

Formulação de nanopartículas para terapia do cancro de pulmão

Karol Brigitte Moreira Jiménez

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

Orientador: Prof. Doutora Carla Patrícia Alves Freire Madeira Cruz

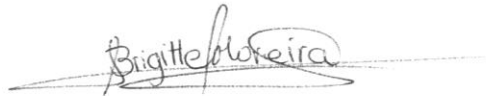
Março de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Karol Brigitte Moreira Jiménez, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10456 de/o 2º Ciclo em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 06 / 03 / 2023

A handwritten signature in black ink that reads "Brigitte Moreira". The signature is written in a cursive style and is underlined with a horizontal line.

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer profundamente à minha orientadora, a Professora Doutora Carla Cruz, pela oportunidade de desenvolver este trabalho no seu grupo de investigação, pelos ensinamentos e também por todo o apoio durante este percurso.

Também gostaria agradecer à pessoa que orientou os meus primeiros passos no laboratório e me acompanhou durante o desenvolvimento deste trabalho, um enorme obrigada à Joana Figueiredo pelo apoio e paciência durante este processo.

O próximo agradecimento é para a Jéssica Nunes, que também me acompanhou e ensinou muitas coisas durante este percurso.

Agradeço de forma especial à equipa do G4 que sempre me ajudou ao longo deste percurso. Obrigada pela disponibilidade que sempre tiveram, pelo conhecimento que me transmitiram e pela amizade. Obrigada Daniela, André, Tiago e Bernardo.

Agradecimentos especiais também ao Josué Carvalho, que, embora não tenha tido o prazer de o conhecer pessoalmente, o seu trabalho e investigação foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Um muito obrigada a minha família e amigos que representam um pilar fundamental na minha vida. Obrigada aos meus avós, Zoila e Rosalino, por me apoiarem sempre para o conseguir, um obrigada também para meus tios, muito especialmente a minhas às tias Silvia e Gaby. Obrigada às minhas irmãs, por me terem impulsionado a conseguir os meus sonhos, por toda a ajuda e por acreditarem em mim sempre.

Um obrigada especial a Javier, por ser o meu apoio constante durante este tempo, por estar ao meu lado nos meus triunfos e ainda mais nos meus fracassos. Obrigada pelo apoio, compreensão e amor.

Também quero agradecer a Portugal, um país maravilhoso que me acolheu e que guardo com profundo afeto no meu coração e que considero o meu segundo lar. Obrigada por todas as experiências, oportunidades, aventuras, alegrias e tristezas ao longo da minha viagem universitária.

Finalmente, o meu maior agradecimento, o meu maior obrigada, é para a pessoa a quem dedico esta dissertação, a minha mãe. Eu sou e estou aqui por ti, porque sempre dás o teu melhor, pelo teu apoio incondicional. Obrigada por nunca me deixar sozinha, por me aconselhar, me orientar e me apoiar. Amo-te

Resumo

O cancro de pulmão (CP) é considerado uns dos cancros mais agressivos na atualidade, com alta prevalência a nível mundial e uma elevada taxa de mortalidade. O subtipo mais comum do cancro de pulmão é o cancro de pulmão de não pequenas células (CPNPC), sendo diagnosticado em estadios avançados.

As principais opções terapêuticas utilizadas no CPNPC, como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, são imensamente invasivas para o paciente e, apresentam uma eficácia limitada que está associada à baixa seletividade dos fármacos ao tecido tumoral, apresentando efeitos secundários indesejáveis provocados pela toxicidade não específica.

Para tentar ultrapassar estas limitações, o estudo e o desenvolvimento de sistemas de entrega direcionada de medicamentos usando nanopartículas tem emergido como alternativa promissora nos últimos anos. As nanopartículas oferecem várias vantagens sobre a entrega convencional de fármacos, nomeadamente em termos de estabilidade e especificidade. Os aptameros de G-quadruplex (G₄) de ácido desoxirribonucleico (ADN), são estruturas secundárias não canónicas de ácidos nucleicos, capazes de reconhecer e ligar-se a alvos celulares com alta afinidade.

Neste trabalho, utilizou-se um aptamero G₄ de ADN, AS1411-lípido modificado, e analisou-se a sua capacidade de formar estruturas micelares, especificamente nanoagregados em solução. Os nanoagregados foram carregados com o fármaco anticancerígeno gemcitabina (GEM).

O tamanho e a morfologia do nanossistema formado foi caracterizado utilizando as técnicas de eletroforese em gel de agarose, espalhamento dinâmico da luz, microscopia eletrónica de transmissão e de varrimento. A técnica de dicroísmo circular (CD), foi utilizada de forma a analisar o efeito da conjugação lipídica na estrutura conformacional do aptamero AS1411. O efeito do nanossistema na viabilidade celular, foi avaliado *in vitro* numa linha celular do cancro de pulmão (A549) e numa linha celular de fibroblastos normais da derme humana (NHDF).

Palavras chaves:

Cancro de pulmão de não pequenas células; entrega direcionada; aptamero; AS1411-lípido modificado; nanoagregados.

Abstract

Lung cancer is considered one of the most aggressive cancers in actuality, with a high prevalence and mortality rate in worldwide. The most common subtype of lung cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC), being diagnosed in advanced stages.

The main therapeutic options used against NSCLC, such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy, are immensely invasive for the patient and, have a limited efficacy that is associated with low selectivity of the drugs to the tumour tissue and undesirable side effects caused by non-specific toxicity.

In recent years, the study and development of targeted drug delivery systems using nanoparticles has been of great interest. Nanoparticles offer several advantages over conventional drug delivery in terms of stability and high specificity. Aptamers are used as selective targeting agents for various nanoparticles. G4 aptamers of DNA, are non-canonical secondary structures of nucleic acids, capable of recognizing and binding to cellular targets with high affinity.

In this work, a modified AS1411-lipid sequence was used and its ability to form micellar structures, specifically nanoaggregates in solution, was analysed. The nanoaggregates were loaded with the drug gemcitabine (GEM).

The size and morphology of formed nanosystem was characterized using techniques such as agarose gel electrophoresis, dynamic light scattering, transmission and scanning electron microscopy. The circular dichroism (CD) technique was used to analyse the effect of lipid conjugation on the conformational structure of the aptamer AS1411. The cytotoxicity of nanosystem was *in vitro* assessed against one lung cancer cell line (A549) and in normal human dermal fibroblasts cell line (NHDF).

Keywords:

Non-small cell lung cancer; targeted delivery; aptamer; AS1411-lipid modified; nanoaggregates.

Índice

Capítulo 1	1
1. Introdução	1
1.1. Cancro de Pulmão	1
1.2. Ácidos nucleicos	6
1.3. G-quadruplex (G4)	8
1.4. Aptameros	10
1.4.1. Aptameros como agente de entrega de fármacos	13
1.5. Nanossistemas como sistema de entrega de fármacos	14
1.6. AS1411 como aptamero G4	18
1.7. AS1411 como sistema de entrega de medicamentos	21
1.7.1. Conjugado AS1411-agente terapêutico	21
1.7.2. Conjugado AS1411-nanopartícula	22
Capítulo 2	26
2. Objetivos do trabalho	26
Capítulo 3	27
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Síntese e Purificação do aptamero	27
3.2. Formação de nanoagregado	27
3.3. Caracterização dos nanoagregados	28
3.3.1. Eletroforese em gel de agarose	28
3.3.2. DLS	29
3.3.3. MEV	29
3.3.4. MET	29
3.3.5. CD	30
3.4. Libertação da GEM	30
3.5. Ensaio de viabilidade celular	30
Capítulo 4	32
4. Resultados e Discussão	32
4.1. Caracterização de nanoagregados AS1411-lípido modificado	33
4.1.1. Eletroforese em gel de agarose	33
4.1.2. Dispersão dinâmica da luz	36
4.1.3. Técnicas de microscopia eletrônica	38
4.1.4. Dicroísmo circular	39
4.2. Libertação da GEM	40
4.3. Ensaio de viabilidade celular	42
Capítulo 5	47
5. Conclusões e Perspetivas futuras	47
Referências	49

