementado com eletroforese em gel de agarose, e procedeu-se também ao estudo do potencial zeta para ambos os polímeros, tabela 4.

Tabela 4: Percentagem de encapsulação e potencial zeta (Média \pm Desvio Padrão) para cada polímero linear (2,5 e 8,0 kDa) de acordo com o rácio praticado de N/P.

<i>PEI 2,5 kDa</i>			<i>PEI 8,0 kDa</i>		
<i>linear</i>			<i>linear</i>		
<i>Rácio N/P</i>	<i>% EE</i>	<i>Zeta (mV)</i>	<i>Rácio N/P</i>	<i>% EE</i>	<i>Zeta (mV)</i>
0,5	11,67	-2,25 \pm 0,66	0,5	7,75	-7,52 \pm 0,15
1	84,25	-20,37 \pm 3,23	1	0	-22,43 \pm 5,32
2,5	97,5	+9,10 \pm 4,50	2,5	81,08	-18,83 \pm 0,76
5	78,25	+22,73 \pm 0,65	5	81,92	+20,75 \pm 3,32
10	80,33	+24,17 \pm 0,78	10	77,42	+ 25,6 \pm 0,14
15	76,50	+26,83 \pm 0,99	15	74,92	+27,40 \pm 2,90
20	78,67	+27,83 \pm 0,40	20	75,17	+29,35 \pm 2,76
30	71,42	+28,27 \pm 1,47	30	74,50	+24,57 \pm 5,85

Numa primeira análise, no que diz respeito às percentagens de encapsulação de cada polímero, e complementando esta caracterização com as respectivas eletroforeses em gel de agarose (figura 17), verificou-se que, pela ausência de bandas no gel de eletroforese nos 2 polímeros para rácios N/P $\geq 2,5$ foi obtida uma condensação e encapsulação quase total de pADN.

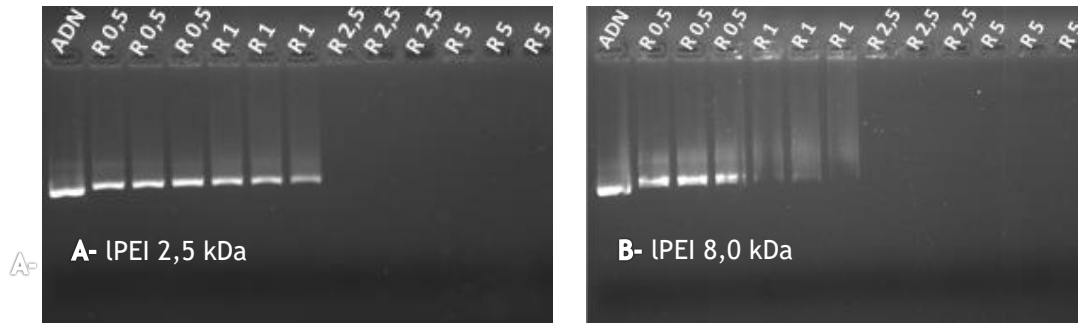


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose, em triplicado, para rácios 0,5; 1; 2,5; 5. Paineil A: polímero linear de 2,5 kDa. Paineil B: polímero linear de 8,0 kDa.

De notar que, tanto o IPEI 2,5 kDa como o IPEI 8,0 kDa, para rácios de N/P ≤ 1 , não se obtiveram percentagens de encapsulação satisfatórias (figura 18). O mesmo resultado também se refletiu na eletroforese, pois houve migração de pDNA que ainda estava presente no sobrenadante dos sistemas preparados para esses rácios. Estes resultados foram suportados pelos dados negativos obtidos no potencial zeta (figura 19), sugerindo assim que se formaram poucos complexos PEI/ADN para esses rácios e que não apresentam carga superficial adequada para garantirem uma transfeção eficiente das células alvo, sendo fundamental este apresentarem carga positiva para a entrada nas células (Midoux et al., 2008; Peng et al., 2009).

Em termos comparativos, para rácios N/P ≥ 5 , foram obtidas eficiências de encapsulação satisfatórias e conseqüentemente valores de potencial zeta cada vez mais positivos (figura 19), para ambos os polímeros em estudo.

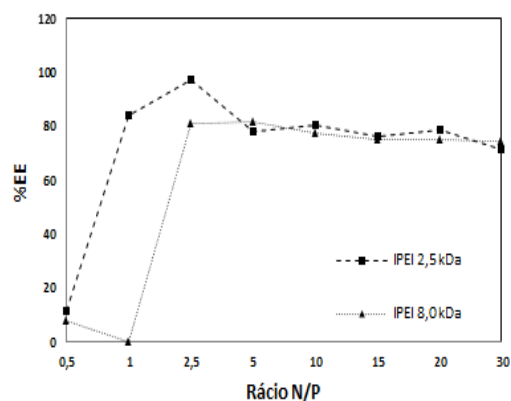


Figura 18: Percentagem de encapsulação de ADN (%EE) vs do rácio N/P para o polímero linear de 2,5 e 8,0 kDa.

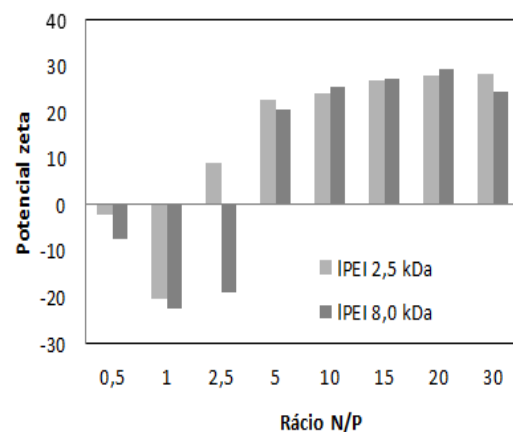


Figura 19: Potencial zeta vs rácio N/P para o polímero linear de 2,5 e 8,0 kDa.

No que diz respeito à percentagem de encapsulação, foi alcançada uma condensação de ADN superior para o polímero LPEI de 2,5 kDa, utilizando um rácio N/P=2,5. No potencial zeta também se verificou que o LPEI 2,5 kDa tem capacidade de conferir carga positiva para rácios inferiores em relação ao polímero linear de maior peso molecular (8,0 kDa). Este fenómeno seria de esperar, pois o LPEI de 8,0 kDa além das cargas positivas conferidas pelos grupos amina também tem na sua constituição grupos cloro (Cl), que contribuem com cargas negativas adicionais, reduzindo a disponibilidade das cargas positivas para interagirem com o ADN, diminuindo assim a capacidade de condensar o ADN e de conferir carga positiva aos complexos. Estas diferenças significativas deixam de se verificar à medida que aumentamos o rácio N/P pois, apesar de estarem presentes os grupos negativos no LPEI de 8,0 kDa, mais cargas positivas se encontram disponíveis para interagir, existindo, assim, total interação das cargas negativas provenientes do ADN com as cargas positivas provenientes do PEI, com consequente formação dos complexos poliméricos. Assim, estes resultados mostram que, quer o peso molecular do polímero, quer a presença de grupos que conferem carga negativa, neste caso o Cl, vão determinar o rácio N/P necessário para encapsular o pADN e consequentemente o potencial zeta dos complexos formados.

4.3.2. Complexos bPEI/ADN

Do polímero PEI com estrutura ramificada, foram escolhidos os pesos moleculares de 0,8 e 1,3 kDa. Da mesma forma que foi feita a análise dos complexos formados com o PEI linear, também aqui se procedeu à análise da taxa de encapsulação, potencial zeta e eletroforeses em gel de agarose no sentido de caracterizar o polímero ramificado e verificar o efeito do peso molecular. Os resultados podem ser consultados na tabela 5.

Numa primeira abordagem, analisando a tabela 5, seria de esperar que as cargas presentes à superfície dos complexos tivessem um comportamento diretamente proporcional com o aumento da quantidade do agente condensante, no entanto, tal como se verificou para o polímero linear, para rácios N/P muito baixos, onde não ocorre formação de nanopartículas, não se obteve essa tendência. Este fenómeno apenas é verificado para rácios N/P ≥ 1 , onde são constatadas elevadas percentagens de encapsulação de ADN.

Tabela 5: Percentagem de encapsulação e potencial zeta (Média \pm Desvio Padrão) para cada polímero de acordo com o rácio praticado de N/P. À esquerda: polímero ramificado de peso molecular de 0,8 kDa. À direita: polímero ramificado de peso molecular de 1,3 kDa.

<i>PEI 0,8 kDa ramificado</i>			<i>PEI 1,3 kDa ramificado</i>		
<i>Rácio N/P</i>	<i>% EE</i>	<i>Zeta (mV)</i>	<i>Rácio N/P</i>	<i>% EE</i>	<i>Zeta (mV)</i>
0,1	14,58	-8,14 \pm 4,30	0,1	0	-21,70 \pm 5,84
0,5	15,50	-6,49 \pm 3,49	0,5	12,58	-41,80 \pm 2,17
0,8	31,58	-18 \pm 1,56	0,8	51,92	-43,60 \pm 0,51
1	54,92	-25,03 \pm 4,45	1	82,67	-32,50 \pm 2,45
2	85,10	-8,48 \pm 1,21	2	90,50	+7,19 \pm 2,46
2,25	89,50	-2,38 \pm 2,31	2,25	91,17	+6,26 \pm 0,51
2,5	90,42	-1,56 \pm 1,31	2,5	90,58	+10,47 \pm 0,55
2,75	93,00	-0,66 \pm 2,41	2,75	91,92	+11,58 \pm 2,51
3	93,10	+0,58 \pm 0,22	3	91,92	+13,93 \pm 2,80
3,25	93,42	+1,74 \pm 0,09	3,25	90,92	+14,30 \pm 0,40
3,5	95,42	+3,78 \pm 2,23	3,5	90,08	+16,83 \pm 0,31
5	95,83	+13,17 \pm 1,10	5	90,83	+16,37 \pm 0,98
7,5	96,33	+17,47 \pm 0,95	7,5	90,92	+19,40 \pm 0,66
10	96,50	+18,87 \pm 1,50	10	90,92	+22,90 \pm 2,98
12,5	96,92	+21,57 \pm 0,92	12,5	88,25	+25,10 \pm 0,26

Os resultados descritos anteriormente também se refletem na análise das eletroforeses em gel de agarose, figura 20, no que diz respeito às encapsulações de ADN. Verificou-se que, para o polímero ramificado de 0,8 kDa utilizando um rácio de N/P=1, apenas se obteve 54,92% de ADN encapsulado representando o motivo pelo qual ainda se verifica uma banda, mais clara, no gel de agarose para essa quantidade de polímero adicionada, figura 20, painel A. Ao passo que, comparando com o polímero ramificado de 1,3 kDa, uma vez que para o rácio de N/P=1 se verifica uma encapsulação mais elevada, de 82,67% (tabela 5), também na eletroforese se verifica apenas a presença vestigial de ADN no sobrenadante para este rácio (figura 20, painel B).

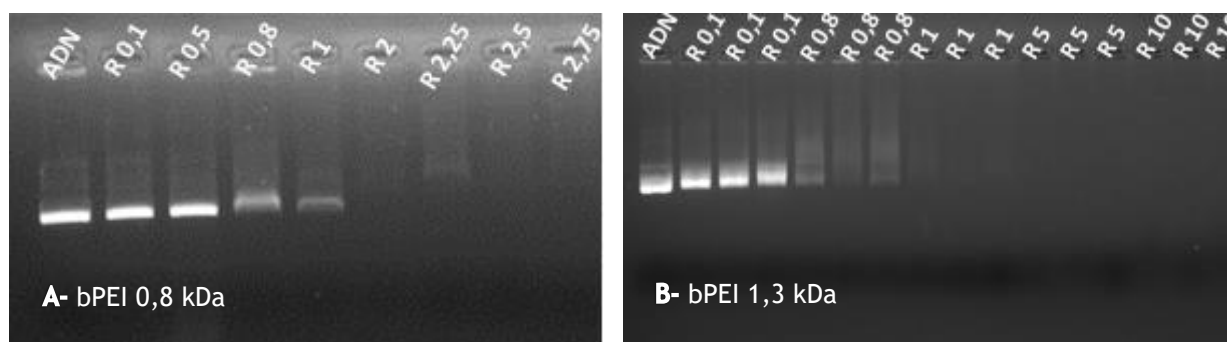


Figura 20: Painel A: Eletroforese em gel de agarose, para rácios 0,1; 0,5; 0,8; 1; 2; 2,25; 2,5; 2,75; Para o polímero ramificado de 0,8 kDa. Painel B: Eletroforese em gel de agarose, em triplicado, para rácios 0,1; 0,8; 1; 5; 10; para o polímero ramificado de 1,3 kDa.

Fazendo uma análise comparativa entre os dois polímeros ramificados, com diferentes pesos moleculares, verificou-se através da figura 21 que, se obteve uma eficiência de encapsulação mais elevada para o polímero com maior peso molecular, considerando o mesmo rácio (N/P=1). Este resultado prova que quanto maior o peso molecular do polímero mais eficiente é a condensação e encapsulação do pADN. Apesar de se verificar este fenómeno, o polímero de menor peso molecular atinge percentagens de encapsulação do ADN maiores do que o PEI de 1,3 kDa, para rácios superiores a 2,5, embora a diferença não seja muito significativa. Relativamente ao potencial zeta dos complexos formados, como se pode observar na figura 22, verificou-se que o polímero de 0,8 kDa apenas atinge valores de cargas superficiais positivas para rácios de N/P ≥ 3 , atingindo valores superiores a +10 mV apenas quando o rácio de 5 é considerado, provavelmente porque este polímero de menor peso molecular apresenta menor densidade de cargas. Relativamente ao PEI de 1,3 kDa, foram alcançados potenciais zeta superiores a +10mV para rácios de N/P de 2,5 pelo facto deste polímero apresentar maior peso molecular e consequentemente maior densidade de carga, o que se vai refletir na capacidade de formar complexos positivos a rácios mais baixos comparativamente ao polímero de 0,8 kDa.

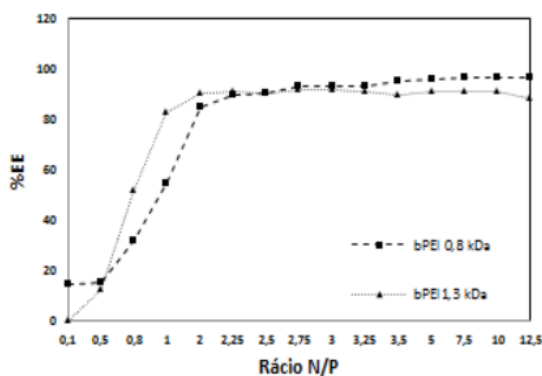


Figura 21: Percentagem de encapsulação de ADN (%EE) vs do rácio N/P para o para o polímero ramificado de 0,8 e 1,3 kDa.