Lista de Figuras

Figura 1: Características distintivas para o desenvolvimento do cancro. Adaptado de [1, 5].	2
Figura 2: Estatísticas do Cancro no mundo (A) e em Portugal (B) em ambos sexos segundo dados obtidos da GLOBOCAN 2020. As barras azuis representam a incidencia e as barras vermelhas representan a mortalidade, dos diferentes cancros. Adaptado de [10].	3
Figura 3: Ilustração esquemática dos diferentes estadios do CPCNP. O progresso desta doença leva ao aumento tumoral e posteriormente à metástase distante a diferentes órgãos como o fígado, ossos, cérebro ou rim. Adaptado de [13].	4
Figura 5: Estruturas de ADN, que contêm três ou quatro cadeias: (A) Ilustração esquemática do triplex e do padrão de emparelhamento de bases (T-A: T e C-G:C); (B) Ilustração do quadrúplex e na parte inferior se representa o padrão de emparelhamento de bases no tetraplexo. Adaptado de [48].	7
Figura 4: Comparação das formas A, B e Z do ADN. Adaptado de [42].	7
Figura 6: Estrutura de G4. (A) Estrutura química do G-quarteto mostrando a ligação de hidrogénio de Hoogsteen entre os pares de G e um catião monovalente central que estabiliza a estrutura 3D; (B) Estrutura esquemática de G4. Adaptado de [50, 55].	8
Figura 7: Topologias de G4: Consoante as cadeias constituintes: (A) tetramolecular, (B) bimolecular, (C-F) intramolecular; Diferentes tipologias consoante a <i>loop</i> : (B,C) <i>loop</i> lateral, (D) <i>loops</i> de duas cadeias, também denominado como hélice, (E) dois <i>loops</i> laterais e um diagonal; Diferentes tipologias consoante à orientação das cadeias: (A) paralelo - todas as cadeias na mesma direção, (B) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a uma paralela e a outra antiparalela, (C) antiparalelo – duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a duas cadeias antiparalelas, (F) antiparalelo – três cadeias na mesma direção e uma na direção contraria. Adaptado de [55].	9
Figura 8: Representação esquemática do método SELEX. Adaptado de [66].	12
Figura 9: Mecanismo do direcionamento ativo. Adaptado de [84].	16
Figura 10: Representação esquemática dos vários nanossistemas utilizados para o tratamento do CPCNP e a suas características principais. (a) Nanolipossomas, (b) NPs lipídicas, (c) portadores lipídicos nanoestruturados, (d) NPs poliméricas, (e)	

dendrímeros, (f) micelas poliméricas, (g) nanopartículas de ouro e (h) grafeno. Adaptado de [75].	17
Figura 11: Ilustração da variedade de estruturas às quais o AS1411 foi conjugado para ser utilizado como agente de entrega direcionada no cancro. Adaptado de [91].	21
Figura 12: Representação esquemática da auto-organização lipídica de G4 tetramoleculares paralelos. Dependendo da natureza do lípido, da sequência de oligonucleótidos e dos sais presentes, o paralelo tetramolecular G4 pode formar estruturas micelares. Adaptado de [69].	24
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1: marcador 1 kB; Poço 2: marcador 25 bp; Poço 3: 5'-lípido-AS1411 (5 µM) em tampão 1×; Poço 4: 5'-lípido-AS1411 (20 µM) em água.	34
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1%. Poço 1: marcador 1kb; Poço 2: marcador 25 bp; Poço 3: nanoagregados com GEM (15 µM); Poço 4: nanoagregados com GEM (30 µM); Poço 5: nanoagregado (5 µM); Poço 6: tampão 1×; Poço 7: AS1411-lípido (5 µM).	35
Figura 15: Distribuição de tamanho de acordo à intensidade. (A) Análise DLS de nanoagregados formados por 5'-lípido-AS1411 em tampão 1×. São observados dois picos de intensidade (pico 1: 15.67 ± 0.57 nm; pico 2: 104.59 ± 4.23 nm) e (B) Análise DLS de nanoagregados 5'-lípido-AS1411 encapsulando a GEM (30 µM). São observados, dois picos de intensidade (pico 1: 145.13 ± 52.2 nm; pico 2: 904.7 ± 185.8 nm).	37
Figura 16: Distribuição de tamanho de acordo à intensidade de nanoagregados formados por 5'-lípido-AS1411 numa concentração de 10 µM em tampão 1×. São observados dois picos de intensidade (pico 1: 17.47 ± 2.57 nm ; pico 2: 252.3 ± 15.47 nm)	38
Figura 17: Micrografias obtidas utilizando MEV de (A) nanoagregados formados por 5'-lípido-AS1411 em tampão 1x (ampliação 12 000×), onde foram medidas duas partículas, (D1: 199 nm; D2: 221 nm e de (B) nanoagregados 5'-lípido-AS1411 encapsulando 30 µM de GEM (ampliação 20 000×) (D1: 147 nm; D2:343 nm; D3:326 nm; D4:488 nm). Micrografias obtidas mediante análises MET de (C) nanoagregados formados a partir 5'-lípido-AS1411 em tampão 1× (ampliação 25 000×) e de (D) nanoagregados 5'-lípido-AS1411 encapsulando 15 µM de GEM (ampliação 25 000×).	39
Figura 18: Espectro de CD de 5'-lípido-AS1411 em tampão 1×, onde se apresentam bandas características de uma estrutura G4 paralela.	40

Figura 19: Representação gráfica do método de diálise. Adaptado de [117].	40
Figura 20: Perfil de liberação cumulativa da GEM dos nanoagregados 5'-lípidio-AS1411 em tampão 1×	41
Figura 21: Percentagem da viabilidade celular de acordo ao contro do fármaco GEM em diferentes concentrações, nas linhas celulares A549 e NHDF.	43
Figura 22: Percentagem de viabilidade celular provocada nas linhas celulares A549 e NHDF pelo nanoagregado formado a partir de 5'-lípidio-AS1411 em diferentes concentrações.	44
Figura 23: Percentagem da viabilidade celular induzida pelo nanoagregado carregado com GEM em concentrações entre 0.001 – 10 µM, mantendo uma proporção de 1:6, oligo-lípido:GEM.	45
Figura 24: (A) Curvas dependentes da concentração de viabilidade celular de acordo ao controlo em (i) A549 e (ii) NHDF, após incubação de GEM em concentrações entre 0.001 – 100 µM, durante 72 h e (B) Curvas dependentes da concentração de viabilidade de acordo ao controlo em (i) A549 e (ii) NHDF, após incubação do nanoagregado com GEM em concentrações entre 0.001 – 10 µM, durante 72 h.	46

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação das principais características entre os aptameros e os anticorpos. Adaptado de [62, 64, 65].	11
Tabela 2: Concentrações de cada estímulo utilizado nos ensaios de viabilidade celular.	31
Tabela 3: Caracterização dos nanoagregados em termos de tamanho e polidispersibilidade. Os dados da tabela correspondem à média das 3 leituras da amostra. O desvio padrão foi calculado para as 3 medições.	36
Tabela 4: Percentagem de libertação da GEM ao longo do tempo.....	42

Lista de Acrónimos

°C	Graus celsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
A	Adenina
A549	Linha celular humana de cancro de pulmão
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALK	Translocação da cinase do linfoma anaplásico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribossomal
BRAF	Proteína cinase, serina/treonina/homólogo B do oncogene do sarcoma murino v-Raf
C	Citosina
CD	Dicroísmo circular
CMC	Concentração micelar crítica
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Cancro de pulmão
CPNPC	Cancro de pulmão de não pequenas células
CPPC	Cancro de pulmão de pequenas células
DLS	Dispersão dinâmica da luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxorrubicina
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aprimorado
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos
G	Guanina
g/L	Gramas por litro
G4	G-quadruplex
GEM	Gemcitabina
GST	Genes Supressores de tumores
h	Hora
HEPES	(ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC ₅₀	Concentração que induz 50% de inibição proliferativa
KCl	Cloreto de Potássio
K _D	Constante de dissociação
kDa	Quilodalton
KRAS	Homólogo de oncogene do vírus do sarcoma de rato Kirsten
LKB1	Proteína cinase, serina/treonina codificada pelo gene STK11
M	Metástase
MET	Microscopia eletrónica de transmissão
MEV	Microscopia eletrónica de varrimento
mg	Miligramma
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miARN	Micro ácido ribonucleico
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico

NaCl	Cloreto de sódio
NCL	Nucleolina
NHDF	Fibroblastos normais da derme humana
nM	Nanomolar
nm	Nanométros
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da saúde
PBS	Solução salina com tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDI	Índice de dispersão
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho
SELEX	Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial
SEM	Erro padrão
SFB	Soro fetal de bovino
T	Timina
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tel ₂₆	Telómero humano 26
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TMN	Classificação de Tumores Malignos
TP53	Proteína do tumor 53
U	Uracilo
unidades/mL	Unidades por mililitro
UV	Ultravioleta
<i>z-Average</i>	Tamanho hidrodinâmico médio de partícula
β-CD-PELA	Poli(etileno glicol)-b-polilactídeo
ε	Coefficiente de extinção molar
λ	Comprimento de onda (nm)

Capítulo 1

1. Introdução

1.1. Cancro de Pulmão

O Cancro pode ser caracterizado pelo crescimento celular anormal, invasão e disseminação de células malignas, do local de origem, para outros locais do corpo [1]. As células malignas provêm de células normais através um processo progressivo de transformação celular que requer uma elevada taxa de mutações e podem surgir como consequência de danos no genoma. Estes danos, podem ser resultante quer de processos endógenos, quer de agentes exógenos [1–3].

A indução de dano no ADN por processos endógenos pode acontecer devido a erros durante a sua replicação, a formação de radicais livres e a instabilidade química das suas ligações. Enquanto que no dano causado por agentes exógenos existe uma grande variedade de causas, sendo as mais conhecidas a radiação ionizante, radiação ultra violeta (UV), substâncias químicas cancerígenas e vários agentes específicos denominados agentes carcinogénicos [2–4].