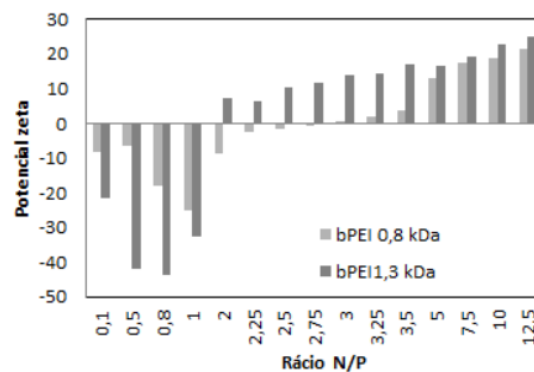


Figura 22: Potencial zeta vs rácio N/P para o polímero ramificado de 0,8 e 1,3 kDa.

4.4. Tamanho dos complexos

Os tamanhos médios dos complexos formados com os diferentes polímeros em estudo, foram determinados pelo DLS e estão apresentados na tabela 6. Para melhor visualização, em termos comparativos, é apresentada a figura 23.

Tabela 6: Tamanhos dos complexos PEI/ADN formados, com os diferentes polímeros em estudo, para diferentes rácios.

	<i>PEI 2,5 linear</i>	<i>PEI 8,0 linear</i>	<i>PEI 0,8 ramificado</i>	<i>PEI 1,3 ramificado</i>
<i>Rácio N/P</i>	<i>Tamanho (nm)</i>	<i>Tamanho (nm)</i>	<i>Tamanho (nm)</i>	<i>Tamanho (nm)</i>
1	998 ± 3,8	984 ± 8,6	883 ± 9,2	850 ± 4,9
1,5	982 ± 8,4	975 ± 6,3	827 ± 4,3	807 ± 6,2
2	944 ± 6,9	898 ± 5,9	804 ± 7,6	784 ± 3,1
2,5	881 ± 1,5	861 ± 7,2	771 ± 1,9	738 ± 1,4
5	810 ± 7,1	770 ± 6,6	715 ± 3,5	701 ± 2,9
8	787 ± 2,9	692 ± 4,8	674 ± 6,1	651 ± 0,8
10	702 ± 4,8	607 ± 5,6	594 ± 5,8	563 ± 4,5
15	623 ± 7,7	531 ± 6,1	473 ± 0,7	451 ± 1,6
20	552 ± 5,1	389 ± 4,3	351 ± 2,8	307 ± 6,2

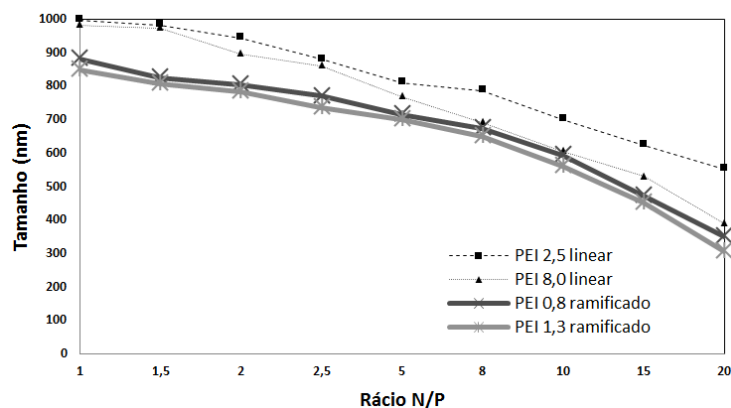


Figura 23: Tamanhos dos complexos PEI/ADN formados, com os diferentes polímeros em estudo, para diferentes rácios.

Analisando a tabela 6, é possível constatar que, para todos os polímeros, independentemente da sua estrutura linear ou ramificada, à medida que se aumentou o rácio N/P diminuiu o tamanho dos complexos. Também se verificou que, os complexos formados com polímeros ramificados diferem em cerca de 100-150 nm dos complexos formados com polímeros lineares. Apesar dos polímeros ramificados apresentarem um peso molecular bastante inferior aos polímeros lineares, estes são capazes de formar complexos mais pequenos. Este efeito pode ser uma consequência de, como descrito anteriormente, a estrutura ramificada (contrariamente ao polímero com estrutura linear) apresenta aminas primárias que são responsáveis por conferir maior capacidade do polímero condensar o ADN, e assim, formar

complexos mais compactos e de tamanho inferior. Entre os polímeros ramificados (0,8 e 1,3 kDa), o que apresenta complexos com tamanhos mais baixos, é o de maior peso molecular, uma vez que além de apresentar maior quantidade de aminas primárias, também tem maior densidade de cargas.

4.5. Morfologia dos complexos

De forma a avaliar a morfologia dos políplexos formados com polímeros de diferentes estruturas recorreu-se à técnica de SEM. Foi realizada a análise morfológica de amostras provenientes de alguns rácios N/P selecionados, para ambas as estruturas do agente condensante linear 2,5 kDa e para o ramificado de 1,3 kDa. Como é possível observar na figura 24, ambas as formulações apresentam uma forma esférica ou oval, sugerindo que a internalização dos complexos através da membrana celular será facilitada.

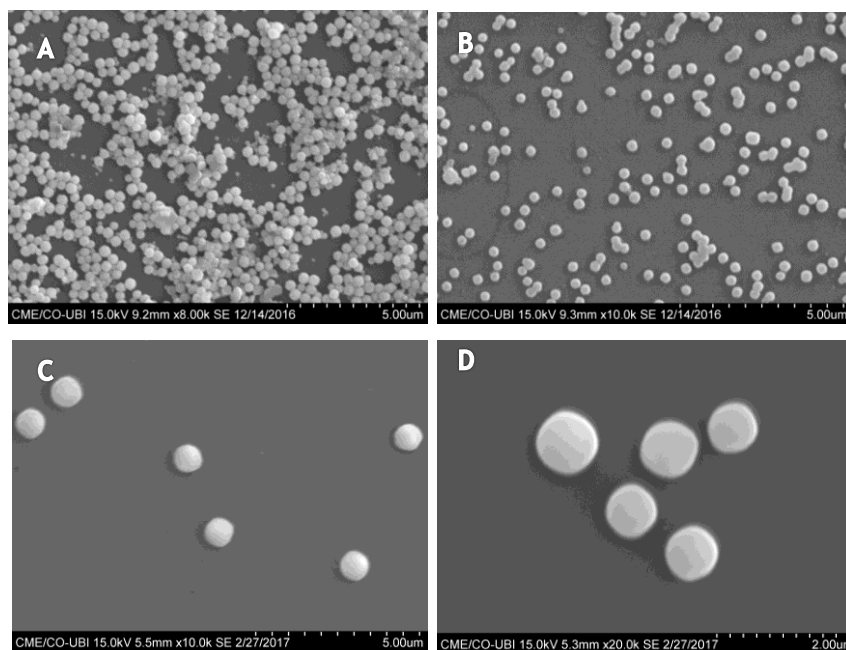


Figura 24: Imagem SEM dos complexos formados com o polímero linear 2,5 kDa, no painel A utilizando um rácio N/P=2 e no painel B um rácio de N/P=6 e, imagens dos complexos formados com o polímero ramificado 1,3 kDa, onde no painel C foi utilizado um rácio N/P=2,25 e no painel D um rácio N/P=2,5.

4.6. Ensaios de citotoxicidade

Os resultados referentes à viabilidade celular, obtidos para todos os sistemas, permitiram constatar que, tal como se pode observar na tabela 7, à medida que é aumentado o rácio N/P e consequentemente as formas livres do PEI, a viabilidade celular vai diminuindo, sugerindo que a presença destas moléculas livres vai induzir toxicidade às células eucarióticas. Além disso, também se verificou que os polímeros ramificados apresentam maior citotoxicidade do que os polímeros lineares provavelmente por terem maior densidade de cargas e consequentemente maior toxicidade. No entanto, tal como descrito anteriormente, estas formas livres dos PEI poderão ser fundamentais para a modificação e permeabilização da estrutura da membrana endossomal (Boeckle et al., 2004; Dai et al., 2011; Yue et al., 2011) e, permitir assim, o acesso facilitado dos complexos ao citoplasma.

Tabela 7: Viabilidade celular, às 72 h, em células de fibroblastos para os diferentes polímeros (lineares de 2,5 e 8,0 kDa e ramificados de 0,8 e 1,3 kDa) para diferentes rácios: 1; 1,5; 2; 2,5; 5; 8; 10; 15; 20. Os valores foram calculados para os dados obtidos com 3 medições independentes.

<i>Viabilidade celular (%)</i>				
<i>Rácio N/P</i>	<i>IPEI 2,5</i>	<i>IPEI 8,0</i>	<i>bPEI 0,8</i>	<i>bPEI 1,3</i>
1	83 ± 3,2	79 ± 2,4	62 ± 0,7	62 ± 4,3
1,5	81 ± 4,8	79 ± 1,9	60 ± 1,5	59 ± 2,2
2	80 ± 6,2	77 ± 4,7	57 ± 2,9	57 ± 5,3
2,5	77 ± 3,4	75 ± 6,0	56 ± 1,3	54 ± 0,6
5	72 ± 5,1	67 ± 2,8	51 ± 4,6	50 ± 2,7
8	69 ± 2,2	65 ± 3,2	45 ± 0,5	43 ± 0,8
10	66 ± 4,7	63 ± 4,1	42 ± 3,1	41 ± 1,6
15	54 ± 3,9	50 ± 1,2	33 ± 3,8	30 ± 3,5
20	49 ± 1,8	41 ± 0,9	28 ± 1,1	26 ± 1,4

4.7. Adição do fármaco metotrexato (MTX)

De modo a avaliar a eficiência de encapsulação do MTX foi escolhido o polímero ramificado de 1,3 kDa, utilizando rácios de 2,25 e 2,5 na formulação dos complexos. Este polímero foi preferencialmente escolhido para se realizarem testes com o MTX devido ao facto de apresentar estrutura ramificada, contendo assim mais aminas com carga positiva disponíveis para estabelecerem interações com moléculas de carga oposta como o pADN e o MTX, e apresentar na sua constituição aminas primárias que conferem estabilidade aos complexos, o que se irá refletir numa superior eficiência de transfeção.

Para tal, foram realizados 2 métodos de adição do fármaco, o método A (tabela 8) e o método B (tabela 9), como descrito anteriormente, na secção de Materiais e Métodos. Analisando os dados obtidos, verificou-se que, para todos os sistemas formulados, independentemente do método praticado bem como do rácio N/P, à medida que é aumentada a concentração do agente a encapsular, MTX, há uma diminuição da encapsulação de ADN bem como de MTX.

Tabela 8: Percentagem de eficiência de encapsulação de pADN e de MTX (concentrações de 2, 4 e 6 µg/mL), utilizando o polímero bPEI de 1,3 kDa com rácio N/P de 2,25 e 2,5, recorrendo ao método A.

<i>PEI 1.3 kDa</i>						
<i>Método A</i>						
<i>Parâmetros</i>	<i>Rácio 2,25 (MTX 2)</i>	<i>Rácio 2,25 (MTX 4)</i>	<i>Rácio 2,25 (MTX6)</i>	<i>Rácio 2,5 (MTX 2)</i>	<i>Rácio 2,5 (MTX 4)</i>	<i>Rácio 2,5 (MTX 6)</i>
%EE de ADN	86,17	85,17	79,33	88,5	83,5	83
%EE de MTX	23,10	19,04	0,78	25,27	11,54	0,65

Tabela 9: Percentagem de eficiência de encapsulação de ADN e de MTX, com concentrações de 2, 4 e 6 µg/mL, utilizando o polímero bPEI de 1,3 kDa com rácio N/P de 2,25 e 2,5, recorrendo ao método B.

<i>PEI 1.3 kDa</i>						
<i>Método B</i>						
<i>Parâmetros</i>	<i>Rácio 2,25 (MTX 2)</i>	<i>Rácio 2,25 (MTX 4)</i>	<i>Rácio 2,25 (MTX6)</i>	<i>Rácio 2,5 (MTX 2)</i>	<i>Rácio 2,5 (MTX 4)</i>	<i>Rácio 2,5 (MTX 6)</i>
%EE de ADN	81,50	79,67	72,25	83,25	80,67	72,42
%EE de MTX	42,31	39,10	25,81	42,31	36,10	25,16

Uma possível explicação para o facto de diminuir a encapsulação do pADN e do MTX à medida que se aumentou a concentração de MTX, poderá estar relacionada com o incremento de cargas negativas que o MTX confere ao meio de reação, comparativamente às cargas positivas do polímero que não se encontram em quantidade suficiente para encapsular todas as cargas negativas. Ou seja, à medida que a quantidade de cargas negativas em solução aumenta, por aumento da concentração de MTX adicionada à solução com pADN, deixa de respeitar o rácio N/P previamente otimizado para a formulação dos sistemas, e conseqüentemente, diminui a encapsulação de pADN por parte do polímero. Este fenómeno poderá ser contrariado se à medida que aumentar a concentração de MTX, se fizer um ajuste (aumento) da quantidade de polímero a adicionar. Por outro lado, é sabido que quanto maior a concentração do agente que se pretende encapsular menor é a eficiência de encapsulação. Vários autores detetaram esta dificuldade e desenvolveram algumas estratégias para potenciar o aumento da eficiência de encapsulação, como por exemplo o *cross-linking*, com a utilização de diferentes agentes, podendo ser uma alternativa para este trabalho (Basarkara et al., 2007; Mahor et al., 2011).

Dos 2 métodos testados, as encapsulações do fármaco foram superiores para o método B, que consiste na adição de 200 µL de MTX, nas diferentes concentrações, a 200 µL de pADN e só posteriormente são adicionados 100 µL do polímero. Uma vez que é adicionado o polímero a uma solução que já contem pADN e MTX, a encapsulação dos 2 compostos parece ocorrer em simultâneo e de forma aleatória, verificando-se maior encapsulação de MTX e conseqüentemente uma ligeira diminuição de encapsulação do ADN, provavelmente pelo facto de não existirem só cargas negativas provenientes do ADN. Ao contrário do que acontece com o método A, em que o fármaco é adicionado após formação dos complexos PEI/ADN, interagindo apenas com o polímero que não estabeleceu interações com o pADN. Esta teoria pode explicar os valores mais elevados de EE para o ADN e menores para o MTX, comparativamente ao método B.

Posteriormente, também foram realizados estudos de potencial zeta dos sistemas de PEI/pADN/MTX, verificando-se que não houve alterações significativas comparativamente aos sistemas somente de PEI/pADN.