Cada cancro tem uma origem, tendo assim características distintivas sendo que o fator de risco que pode causar o seu desenvolvimento em cada tecido alvo é diferente. Contudo, têm-se definido algumas características distintivas para o desenvolvimento da maioria dos cancros (Figura 1), designadas como “marcas do cancro”, que incluem a capacidade de adquirir sinais de crescimento autónomos, a evasão de sinais inibitórios de crescimento, a evasão da morte celular apoptótica, a ativação de mecanismos de evasão e metástase, o potencial de replicação ilimitado, a indução da angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos), a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da ação imunológica. Estas capacidades adquiridas permitem que as células cancerosas sobrevivam, proliferem e se disseminem [1, 5, 6].

A instabilidade do genoma, que gera diversidade genética, pode representar um papel determinante no desenvolvimento do cancro. A acumulação de múltiplas alterações genéticas pode afetar a atividade e/ou expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalização celular, conferindo características proliferativas e invasivas de crescimento nas células tumorais [5, 6].

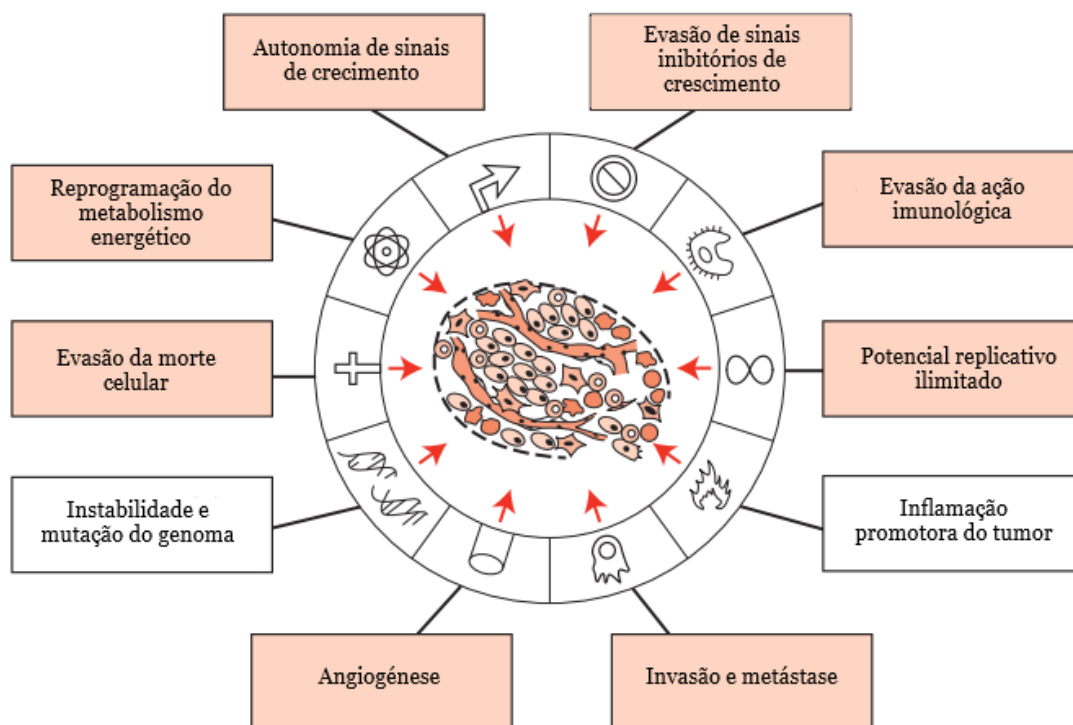


Figura 1: Características distintivas para o desenvolvimento do cancro. Adaptado de [1, 5].

O cancro é uma das principais causas de morte a nível mundial, tendo sido principal causa de morte prematura em todos os países do mundo [7, 8]. Embora a Europa represente 9,8% da população mundial total, a incidência de casos de cancro é estimada em 22,8%, representando uma proporção significativa [9].

O CP é um dos mais comuns de todos os tumores malignos e, os novos casos e mortes associadas estão a aumentar ao longo dos anos. As estatísticas apresentadas em 2020 pela GLOBOCAN (Figura 2) estimaram cerca de 2,2 milhões de casos novos (11,4% do total de casos de cancro) e 1,8 milhões de mortes (18,0% do total de casos de cancro), números maiores do que os reportados no ano 2018 (2,09 milhões de casos e 1,76 milhões de mortes) [7, 9]. Em Portugal, o CP representa o quarto cancro mais incidente, com aproximadamente 5415 novos casos e com 4797 mortes associadas [10].

O CP resulta de um acúmulo sequencial de alterações genéticas e morfológicas de células epiteliais do pulmão que dão forma a um tumor maligno, podendo disseminar para outras partes do corpo [11]. As alterações podem ocorrer ao nível do silenciamento genético através da metilação, alteração na sequência do ADN, amplificação ou eliminação de segmentos de ADN [12].

O CP é muito heterogéneo, e pode surgir em diversos locais da árvore brônquica, apresentando assim, sintomas bastantes variáveis, dependendo da localização

anatômica do tumor. Na maioria das vezes o desenvolvimento do CP não apresenta sintomas associados sendo que, em muitos casos, as pessoas diagnosticadas com CP apresentam a doença num estadio avançado [13].

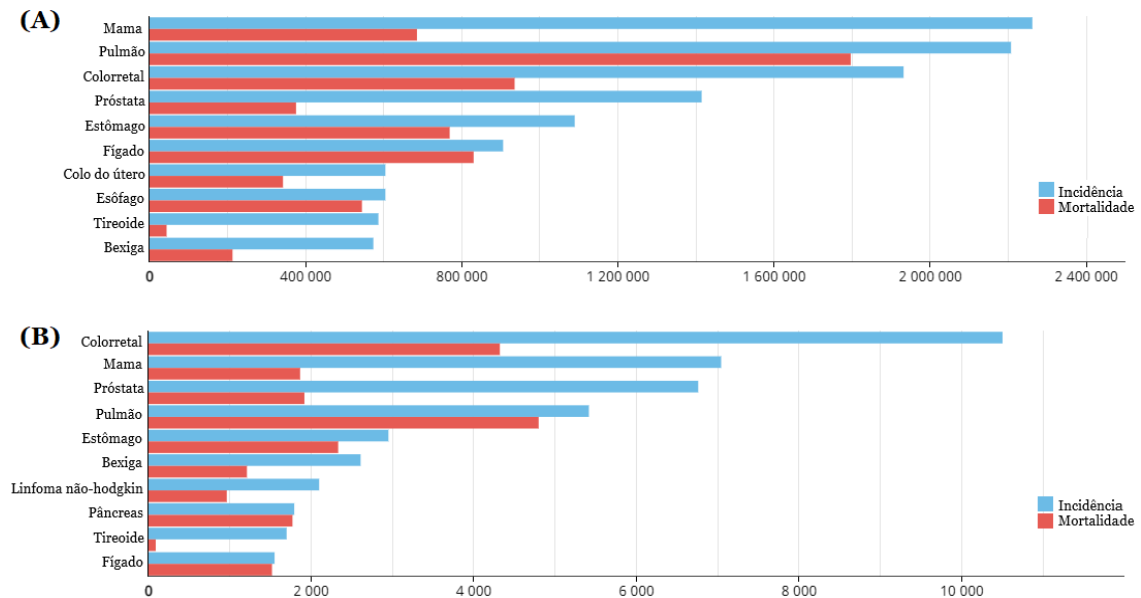


Figura 2: Estatísticas do Cancro no mundo (A) e em Portugal (B) em ambos sexos segundo dados obtidos da GLOBOCAN 2020. As barras azuis representam a incidência e as barras vermelhas representam a mortalidade, dos diferentes cancros. Adaptado de [10].

O uso excessivo e prolongado do tabaco é o principal fator de risco para o CP. Estima-se que entre 75-80% das mortes por CP sejam devido a esta atividade. O fumo do tabaco é um aerossol complexo, que possui aproximadamente 20 agentes carcinógenos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, *N*-nitrosaminas e outros componentes orgânicos e inorgânicos [14–16]. Os não fumadores podem desenvolver a doença mediante a inalação passiva das substâncias nocivas do tabaco [17]. Os cigarros eletrónicos, doenças respiratórias crónicas, a poluição de ar, a exposição à radiação, a suscetibilidade hereditária e uma dieta desequilibrada aumentam também a incidência de CP [15, 18].

Não existem sinais ou sintomas que sejam especificamente diagnósticos de CP, mas existem alguns sintomas que se relacionam com o tamanho e a localização do tumor primário e a presença de metástases. Assim, os sintomas mais comuns incluem tosse, dispneia, perda de peso, hemoptise e dor no peito [13, 19].

Para avaliar o estadio do CP utiliza-se o sistema internacional de Classificação de Tumores Malignos (TMN), que descreve a extensão do tumor primário e a disseminação do tumor no corpo. Este sistema baseia-se nas características do tumor primário, no grau de propagação para os gânglios linfáticos e na ausência ou existência

de metástase. Desta forma cada componente é classificado conforme a progressão do cancro [13, 14, 20].

O CP em estadio I e II representa 15% dos casos de diagnóstico, sendo que esses tumores podem ser retirados mediante resseção cirúrgica. O estadio IV, que é o mais avançado representa aproximadamente 50% dos casos [14]. Na Figura 3 pode-se observar de forma gráfica os diferentes estádios do CP e a sua progressão.

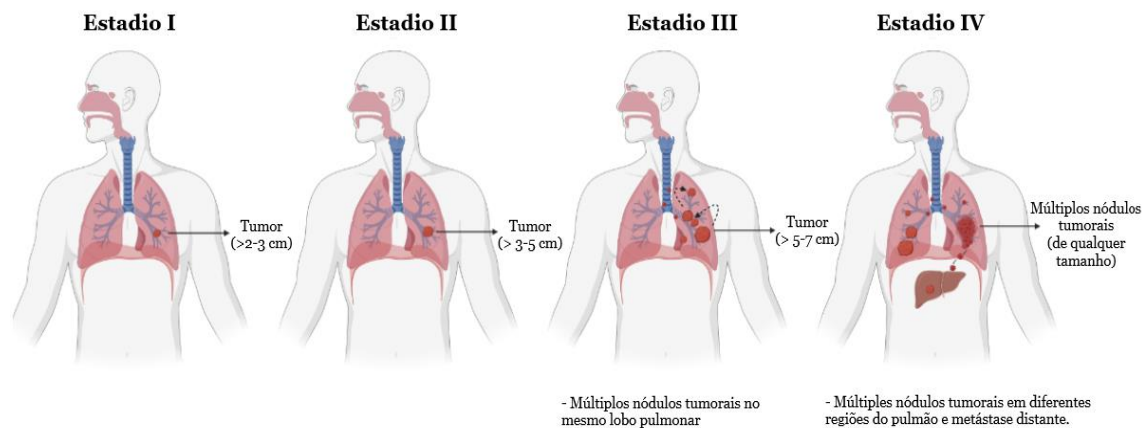


Figura 3: Ilustração esquemática dos diferentes estádios do CPCNP. O progresso desta doença leva ao aumento tumoral e posteriormente à metástase distante a diferentes órgãos como o fígado, ossos, cérebro ou rim. Adaptado de [13].

Histologicamente, o CP pode ser dividido em dois grupos, o cancro de pulmão de pequenas células (CPPC), que representa aproximadamente 15% de todos os casos de carcinomas pulmonares e o CPNPC, responsável pelos restantes 85% [11, 21, 22]. A Organização mundial da saúde (OMS) classificou o CPNPC em três tipos principais que são adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células grandes [23].

O adenocarcinoma é o tipo mais comum (40% dos cancros de pulmão) é propenso a crescer na periferia do pulmão e apresenta mais metástases do que o carcinoma de células escamosas. O carcinoma de células escamosas, é o tipo de CPNPC mais frequentemente associados ao tabagismo. Por último, o carcinoma de células grandes representa aproximadamente 10-15% dos casos de CP, e tende a crescer num local periférico com metástase precoce [14, 24, 25].

O CPNPC desenvolve-se mediante um processo de várias etapas, que integram múltiplas alterações genéticas e epigenéticas. Estas alterações podem afetar as vias de sinalização, especificamente provocam a ativação de vias promotoras de crescimento e a inibição de vias supressoras de tumores [26, 27]. As alterações genéticas precoces

mais comuns no CPNPC incluem a perda das regiões genômicas dos cromossomas 3p e 9p, eliminação do braço cromossômico 5p, e mutações p53 e KRAS [12].

A ativação de oncogenes promotores de crescimento pode ocorrer pela amplificação do gene ou por outras alterações genéticas, como mutações do ponto e rearranjos estruturais que levam à sinalização descontrolada das vias oncogénicas [26, 28].

O proto-oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten (KRAS) codifica uma proteína que regula vários processos celulares fundamentais, que inclui a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular [29, 30]. A mutação em KRAS está associada ao tabagismo, é principalmente encontrada no adenocarcinoma pulmonar e identifica-se como um marcador de prognóstico negativo [31–33]. A mutação de KRAS, provoca a transformação das células epiteliais do pulmão, mediante a ativação da via quinasa ERK-MAP [12].

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) regula a proliferação e diferenciação epitelial. As mutações no EGFR ocorrem em aproximadamente 20% dos casos de CPNPC, sendo mais comuns em pacientes do sexo feminino e sem historial de tabagismo [11, 34, 35]. Outros proto-oncogenes alterados incluem BRAF, MEK-1, HER2, ALK [26, 36, 37].

Os genes supressores de tumores (GST) são importantes reguladores negativos do crescimento celular normal, e quando mutados esta função é alterada. A alteração do gene TP53 ocorre em aproximadamente 60% dos casos de CPNPC. Estudos recentes mostraram que a alteração deste gene confere à sua proteína novas atividades, contribuindo ativamente na progressão tumoral [26, 36]. Outros GST alterados nesta doença são PTEN, STK53 e LKB1 [11].

As principais opções terapêuticas para o CPNPC incluem a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A ressecção cirúrgica ocorre em apenas 15% de todos os casos e a maioria dos pacientes inicia o tratamento em estadios avançados. Estes métodos são muito invasivos para o paciente, têm uma eficácia limitada e apresentam efeitos secundários indesejáveis devido à sua toxicidade não específica [38]. Devido à estrutura heterogénea do tumor e a ocorrência de metástases extensas em estadios avançados os resultados de tratamentos como radio e quimioterapia, são insatisfatórios. Da mesma forma, a entrega de fármacos não específica aos tecidos tumorais, é também responsável pelo aumento da resistência do tumor aos fármacos e à reincidência de aparecimento do tumor provocado pelas células tumorais residuais [39].

Desta forma, as terapias convencionais têm várias limitações, que estão associadas à baixa seletividade dos fármacos ao tecido tumoral, que também provoca uma rápida eliminação do corpo. Como alternativa, administra-se uma dose mais alta, produzindo maior toxicidade e provocando danos aos tecidos adjacentes [39, 40]. Desta forma surge a necessidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas para tratar o CP e obter melhores resultados clínicos.

1.2. Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são macromoléculas responsáveis pela replicação, armazenamento e expressão do material genético. Estas moléculas são formadas por unidades monoméricas denominadas nucleótidos, unidos por ligações fosfodiéster. Cada nucleótido é composto por um grupo fosfato, uma pentose (açúcar) e uma base azotada (purina ou pirimidina), unidos por ligações covalentes. Existem dois tipos de ácidos nucleicos: o ADN e o ácido ribonucleico (ARN) [41]. As bases azotadas descritas, são purinas e pirimidinas. Tanto no ADN como no ARN há duas bases purinas principais que são a adenina (A) e a citosina (C), no entanto, as pirimidinas variam entre os ácidos nucleicos, sendo que o ADN contém guanina (G) e timina (T), e no ARN esta última base é substituída pelo uracilo (U). As pentoses podem aparecer em duas classes, 2-deoxi-*D*-ribose e a *D*-ribose, que correspondem ao ADN e ao ARN, respetivamente [41, 42].

Desde a sua descoberta que, o ADN tem sido fortemente estudado, especialmente em relação à sua estrutura e função. Em 1953 Watson e Crick propuseram um modelo tridimensional da estrutura do ADN que consiste em duas cadeias antiparalelas helicoidais de ADN enroladas em torno do mesmo eixo para formar uma dupla hélice. Também destacaram a complementaridade das sequências de bases nas duas cadeias, que se atribui à ligação de hidrogénio entre pares de bases, oferecendo maior estabilidade à dupla hélice. Esta descoberta ajudou no entendimento da herança biológica [42–44]. Diferentes tipos de interação (repulsão dos grupos fosfato carregados, a formação de ligações de hidrogénio entre as bases e a interação de empilhamento entre as superfícies planas dos pares de bases) controlam as deslocações estruturais observadas no ADN e no ARN [45].

O ADN é uma molécula extremamente flexível e pode adotar estruturas secundárias alternativas. O modelo de dupla hélice também conhecida como forma B do ADN (B-ADN) é a estrutura mais estável sobre condições fisiológicas, no entanto também pode estar presente na forma A do ADN (A-ADN) e na forma Z (Z-ADN) (Figura 5) [42, 46].

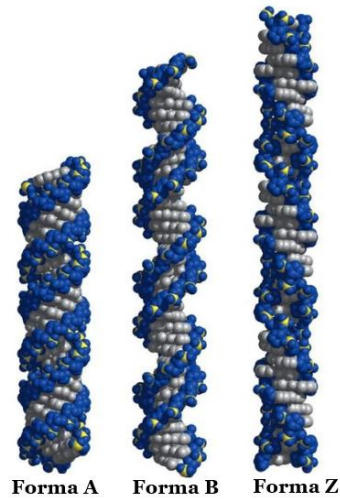


Figura 5: Comparação das formas A, B e Z do ADN. Adaptado de [42].

O ADN pode assumir outras estruturas que incluem variações na dupla hélice, chamadas de estruturas não canônicas. Os nucleótidos podem formar ligações de hidrogênio adicionais para ligar outra cadeia através das posições Hoogsteen, que permitem a formação de ADN triplex e quadruplex (Figura 4) [42, 47].

Na formação do triplex, a terceira fita é inserida no sulco principal do B-ADN e unida por ligações de hidrogênio mediante um emparelhamento Hoogsteen. Esta, estrutura forma-se mais facilmente em sequências longas contendo unicamente pirimidinas ou purinas numa determinada cadeia. Quatro cadeias de ADN também se podem emparelhar para formar um tetraplexo, sendo que esta formação ocorre apenas por sequências ricas em G, levando à formação de G4 [42, 44, 45, 48].