5. Discussão

A terapia génica revolucionou a abordagem terapêutica de diversas doenças, nomeadamente o cancro. A possibilidade de corrigir danos no ADN causados por mutações ou substituir o ADN mutado restituindo o normal funcionamento às células é considerado um grande avanço relativamente a terapias mais convencionais.

As grandes limitações da terapia génica estão relacionadas com o uso dos vetores de entrega de genes. Para que esta terapia possa ser empregue, os vetores devem, entre outros requisitos, ser biocompatíveis, acomodar uma grande quantidade de material genético e serem de fácil produção.

Neste sentido, os vetores não-virais de base polimérica surgem como uma proposta viável pois são de fácil manipulação, inócuos e eficientes para a entrega de genes de interesse terapêutico.

Este trabalho baseou-se no desenvolvimento de um vetor de entrega adequado à terapia génica, baseado nos complexos PEI/pADN. Para incrementar o seu potencial efeito terapêutico em tratamentos do cancro do colo do útero, a droga MTX foi também incorporada nos políplexos formulados. A estratégia presente neste trabalho seguiu alguns estudos da literatura que mostram que a associação da terapia génica à quimioterapia traz resultados mais satisfatórios no tratamento de cancro, em relação ao uso individual de qualquer destas terapias.

A polietilenimina é um polímero reconhecido pela sua capacidade de condensar o ADN, pelas inúmeras propriedades já mencionadas anteriormente. Neste trabalho, políplexos de PEI/pADN foram produzidos com recurso ao uso de PEI de várias arquiteturas, linear e ramificado, bem como de diferentes pesos moleculares, de forma a seleccionar o sistema mais adequado a estudos de transfeção celular.

Para tal, foram testados diferentes valores de pH, metodologias de adição do polímero ao pADN e a influência da arquitetura e peso molecular da polietilenimina. Tal como descrito na literatura, diferentes condições experimentais como o pH e formas de contacto entre o agente condensante e o ADN resulta em diferentes morfologias dos políplexos, com diferentes graus de compactação e agregação (Pinto et al., 2009). Os resultados obtidos nestes estudos estão de acordo com a bibliografia, uma vez que os políplexos apresentaram variações significativas em parâmetros como a morfologia e eficiência de encapsulação de pADN. Com esta informação, foi possível inferir que o método de adição *Drop by drop*, e o uso de pH 4,5, foram as condições experimentais mais favoráveis para estudos posteriores, por levarem à formação de nanopartículas de forma esférica ou oval e permitirem a encapsulação de elevadas percentagens de pADN.

O efeito do peso molecular e da arquitetura do polímero nas propriedades dos políplexos também foi investigado. Para todos os sistemas, quer usando o PEI linear ou usando o ramificado, verificou-se que à medida que aumentou a quantidade adicionada do polímero

responsável pela condensação e posterior formação dos complexos, observou-se uma diminuição da absorvância a 260 nm no espectrofotómetro UV, dados apresentados em forma de percentagem de encapsulação de pADN. Estes resultados foram corroborados pela diminuição das bandas de pADN nos géis de eletroforese, no que diz respeito à condensação/encapsulação do pADN. Os polímeros que apresentaram maior eficiência de encapsulação, foram os de estrutura ramificada exibindo valores superiores aos de estrutura linear, alcançando assim %EE \geq 90, de acordo com o já verificado por outro grupo (Jorge et al., 2013), devido ao seu maior conteúdo de amins primárias (Reschel et al., 2002). No entanto as cargas superficiais dos complexos bPEI foram relativamente inferiores aos lPEI, devido ao baixo peso molecular destes.

Foi possível verificar ainda, que os tamanhos diminuem à medida que o rácio N/P aumenta, de acordo com o que já foi descrito noutros trabalhos (Ogris et al., 1998; Tang et al., 1997), apresentando valores mais pequenos os sistemas formados com bPEI de 1,3 kDa. Tal como se verificou neste estudo, a informação presente na literatura suporta que a formação e morfologia dos poliplexos depende das características da solução e das propriedades dos agentes condensantes como a arquitetura, densidade de cargas e comprimento da cadeia (Akinchina et al., 2007; Dias et al., 2003; Kobayashi et al., 1987; Shovsky et al., 2009;)

Os resultados representados nas imagens de SEM estão de acordo com o pretendido, indicando que a morfologia dos complexos formados através das condições mais favoráveis é esférica ou oval, o que posteriormente pode facilitar o processo de internalização celular (Decuzzi et al., 2008).

Uma das maiores preocupações da utilização do PEI para formular sistemas de entrega de genes é a toxicidade que lhe está associada, mas o seu mecanismo de ação tóxica ainda não está bem caracterizado (Florea et al., 2002; Putnam, 2001). Tem sido descrito, que poderá estar associada à grande quantidade de formas livres do PEI que não foi complexado com o ADN, podendo estas formas induzir toxicidade celular e assim explicar este efeito negativo (Clamme et al., 2003). No presente trabalho, a citotoxicidade dos poliplexos foi avaliada pelo ensaio do MTT. Os valores de viabilidade celular obtidos para cada sistema PEI/pADN revelaram que o aumento do peso molecular e o grau de ramificação contribuem para o aumento da citotoxicidade dos complexos. No entanto, o aumento do rácio N/P demonstrou ser o fator determinante para a perda de biocompatibilidade das nanopartículas em causa. Outros autores também detetaram este fenómeno em estudos similares (Fischer et al., 1999; Gebhart et al., 2001; Godbey et al., 1999).

O fármaco MTX foi incorporado nos complexos PEI/pADN por 2 métodos diferentes, como descrito anteriormente. As nanopartículas formadas contendo pADN e MTX foram adequadamente caracterizadas. As suas propriedades revelam que a morfologia, tamanho e carga superficial das nanopartículas são muito semelhantes aos complexos PEI/pADN sem MTX para as mesmas condições experimentais. Relativamente à taxa de encapsulação da droga, verificou-se a encapsulação da mesma para ambos os métodos de incorporação descritos,

apresentando valores mais favoráveis para o método B. Com este método, valores máximos de eficiência de encapsulação de pADN ou de MTX foram obtidos, considerando um rácio N/P de 2,5 e utilizando uma concentração de MTX de 2 µg/mL. Tal como descrito na literatura, foi possível verificar uma diminuição da taxa de encapsulação quando se aumentou a quantidade de fármaco a encapsular (Basarkara et al., 2007; Mahor et al., 2011).

6. Conclusões e perspectivas futuras

Hoje em dia, ainda existe uma grande necessidade de investigação no que diz respeito ao desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de diversas patologias, nomeadamente no tratamento do cancro. Em particular, sabe-se que no cancro do colo do útero, as terapias tradicionais têm provocado grandes efeitos nefastos devido à terapia invasora que é a quimioterapia, no que diz respeito à administração de fármacos em doses máximas permitidas, contribuindo assim para a acumulação inespecífica em células saudáveis e provocando consequentemente efeitos secundários adversos graves.

Neste estudo foram desenvolvidos políplexos de polietilenimina/pADN cuja morfologia, tamanho, carga superficial e taxa de encapsulação de pADN é dependente do pH, metodologia de adição do agente PEI e rácio N/P considerado. Para além disso, as propriedades intrínsecas do polímero, como o peso molecular e a ramificação influenciam as características dos complexos formados; contudo, para cada sistema, é o rácio N/P o fator mais determinante.