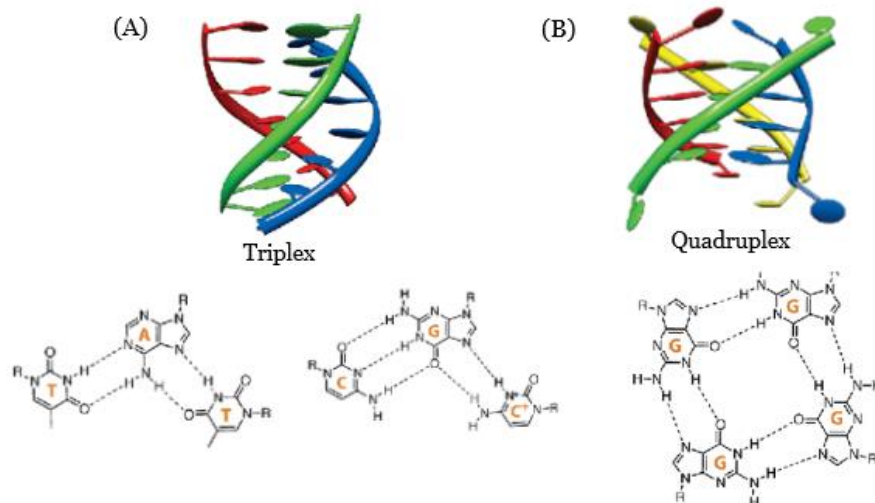


Figura 4: Estruturas de ADN, que contêm três ou quatro cadeias: (A) Ilustração esquemática do triplex e do padrão de emparelhamento de bases (T-A: T e C-G:C); (B) Ilustração do quadrúplex e na parte inferior se representa o padrão de emparelhamento de bases no tetraplexo. Adaptado de [48].

1.3. G-quadruplex (G4)

Como mencionado anteriormente, as sequências ricas em G, podem-se auto associar em pilhas de tetraplexos (também chamados G-quartetos) (Figura 6A) para formar estruturas mais complexas conhecidas como G4 (Figura 6B) [49, 50].

A presença de sequências ricas em G são frequentes no genoma humano e podem ser identificadas em regiões teloméricas e promotoras de vários genes, especialmente de oncogenes [50, 51]. A sua formação requer de cátions monovalentes, como por exemplo o sódio (Na^+) e o potássio (K^+) que estabilizam a rede de ligações de hidrogênio do G-quarteto e subsequentemente, toda a estrutura. O K^+ é considerado melhor agente estabilizador do que o Na^+ , portanto, tem maior efeito na formação do G4. Este cátion é fisiologicamente importante devido à sua maior concentração intracelular [51, 52].

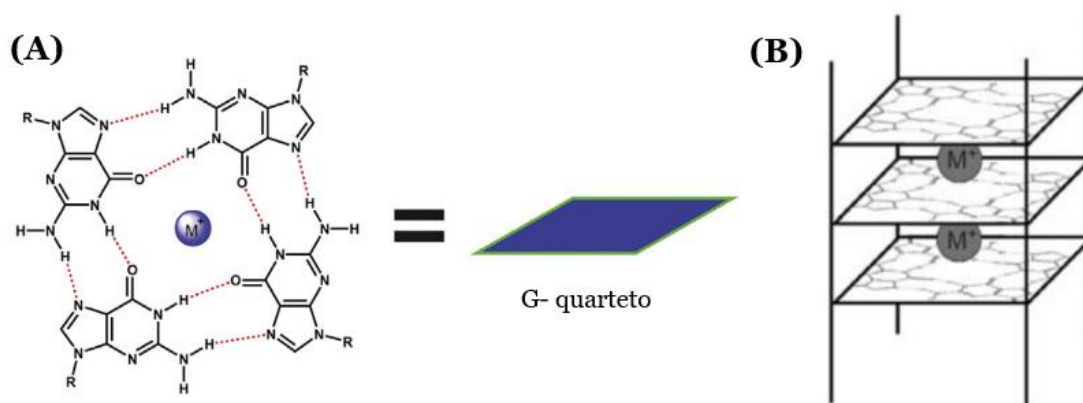


Figura 6: Estrutura de G4. (A) Estrutura química do G-quarteto mostrando a ligação de hidrogênio de Hoogsteen entre os pares de G e um cátion monovalente central que estabiliza a estrutura 3D; (B) Estrutura esquemática de G4. Adaptado de [50, 55].

As estruturas de G4 podem ser classificadas de acordo com a sua molecularidade em intramoleculares, quando formados por sequência da mesma cadeia, ou em intermoleculares quando formadas por várias cadeias. Estas estruturas apresentam ainda diversas topologias podendo adotar diferentes conformações, incluindo topologia paralela, antiparalela ou híbrida (Figura 7), dependendo da orientação relativa da cadeia, número de quartetos, comprimento e composição dos *loops* e forma de empilhamento da sequência [53–55]. Os nucleótidos de ligação entre os G-quartetos formam *loops* (laços) em torno da estrutura, e podem ser classificados em *loops* laterais, diagonais ou em hélice [54, 56].

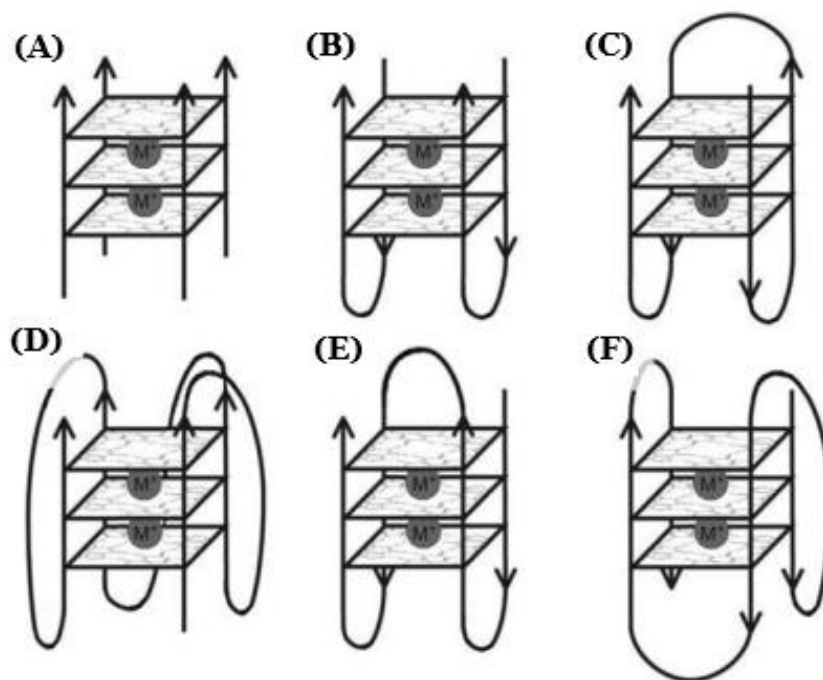


Figura 7: Topologias de G4: Consoante as cadeias constituintes: (A) tetramolecular, (B) bimolecular, (C-F) intramolecular; Diferentes tipologias consoante ao *loop*: (B,C) *loop* lateral, (D) *loops* de duas cadeias, também denominado como hélice, (E) dois *loops* laterais e um diagonal; Diferentes tipologias consoante à orientação das cadeias: (A) paralelo - todas as cadeias na mesma direção, (B) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a uma paralela e a outra antiparalela, (C) antiparalelo - duas cadeias em cada direção, cada uma adjacente a duas cadeias antiparalelas, (F) antiparalelo - três cadeias na mesma direção e uma na direção contrária. Adaptado de [55].

Desta forma, seqüências formadoras de G4 são notavelmente polimórficas. Uma seqüência de G4 adota várias estruturas, dependendo do catião que esta no seu núcleo, das condições de enrolamento e do ambiente da solução [57].

As estruturas de G4 parecem estar envolvidas em vários processos biológicos importantes, como a alongação e manutenção dos telómeros, a regulação da transcrição e a replicação e tradução de ADN, estando fortemente associadas à estabilidade do genoma [49, 50].

Devido à sua localização, estrutura e associação com processos e mecanismos de controlo importantes para a biologia e desenvolvimento de células cancerosas, os G4 têm sido descritos como potenciais alvos terapêuticos. Neste sentido têm-se desenvolvido várias moléculas pequenas capazes de se ligarem e estabilizar estas estruturas com a finalidade de regular negativamente a transcrição de oncogenes ou bloquear o alongamento dos telómeros nas células cancerígenas [50, 58, 59]. Para além de terem sido considerados importantes alvos terapêuticos, as seqüências formadoras de G4 têm sido sugeridos como potenciais agentes anticancerígenos, com especial interesse nos aptameros [50].

1.4. Aptameros

Os aptameros de ácidos nucleicos são sequências pequenas (geralmente de 20 a 60 nucleótidos) de ADN ou ARN de cadeia simples, capazes de reconhecer e ligar a um determinado alvo com alta afinidade com valores de dissociação (K_D) na faixa nanomolar. Têm uma grande variedade de alvos, que incluem proteínas, pequenas moléculas, iões ou mesmo células inteiras [50, 60]. Conseguem reconhecer domínios funcionais de proteínas, como sítios catalíticos ou alostéricos, podendo regular as funções biológicas dos seus alvos [61].