Manipulando as condições experimentais, foi possível otimizar os sistemas de entrega de pADN baseados em PEI. Das condições otimizadas, resultaram nanopartículas que permitiram encapsular percentagens elevadas do plasmídeo de interesse terapêutico, com formas esféricas ou ovais, apresentando tamanhos reduzidos e adequados a protocolos de terapia génica e carga superficial positiva. Adicionalmente, através de estudos de citotoxicidade, revelaram ser biocompatíveis para valores de N/P mais baixos. Assim sendo, por reunirem estas características, estes sistemas podem ser considerados um veículo promissor para uso em terapia génica aplicada ao cancro do colo do útero. Para maior eficácia no tratamento deste cancro, a estratégia desenvolvida neste trabalho associou a terapia génica à quimioterapia, através da incorporação da droga anticancerígena MTX aos sistemas PEI/pADN. Através da otimização do método experimental de adição do fármaco, foi possível criar complexos contendo percentagens satisfatórias de MTX.

Espera-se que a terapia génica, com novos vetores não-virais de entrega se torne mais segura e eficiente, podendo ser utilizada num futuro próximo como uma terapia de eleição. Neste contexto, e tendo em conta o trabalho já desenvolvido, as próximas etapas a realizar com os políplexos desenvolvidos numa perspectiva futura serão:

- 1) Verificar a eficiência de transfeção do sistema PEI/pADN, formado com o polímero ramificado de 1,3 kDa, e a sua capacidade de atuar nas células cancerígenas diminuindo a sua proliferação (avaliando a expressão do supressor de tumor p53 por western blot, assim como a indução da apoptose das células tumorais do colo do útero por citometria de fluxo);

- 2) Verificar se o fármaco MTX se localiza à superfície das nanopartículas de PEI/pADN/MTX por ressonância magnética nuclear;
- 3) Realizar estudos *in vitro* dos perfis de libertação de pADN e da droga MTX dos políplexos finais;
- 4) Realizar estudos *in vitro* dos sistemas com e sem MTX, para avaliar o direcionamento/reconhecimento específico dos sistemas com MTX para as células do cancro do colo do útero e por fim avaliar também o efeito terapêutico combinado do uso do plasmídeo de interesse e da droga MTX em células tumorais do colo do útero (aplicando as metodologias referidas no ponto 1).

A terapia em estudo com a utilização de nanopartículas e introdução do fármaco MTX nas células alvo, do ponto de vista clínico, pode apresentar grande viabilidade e potencial na cura e no travar do desenvolvimento das doenças cancerígenas, nomeadamente num cancro tão devastador e mortal como o cancro do colo do útero. Ainda assim, é exetável um longo percurso para palmilhar com estudos de índole diversa a realizar para que tudo isto se torne uma realidade. Deste modo, uma nova estratégia pode surgir através de terapias combinadas que poderão trazer benefícios tais como o incremento da eficácia da terapia génica associada à quimioterapia, possibilitando em simultâneo o direcionamento específico dos sistemas às células cancerígenas e uma significativa diminuição de toxicidade mantendo as células saudáveis sem grandes efeitos colaterais.

7. Referências Bibliográficas

- Ahn, C. H., Chae, S. Y., Bae, Y. H., & Kim, S. W. (2002). Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 80(1-3), 273-282.
- Akinchina, A., & Linse, P. (2007). Diblock polyampholytes grafted onto spherical particles: Effect of stiffness, charge density, and grafting density. *Langmuir*, 23(3), 1465-1472.
- Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS Journal*, 11(4), 671-681.
- Allen, T. M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 750-763.
- Allison, A. C. (2000). Immunosuppressive drugs: The first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 63-83.
- 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.
- Bareford, L. M., & Swaan, P. W. (2007). Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(8), 748-758.
- Basarkara, A., Devineni, D., Palaniappan, R., & Singh, J. (2007). Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA. *International Journal of Pharmaceutics*, 343, 247-254.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, a D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., ... Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5235), 475-480.
- Boeckle, S., von Gersdorff, K., van der Piepen, S., Culmsee, C., Wagner, E., & Ogris, M. (2004). Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *Journal of Gene Medicine*, 6(10), 1102-1111.
- Bosch, F. X., & de Sanjose, S. (2003). Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (31), 3-13.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297-301.
- Bulk, S., Berkhof, J., & Bulkman, N. e col. (2006). Preferential of HPV 16 for squamous cell carcinoma and of HPV 18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in the Netherlands. *Brit J Cancer*, 94, 171-175.
- Burchel, A. ., Winer, R. ., Sanjosé, & Franco, E. . (2006). Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 53, 52-61.

- Carter, J. (2013). A contemporary review of uterine cancer management. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 53(6), 517-524.
- Chen, J., Huang, L., Lai, H., Lu, C., Fang, M., Zhang, Q., & Luo, X. (2014). Methotrexate-loaded PEGylated chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization, and in vitro and in vivo antitumoral activity. *Journal of American Chemical Society*, 11(7), 2213-2223.
- 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.
- Claeys, P., Anttila, A., Bonnanni, P., Finn, A., Lévy-Bruhl, D., & Soldan, K. (2008). Guidance for the introduction of HPV vaccines in EU countries, (January), 58.
- Clamme, J. P., Azoulay, J., & Mély, Y. (2003). Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 84(3), 1960-8.
- Costa, D., Valente, A. J. M., & Queiroz, J. (2015). Stimuli-responsive polyamine-DNA blend nanogels for co-delivery in cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 194-201.
- Dai, Z., Gjetting, T., Matthebjerg, M. A., Wu, C., & Andresen, T. L. (2011). Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI. *Biomaterials*, 32(33), 8626-8634.
- Davison, A. ., & Bhella, D. (2007). Comparative genome and virion structure. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis* (p. cap.14). Cambridge.
- Decuzzi, P., & Ferrari, M. (2008). The Receptor-Mediated Endocytosis of Nonspherical Particles. *Biophysical Journal*, 94(10), 3790-3797.
- 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.
- Di Gioia, S., & Conese, M. (2008). Polyethylenimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications. *Drug Design, Development and Therapy*, (2), 163-188.
- Dias, R. S., Pais, A. A. C. C., Miguel, M. G., & Lindman, B. (2003). Modeling of DNA compaction by polycations. *Journal of Chemical Physics*, 119(15), 8150-8157.
- Dietrich, J., Monje, M., Wefel, J., & Meyers, C. (2008). Clinical Patterns and Biological Correlates of Cognitive Dysfunction Associated with Cancer Therapy. *The Oncologist*, 13(12), 1285-1295.
- Direção Geral da Saúde. (2017). Norma nº 016/2016, de 16/12/2016. *Novo Programa Nacional de Vacinação - PNV*.
- 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. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32(SUPPL.), 7-15.
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525-541.
- Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., & McMillan, N. A. (1997). Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of Virology*, 71(3), 2449-56.
- Faneca, H., Cardoso, A. ., Trabulo, S., Duarte, S., & Lima, M. . (2013). *Cationic Liposome-Based Systems for Nucleic Acid Delivery: From the Formulation Development to Therapeutic Applications*. (J. Coelho, Ed.), *Center for Neuroscience and Cell Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Fehrmann, F., & Laimins, L. a. (2003). Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22(33), 5201-5207.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893-2917.
- Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-386.
- Fernandes, J. ., Araújo, J. M. ., & Fernandes, T. A. A. . (2013). Biology and natural history of human papillomavirus infection, 5, 1-12.
- Fernando, M. (2012). *Compêndio de Ginecologia Oncológico*. (Lidel, Ed.). Lisboa-Porto.
- Ferraz, L. D. C., Beatriz, A., Santos, R., & Discacciati, M. G. (2012). Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. *Journal of the Health Sciences Institute*, 30(2), 107-111.
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S., Garcea, R. L., & Finnen, L. (2003). Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. *Society*, 77(8), 4818-4826.
- Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H. P., & Kissel, T. (1999). A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., & Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24, 1121-31.
- Florea, B. I., Meaney, C., Junginger, H. E., & Borchard, G. (2002). Transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine in differentiated Calu-3 and nondifferentiated COS-1 cell cultures. *AAPS PharmSci*, 4(3), 1-11.
- Forrest, M. L., & Pack, D. W. (2002). On the Kinetics of Polyplex Endocytic Trafficking: Implications for Gene Delivery Vector Design. *Molecular Therapy*, 6(1), 57-66.

- Gabrielson, N. P., & Pack, D. W. (2009). Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *Journal of Controlled Release*, 136(1), 54-61.
- Ganguly, N., & Parihar, S. P. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of Biosciences*, 34(1), 113-123.
- Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., & Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 11(4), RA110-A121.
- Gebhart, C. L., & Kabanov, A. V. (2001). Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 401-416.
- Giacca, M., & Zacchigna, S. (2012). Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 377-388.
- Godbey, W. T., Wu, K. K., & Mikos, G. (1999). Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control Release*, 60(2-3), 149-160.
- 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.
- Goodman, L. S., & Gilman, A. (2001). As bases farmacológicas da terapêutica. In M.-H. Interamericana (Ed.) (9th ed., p. 869). Rio de Janeiro.
- Govindappagari, S., Schiavone, M. ., & Whight, J. . (2011). Cervical neoplasia. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 54, 528-536.
- Grandinetti, G., Smith, A. E., & Reineke, T. M. (2012). Membrane and nuclear permeabilization by polymeric pdna vehicles: Efficient method for gene delivery or mechanism of cytotoxicity? *Molecular Pharmaceutics*, 9(3), 523-538.
- Grm, H. S., Bergant, M., & Banks, L. (2009). Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *The Indian Journal of Medical Research*, 130(3), 277-285.
- Ho, G., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. ., & Buak, R. . (1998). Natural History of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine*, 423-428.
- Hong, S., Leroueil, P. R., Janus, E. K., Peters, J. L., Kober, M. M., Islam, M. T., ... Banaszak Holl, M. M. (2006). Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: Nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjugate Chemistry*, 17(3), 728-734.
- Hoskins, P., Swenerton, K. ., Pike, J. ., & Col., E. (2003). Small-cell carcinoma of the cervix: fourteen years of experience at a single institution using a combined-modality regimen of involved-field irradiation and platinum-based combination chemotherapy. *J Clin Oncol*, 21, 3495-35001.
- ICO. (2017). Human Papillomavirus and Related Diseases Report. In *HPV Information Centre* (p. 178).
- Ilarduya, C., Sun, Y., & Duzgunes, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes.

- European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), 159-170.
- Infarmed. (2017). Folheto informativo: Informação para o doente. Retrieved from www.infarmed.pt
- Jemal, A., Bray, F., & Ferlay, J. (1999). Global Cancer Statistics: 2011. *CA Cancer J Clin*, 49(2), 1,33-64.
- Jenison, S., Yu, X. ., Valentine, J. ., & Col, E. (1990). Evidence pf prevalent genital-tyoe human papillomavirus infections in adults and children. *J Infect Diseases*, 162, 60-69.
- Jones, C., Chih-Kaung, Ravikrishnan, A., Rane, S., & Pfeifer, B. A. (2013). Overcoming Nonviral Gene Delivery Barriers: Perspective and Future, *10/11*, 4082-4098.
- Jorge, A. F., Morán, M. C., Vinardell, M. P., Pereira, J. C., Dias, R. S., & Pais, A. A. C. C. (2013). Ternary complexes DNA-polyethylenimine-Fe(iii) with linear and branched polycations: implications on condensation, size, charge and in vitro biocompatibility. *Soft Matter*, 9(45), 10799.
- Kang, H. C., Kang, H. ., & Bae, Y. H. (2011). A Reducible Polycationic Gene Vector Derived from Thiolated Low Molecular Weight Branched Polyethyleneimine Linked by 2-Iminothiolane. *Biomaterials*, 32(4), 1193-1203.
- Kim, Y., Zhang, C., Cho, C., Cho, M., & Jiang, H. (2013). Poly (amino ester) s-Based Polymeric Gene Carriers in Cancer Gene Therapy. *Novel Gene Therapy Approaches*, 376-396.
- Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, D., Ridder, R., Rudy, W., Petry, U., ... von Knebel Doeberitz, M. (2001). Overexpression of p16 INK4A as a specific Marker For Dysplastic and Neoplastic Epithelial Cells of the Cervix Uteri. *International Journal of Cancer*, 284(July 2000), 276-284.
- Kobayashi, S., Hiroishi, K., Tokunoh, M., & Saegusa, T. (1987). Chelating Properties of Linear and Branched Poly(ethylenimines). *Macromolecules*, 20(7), 1496-1500.
- Kopatz, I., Remy, J. S., & Behr, J. P. (2004). A model for non-viral gene delivery: Through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*, 6(7), 769-776.
- Kukowska-Latallo, J. F., Candido, K. A., Cao, Z., Nigavekar, S. S., Majoros, I. J., Thomas, T. P., ... Baker Jr., J. R. (2005). Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Research*, 65(12), 5317-5324.
- Landoni, F., Maneo, A., Colombo, A., & Col, A. (1997). Randomized study of radical surgery versus radiotherapy for stage IB-IIA cervical cancer. *Lancet*, 350, 535-540.
- Larsen, A. K., Hunter, a. C., Parhamifar, L., Moghimi, S. M., & Andresen, T. L. (2010). Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. *Soft Matter*, 6(17), 4001.
- Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., ... Lukacs, G. L. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene

- transfer. *Gene Therapy*, 6(October), 482-497.
- 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, T. T., Zhao, L. N., Liu, Z. G., Han, Y., & Fan, D. M. (2005). Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World Journal of Gastroenterology*, 11(7), 931-937.
- Lin, C., & Engbersen, J. F. J. (2008). Effect of chemical functionalities in poly(amido amine)s for non-viral gene transfection. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 267-272.
- Liu, Z., Zhang, Z., Zhou, C., & Jiao, Y. (2010). Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 35(9), 1144-1162.
- 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.
- Lundstrom, K., & Boulikas, T. (2003). Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2(5), 471-486.
- Lynn, D. M., & Langer, R. (2000). Degradable Poly (beta-amino esters): Synthesis , Characterization , and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J Am Chem Soc*, 122(10), 10761-10768.
- Lyon, & France. (2007). *Human Papillomaviruses. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.* (Vol. 90).
- Macedo, A., Andrade, S., Moital, I., Moreira, A., Pimentel, F. L., Barroso, S., ... Bonfill, X. (2008). Perfil da Doença Oncológica em Portugal: Racional, Objetivos e Metodologia Estudo Perfil. *Acta Médica Portuguesa*, 4(21), 329-334.
- Mahato, M., Kumar, P., & Sharma, A. K. (2013). Amphiphilic polyethylenimine polymers mediate efficient delivery of DNA and siRNA in mammalian cells. *Molecular bioSystems*, 9(4), 780-791.
- Mahor, S., Collin, E., Dash, B. C., & Pandit, A. (2011). Controlled release of plasmid DNA from hyaluronan nanoparticles. *Current Drug Delivery*, 8, 354-362.
- Menck, C. F. M., & Ventura, A. M. (2007). Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. *Revista USP*, (75), 50-61.
- Merck & Co. (2014). Gardasil ® 9, 1(March), 1-18.
- Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J. P., & Pichon, C. (2008). Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Current Gene Therapy*, 8(5), 335-352.
- Mishra, S., Webster, P., & Davis, M. E. (2004). PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *European Journal of Cell Biology*, 83(3), 97-111.
- Mountain, A. (2000). Gene therapy: The first decade. *Trends in Biotechnology*, 18(3), 119-128.
- Mulligan, R. C. (1993). The Basic Science of Gene Therapy. *Science*, 260(5110), 926-932.