Os aptameros ricos em G que formam estruturas G4 têm várias vantagens em comparação com sequências não estruturadas, como estabilidade química numa ampla escala de pH, temperatura e condições iónicas, resistência a nucleases séricas e maior absorção celular. Estas sequências de ácidos nucleicos G4 têm uma maior densidade de carga negativa do que o ADN dúplice, favorecendo a sua interação com proteínas catiónicas ou pequenas moléculas [50, 60].

De forma semelhante aos anticorpos, os aptameros interagem com os seus alvos reconhecendo uma estrutura tridimensional específica, e são denominados como anticorpos químicos, no entanto os aptameros apresentam várias vantagens sobre os anticorpos [62, 63]. Os aptameros conseguem penetrar nos tecidos com maior facilidade e rapidez, devido à sua massa molecular significativamente baixa, deste modo, penetram nas barreiras dos tecidos e atingem os seus alvos com maior eficiência do que os anticorpos. Em comparação aos anticorpos, os aptameros apresentam maior estabilidade, falta de imunogenicidade, podem ser sintetizados em grandes quantidades com alta reprodutibilidade e com menores custos de produção. Além disso, podem ser modificados quimicamente de forma a obter características desejáveis para aplicações clínicas [62, 64, 65]. Na Tabela 1 está representada a comparação de algumas propriedades dos aptameros e dos anticorpos.

Tabela 1: Comparação das principais características entre os aptameros e os anticorpos. Adaptado de [62, 64, 65].

Característica	Aptamero	Anticorpo
Massa molecular	5 – 25 kDa	150 – 180 kDa
Estruturas secundárias	Várias estruturas	Folhas β
Alvos	Ampla gama de alvos	Moléculas imunogênicas
Modificação química permitidas	Várias modificações	Modificações limitadas
Estabilidade	Muito estável	Sensível à variação de temperatura e pH
Toxicidade	Não se observa	Reação imune observada
Validade	Anos (quando desidratados)	Limitada
Produção	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>

Os aptameros são geralmente desenvolvidos por um processo de seleção *in vitro* conhecido como evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX). Este procedimento de seleção *in vitro* (Figura 8) envolve três etapas principais: (i) ligação (seleção), onde a molécula alvo é incubada numa biblioteca aleatória de oligonucleótidos sobre condições definidas; (ii) divisão, onde os aptameros ligados são separados dos não ligados; e (iii) amplificação, onde o grupo de aptameros selecionados é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), antes de serem utilizados na fase seguinte de seleção. Os aptameros selecionados são separados para serem avaliados rigorosamente, são incubados com um alvo de controle negativo [50, 66].

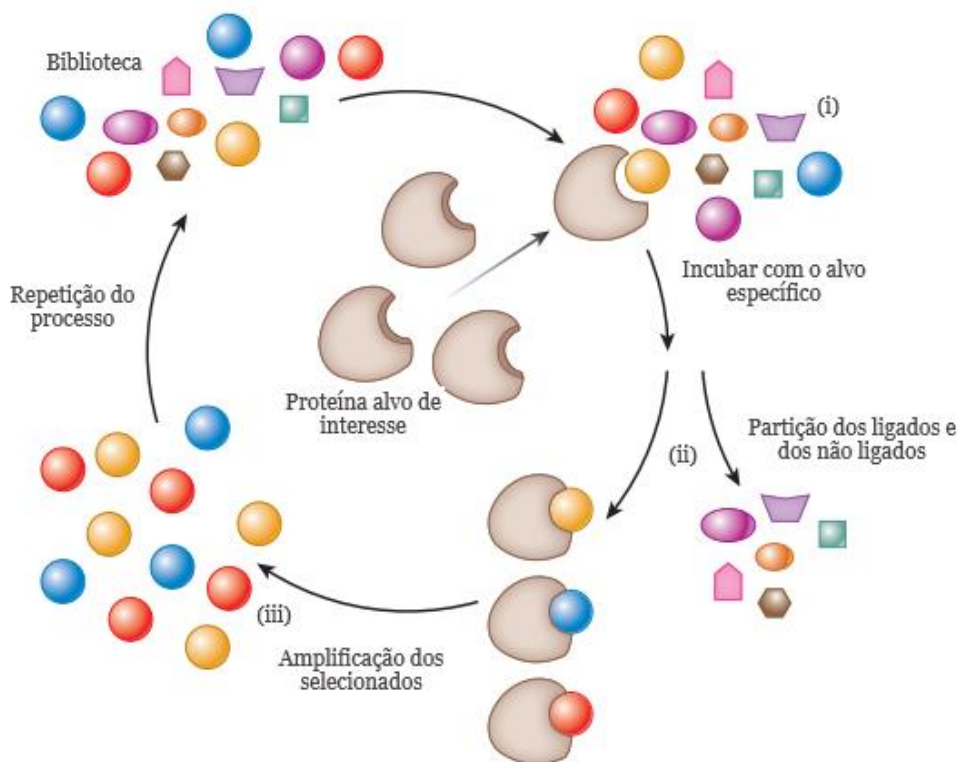


Figura 8: Representação esquemática do método SELEX. Adaptado de [66].

Devido às suas características e versatilidade, os aptâmeros têm sido utilizados numa variedade de aplicações em diversas áreas, como na biotecnologia, farmacologia, biologia molecular, biomedicina e na nanotecnologia. Nos últimos anos, os aptâmeros têm sido fortemente estudados e existe evidência que indica a sua relevância clínica, particularmente no cancro [64, 67]. As suas propriedades permitem que sejam utilizados na identificação de biomarcadores oncológicos, no diagnóstico e terapia para o cancro [67, 68].

Os aptâmeros evidenciaram-se como moléculas anticancerígenas promissoras, uma vez que conseguem diferenciar entre formas oncogénicas e não oncogénicas de proteínas relacionadas com vias de sinalização e regulam a expressão genética de alguns oncogenes, bloqueando a sua atividade. Assim, têm vindo a ser desenvolvidos diferentes aptâmeros contra alvos associados a diferentes patologias, alguns deles têm estrutura G4, como o AS1411 [67, 69].

A alta estabilidade destas moléculas permite que muitos dos agentes anticancerígenos consigam ser ligados aos aptâmeros, via conjugação física ou química, para promover a sua entrega celular, potenciando a eficiência do tratamento. Assim, além do efeito terapêutico dos aptâmeros, estes evidenciam uma capacidade de direcionamento, já que se ligam com alta afinidade e especificidade ao alvo de interesse [39, 70]. Além

disso, a facilidade de modificação química específica dos aptameros permitem a sua conjugação com fármacos, fotossensibilizadores ou nanomateriais [71].

Assim, os aptameros podem ser utilizado eficazmente em diferentes aplicações terapêuticas para o cancro, como agentes terapêuticos, para detecção e diagnóstico de células cancerosas, bem como para terapia direcionada [71, 72].

1.4.1. Aptameros como agente de entrega de fármacos

A alta especificidade de reconhecimento e a capacidade de direcionamento dos aptameros oferecem uma ótima opção para a entrega de medicamentos. Existem duas estratégias principais para a entrega direcionada de medicamentos utilizando aptameros: (i) sistema aptamero-fármaco, neste método o aptamero entrega de forma direcionada o fármaco, pode atuar tanto como carregador como agente terapêutico ou como ligando e (ii) sistemas aptamero-nanossistema, onde o nanossistema atua conjuntamente com o aptamero para a entrega direcionada do fármaco [68, 73, 74].

Compreende-se atualmente que a entrega direcionada de agentes anticancerígenos mediada por aptameros aumenta a especificidade dos agentes de entrega para o local alvo, aumenta a acumulação de agentes no tecido celular canceroso e fornece um mecanismo de entrega alternativo promissor [74]. Além disso, os aptameros são uma alternativa para melhorar a atividade terapêutica dos fármacos anticancerígenos que provocam toxicidade nas células normais devido a sua falta de seletividade [72, 74].

Tendo em conta que a maioria dos agentes anticancerígenos atuam no interior das células, o seu transporte transmembranar através de nanopartículas (NPs) conjugadas, é muito importante para a entrega eficiente destes agentes para o alvo intracelular. Assim, têm-se desenvolvido uma abordagem onde se liga aptameros à superfície de NPs, facilitando a absorção celular dos agentes, de maneira a aproveitar a reação específica entre os ligandos e os recetores das células alvo [74].

Os nanossistemas podem ser modificados para atingir células e tecidos específicos e entregar os agentes terapêuticos de forma responsiva a estímulos [70]. Os transportadores de fármacos baseados em NPs exibem várias vantagens significativas, nomeadamente, um processo de fabrico simples, alta estabilidade, alta capacidade de transporte, viabilidade de incorporação hidrofílicas e hidrofóbicas e viabilidade de administração variáveis. Além disso, a utilização de NPs permite a libertação controlada do fármaco, reduz a frequência de dosagem e melhora a biodisponibilidade do fármaco [70, 71]. As grandes superfícies das NPs permitem a conjugação de vários aptameros, o que permite aumentar a captação celular [75].

1.5. Nanossistemas como sistema de entrega de fármacos

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar com aplicações em diferentes áreas. Nos últimos anos tem-se tornado de grande interesse na medicina, dando origem uma nova área denominada como nanomedicina, que abrange a utilização de estruturas ou dispositivos em nanoescala para tratamento e diagnóstico de diversas patologias [76]. Particularmente, os nanossistemas de entrega têm sido de grande interesse na terapia do cancro [70].

O uso de nanossistemas como sistema de entrega seletiva de agentes terapêuticos envolve vários processos, como o fabrico, caracterização e manipulação de nanotransportadores para entrega seletiva de agentes terapêuticos (como fármacos) nas células cancerosas e nos últimos anos tem sido grandemente explorada pela comunidade científica [70]. O desenho e desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos envolve o conhecimento das características da doença, as barreiras fisiológicas e as propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos medicamentos, assim como a estrutura dos materiais [77].

Como referido anteriormente a maioria dos fármacos aprovados para a terapia do cancro, não são seletivos para as células cancerosas, levando a uma toxicidade significativa nas células normais [38, 70]. Desta forma, desenvolveu-se uma nova opção terapêutica para a entrega direcionada de fármacos às células cancerosas. Esta estratégia reduz notavelmente o potencial citotóxico nos tecidos normais (devido à diminuição da bioacumulação), aumenta o índice terapêutico dos fármacos e atenua os efeitos colaterais das terapias convencionais [39, 40].

Para a entrega específica destes sistemas, têm sido desenvolvidos aptameros direcionados que se ligam a moléculas ou recetores biologicamente ativos, que são expressos diferencialmente em células ou tecidos doentes. Além disso, como foi indicado anteriormente, os aptameros podem ajudar no tratamento de diversas patologias, através da inibição dos processos da doença ou visando a entrega específica de medicamentos [70, 78].

Um dos nanomateriais frequentemente utilizado na terapia do cancro são as NPs, estas podem ser de diferentes formas, estruturas e tamanhos. O seu tamanho pode estar entre 1 e 100 nm (se o tamanho for inferior a 1nm, o termo *clusters* de átomos é geralmente preferido), podem ter uma superfície uniforme ou irregular com variações superficiais [79, 80]. É possível modificar a superfície das NPs com várias estratégias, para melhorar a sua estabilidade, meia-vida, biodistribuição e biocompatibilidade [70].

Conforme a sua composição as NPs são classificadas em três classes. Em primeiro lugar estão as NPs orgânicas, que são feitas à base de proteínas, carboidratos, lipídios, polímeros ou quaisquer outros compostos orgânico, entre os exemplos mais relevantes desta classe estão os dendrímeros, lipossomas e micelas poliméricas, que têm um núcleo oco. Estas NPs não apresentam toxicidade, são biodegradáveis, sensíveis à radiação térmica e eletromagnética [79, 80]. As NPs à base de carbono, são feitas exclusivamente de átomos de carbono, como o grafeno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono e os pontos quânticos de carbono, e são usadas em diferentes aplicações como bioimagem, armazenamento de energia, entrega de fármacos e detecção de patógenos microbianos. Finalmente, as NPs que não são feitas nem de carbono, nem de materiais orgânicos, as NPs inorgânicas, que são de metal, cerâmica ou materiais semicondutores [79, 81].

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos é o direcionamento seletivo para as células cancerosas e grande parte das NPs utilizam o efeito de permeabilidade e retenção aprimorado (EPR). Este tipo de direcionamento é denominado como passivo [69, 82]. O desequilíbrio resultante dos reguladores angiogénicos, provoca vasos tumorais altamente desorganizados e dilatados, estas características são conhecidas como o efeito EPR [83]. Condições fisiopatológicas, tornam os vasos sanguíneos mais permeáveis, permitindo que partículas que variam de 10 a 500 nm se acumulem seletivamente nos tecidos tumorais [69, 83]. Desta forma pode-se encapsular o fármaco antineoplásico nestas partículas e conseqüentemente direcionar seletivamente células cancerosas [69]. No entanto, um sistema de entrega de fármaco que depende exclusivamente de mecanismos de direcionamento passivo, tem várias limitações relacionadas à sua especificidade [83].

Recentemente, foi possível aumentar a interação entre NPs e células, levando a uma maior internalização do fármaco sem alterar a sua biodistribuição [69, 84]. O direcionamento ativo, está baseado na identificação de um alvo específico presente nas células cancerosas. Nesta abordagem são normalmente utilizados anticorpos para funcionalizar NPs [69].

Neste contexto, aptameros G4 podem ser utilizados, uma vez que apresentam várias vantagens frente aos anticorpos. Os aptameros direcionam aos agentes terapêuticos e promovem a sua posterior entrada celular através da endocitose mediada por recetores [70, 84]. Ensaaios *in vitro* e *in vivo* sugerem que o direcionamento ativo das NPs incrementa a seletividade na absorção celular e/ou a citotoxicidade em comparação com os fármacos livre e nanossistemas não direcionados baseados em NPs. Além disso, melhoram a segurança e eficácia dos agentes terapêuticos [75, 84]. Na Figura 9 está representado de forma esquemática o mecanismo de direcionamento ativo.

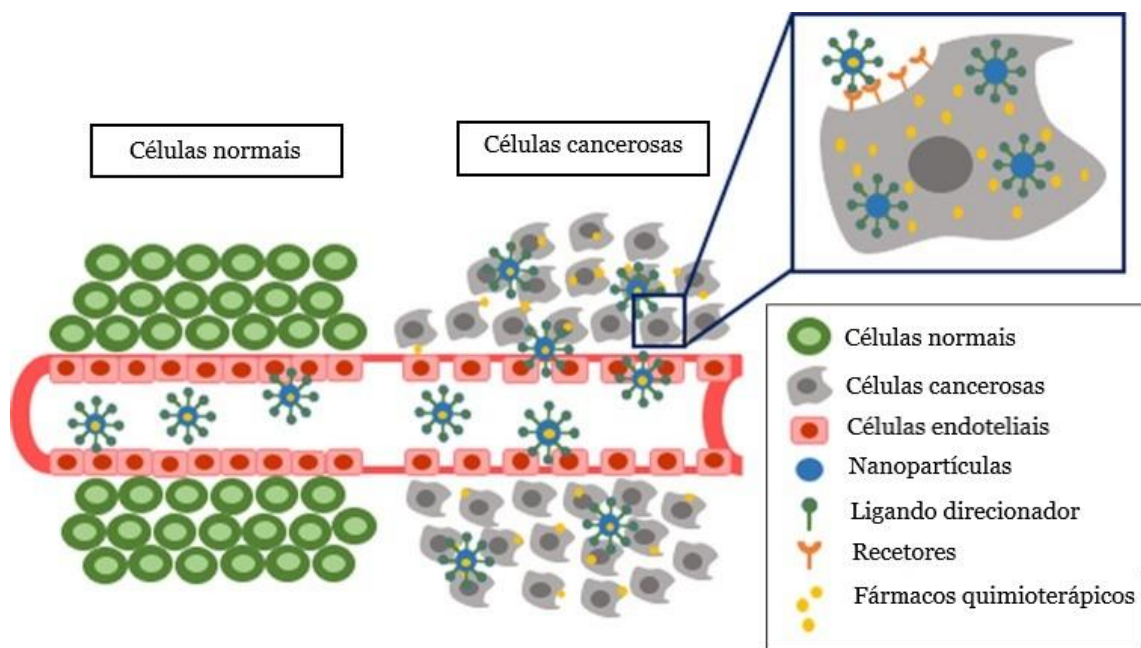


Figura 9: Mecanismo do direcionamento ativo. Adaptado de [84].

Existem vários nanossistemas que são estudados como sistema de entrega de fármacos baseados em NPs para o tratamento do CPCNP. Alguns exemplos são as NPs lipídicas sólidas, lipossomas, NPs poliméricas, dendrímeros, micelas poliméricas, NPs de ouro, nanotubos e pontos quânticos. Na Figura 10 são representadas algumas das NPs mais utilizadas no tratamento do CPCNP e as suas principais características [75, 85, 86].