- Muñoz, N., Bosch, X., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K., ... Meijer, C. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-27.
- Neuberg, P., & Kichler, A. (2014). *Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines*. *Advances in Genetics* (Vol. 88). Elsevier.
- Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., & Wagner, E. (1998). The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Therapy*, 5, 1425-1433.
- 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.
- Park, T. G., Jeong, J. H., & Kim, S. W. (2006). Current status of polymeric gene delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(4), 467-486.
- Peng, L., Liu, M., Xue, Y. N., Huang, S. W., & Zhuo, R. X. (2009). Transfection and intracellular trafficking characteristics for poly(amidoamine)s with pendant primary amine in the delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 30(29), 5825-5833.
- 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.
- Pfister, H., & Kleiner, E. (1991). State of the art regarding evidence of viral origin of cervical cancer. *Cancer Res*, 122:100-105.
- Pinto, M. F. V., Morán, M. C., Miguel, M. G., Lindman, B., Jurado, A. S., & Pais, A. A. C. C. (2009). Controlling the morphology in DNA condensation and precipitation. *Biomacromolecules*, 10(6), 1319-1323.
- Pista, A., Oliveira, C., Cunha, M. J., Paixão, T., Real, O., & Group, C. P. S. (2011). Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Women in Portugal - The CLEOPATRE Portugal Study. *Int J Gynecol Cancer*, 21(6), 1150-8.
- Pollard, H., Toumaniantz, G., Amos JL, Avet-Loiseau, H., Guihard, G., Behr, J., & Escande, D. (2001). Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *Journal of Gene Medicine*, 3, 153-164.
- Putnam, D. (2001). Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1200-1205.
- 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.
- Rejman, J., Bragonzi, A., & Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Molecular Therapy*, 12(3), 468-474.
- Remy, J. S., Abdallah, B., Zanta, M. A., Boussif, O., Behr, J. P., & Demeneix, B. (1998). Gene

- transfer with lipospermines and polyethylenimines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30(1-3), 85-95.
- Reschel, T., Konák, C., Oupický, D., Seymour, L. W., & Ulbrich, K. (2002). Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *Journal of Controlled Release*, 81(1-2), 201-217.
- 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.
- Robert, M. ., & Fu, Y. . (1990). Squamous cell carcinoma oh the uterine cervix: a review with emphasis on prognostic factors and unusual variants. *Semin Diagn Patol*, 7, 173-189.
- Rocha, R., & Verdasca, N. (2017). _ Primeiro estudo em Portugal sobre a identificação dos genótipos do vírus do papiloma humano (HPV) numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa, 51, 4-9.
- 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.
- Sack, B. K., & Herzog, R. W. (2009). Evading the immune response upon in vivo gene therapy with viral vectors. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11(5), 493-503.
- Santos, J. L., Ren, Y., Vandermark, J., Archang, M. M., Williford, J. M., Liu, H. W., ... Mao, H. Q. (2016). Continuous Production of Discrete Plasmid DNA-Polycation Nanoparticles Using Flash Nanocomplexation. *Small*, 12(45), 6214-6222.
- Schatzlein, A. G. (2001). Non-viral vectors in cancer gene therapy: Principles and progress. *Anti-Cancer Drugs*, 12(4), 275-304.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., & Tate, P. (2001). *Anatomia e Fisiologia* (1^a). Lusodidacta. Loures.
- Shi, Y., Ding, J., Liu, X., & Wang, J. (1999). NiFe₂O₄ ultrafine particles prepared by co-precipitation/mechanical alloying. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 205(2), 249-254.
- Shovsky, A., Varga, I., Makuška, R., & Claesson, P. M. (2009). Formation and stability of water-soluble, molecular polyelectrolyte complexes: Effects of charge density, mixing ratio, and polyelectrolyte concentration. *Langmuir*, 25(11), 6113-6121.
- Shovsky, A. V, Varga, I., Makuska, R., & Claesson, P. M. (2009). Formation and Stability of Soluble Stoichiometric Polyelectrolyte Complexes: Effects of Charge Density and Polyelectrolyte Concentration. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(6), 980-988.
- Snijders, P. J. F., Steenbergen, R. D. M., Heideman, D. A. M., & Meijer, C. J. L. M. (2006). HPV-mediated cervical carcinogenesis: Concepts and clinical implications. *Journal of Pathology*, 208(2), 152-164.
- Solomon, D. (1989). The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *Ata Cytol*, 33: 567-574.

- Stanley, M. A. (2009). Immune responses to human papilloma viruses. *Indian J Med Res*, 130(3), 266-276.
- Suh, J., Paik, H., & Hwang, B. . (1994). Ionization of Poly(ethylenimine) and Poly(allylamine) at Various pH's.
- Tang, M. X., & Szoka, F. C. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy*, 4(February), 823-832.
- Thierry, F. (1993). Proteins involved in the control of HPV transcription. *Papillomavirus Report*, 4, 27-32.
- Valente, J. F. A., Sousa, A., Queiroz, J. A., & Sousa, F. (2014). Selective purification of supercoiled p53-encoding pDNA with l-methionine-agarose matrix. *Analytical Biochemistry*, 459(April 2015), 61-69.
- Ventura, M. ., Freitas, M. ., Francisca, A., Leça, A., Gonçalves, G., Azevedo, J., ... Fernandes, T. M. . (2008). Vacinação contra infecções por Vírus do Papiloma Humano (HPV). *Relatório Não Publicado Da Comissão Técnica de Vacinação: Direcção-Geral Da Saúde.*, 8-19.
- Verma, I. M., & Weitzman, M. D. (2005). GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 711-738.
- Von Harpe, A., Petersen, H., Li, Y., & Kissel, T. (2000). Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 69(2), 309-322.
- Wightman, L., Kircheis, R., Rössler, V., Garotta, S., Ruzicka, R., Kurs, M., & Wagner, E. (2001). Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *Journal of Gene Medicine*, 3(4), 362-372.
- 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.
- Woodman, C. ., Collins, S. ., Young, C. ., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues - ProQuest. *Nature Reviews Cancer*, 7(January), 11-22.
- Xu, Z.-N., Shen, W.-H., Chen, H., & Cen, P.-L. (2005). Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(5), 396-400.
- 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. Retrieved from
- Yue, Y., Jin, F., Deng, R., Cai, J., Dai, Z., Lin, M. C. M., ... Wu, C. (2011). Revisit complexation between DNA and polyethylenimine - Effect of length of free polycationic chains on gene transfection. *Journal of Controlled Release*, 152(1), 143-151.

- Yue, Y., & Wu, C. (2013). Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. *Biomaterials Science*, 152-170.
- Zhi, D., Zhang, S., Cui, S., Zhao, Y., Wang, Y., & Zhao, D. (2013). The headgroup evolution of cationic lipids for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 24(4), 487-519.