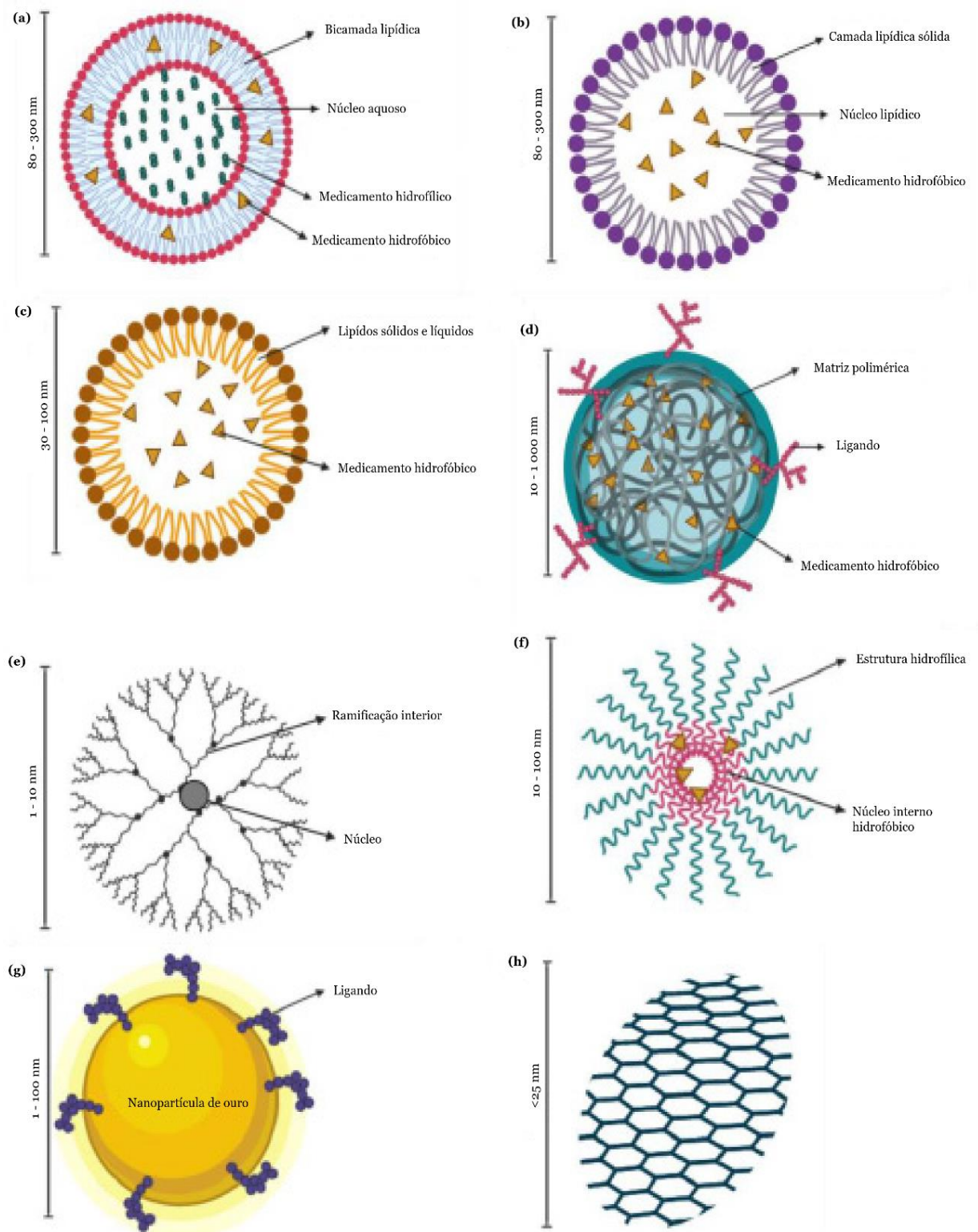


Figura 10: Representação esquemática dos vários nanossistemas utilizados para o tratamento do CPCNP e a suas características principais. (a) Nanolipossomas, (b) NPs lipídicas, (c) portadores lipídicos nanoestruturados, (d) NPs poliméricas, (e) dendrímeros, (f) micelas poliméricas, (g) nanopartículas de ouro e (h) grafeno. Adaptado de [75].

A composição química, estrutura, tamanho e a morfologia desempenham um papel fundamental nas características das NPs, sendo necessário realizar a caracterização de NPs. Este processo realiza-se através de várias técnicas analíticas. Para determinar o tamanho das NPs utilizam-se técnicas microscópicas, como a microscopia eletrónica de varrimento e a microscopia eletrónica de transmissão. Além destas, também se utilizam técnicas de dispersão de luz, métodos baseados em raios-X ou técnicas espectroscópicas [87].

1.6. AS1411 como aptamero G4

Como mencionado anteriormente, os aptameros G4 são capazes de se ligar a uma molécula alvo com alta seletividade e afinidade. O AS1411, também denominado de AGRO100 é um aptamero G4 de 26 nucleótidos (5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG - 3') altamente estável. Foi descoberto por Bates e colaboradores por casualidade e não por abordagens de SELEX convencionais [88]. Foi um, dos primeiros aptameros submetidos a ensaios clínicos para terapia oncológica, tendo demonstrado atividade antiproliferativa seletiva para as células cancerosas e eficiente internalização celular. Estas propriedades são conferidas pela sua sequência rica em G [88, 89].

Adicionalmente, o AS1411 tem maior resistência às nucleases séricas e maior absorção celular comparado com sequências não estruturadas. Estas características permitem o seu uso numa ampla gama de aplicações terapêuticas [90].

O AS1411 consegue formar pelo menos oito estruturas G4 monoméricas diferentes [57]. As características estruturais, e principalmente a sua conformação biologicamente relevante têm-se evidenciado como um problema desafiante pelo facto desta sequência exibir um alto grau de polimorfismo estrutural. Dependendo da composição da solução e das interações intermoleculares, a sua estrutura pode ser alterada. Utilizando o método da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foram identificadas pelo menos oito conformações monoméricas de AS1411 que possuem propriedades termodinâmicas, hidrodinâmicas e eletroforéticas quase idênticas, mas a estabilidade cinética, os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) e CD significativamente diferentes [57, 91]. Foi descrito que na presença do ião K^+ , o aptamero adota uma estrutura de G4 com topologia paralela [60, 91, 92].

Este aptamero consegue reconhecer e ligar especificamente à nucleolína (NCL). A NCL é uma proteína ubíqua multifuncional de 110 kDa, e a sua função está relacionada com a sobrevivência, crescimento e proliferação celular [93]. Além disso, está envolvida em

vários processos celulares, como recombinação de ADN, transcrição, empacotamento e transporte de ARN ribossomal (ARNr) [94].

A desregulação da NCL tem sido observada em várias condições patológicas, como doenças autoimunes, Alzheimer e Parkinson, assim como em vários cancros [93, 94]. Foi demonstrado que a NCL é capaz de induzir a maturação de alguns microARNs (miARN) relacionados com o cancro, também atua como molécula de adesão, modulando a interação célula-matriz na angiogénese, regulando a migração celular e funciona como elemento anti-apoptótico sendo um fator estabilizador do linfoma de células B-2 (blc-2) [94, 95]. A NCL apresenta também níveis de expressão aumentados em vários tipos de células cancerosas, podendo ser considerada um biomarcador tumoral [73, 88, 93].

O AS1411 liga-se à NCL na superfície celular das células cancerosas e inibe a sua proliferação, no entanto, ainda não se tem definido completamente um mecanismo de ação que descreva a atividade antiproliferativa do AS1411, tendo sido sugeridas algumas hipóteses [61, 88]. O AS1411 reconhece o domínio externo da NCL, formando o complexo AS1411-NCL e posteriormente é internalizado pelas células cancerosas. O complexo internalizado inibe a replicação do ADN, induzindo a paragem das células na fase S do ciclo celular, causando citotoxicidade nas células cancerígenas [73, 93, 96]. Além disso, o AS1411 é capaz de reduzir a ligação da NCL citoplasmática ao mRNA blc-2, isto interfere na estabilização do mRNA blc-2 e induz a morte das células tumorais [69, 97].

Inicialmente, foi proposta a hipóteses de que a NCL da superfície celular é expressa seletivamente em células cancerosas em comparação com células normais, e que medeia a ligação e absorção de AS1411 em células cancerosas. Evidências indicaram que a maioria das células normais continham pouco ou nenhuma NCL na superfície, portanto não são capazes de se ligar ao AS1411. Desta forma, sugeriu-se que a internalização seletiva de AS1411 é dependente da NCL [88, 91]. Mais recentemente, outro mecanismo de ação para o AS1411 foi proposto por Reyes-Reyes *et al.*, neste mecanismo sugere-se que a internalização de AS1411 nas células cancerosas ocorre por macropinocitose, uma forma de endocitose prevalente nas células cancerosas, seguidamente ocorre uma estimulação da macropinocitose por um mecanismo dependente da NCL, resultando numa internalização maior do aptamero e provocando uma morte celular não apoptótica [89, 91, 98].

Foram realizados ensaios pré-clínicos para determinar a atividade antiproliferativa do AS1411 em várias linhas celulares tumorais, como células de cancro de próstata, mama e pulmão. Notavelmente, foi demonstrado que o AS1411 tem atividade antiproliferativa

na maioria dos tipos de células cancerosas em que foi testado, pelo que parece ter um amplo potencial terapêutico [88]. Também foi testada a sua atividade em modelos animais (ratos), onde foi possível observar uma redução significativa do crescimento do tumor, além de não se observar efeitos tóxicos [88, 93].

Nos ensaios clínicos de fase I (*clinicaltrials.govID*: NCT00881244), o aptamero AS1411 foi administrado a pacientes com tumores sólidos avançados com metástase progressiva. Numa segunda fase deste ensaio, foi limitado a pacientes com carcinoma de células renais avançado e CPCNP. Os resultados obtidos neste estudo indicam sinais promissores da atividade clínica de AS1411 (vários pacientes com estabilização da doença, especialmente para carcinoma de células renais) e ausência de efeitos secundários graves [88, 99]. Posteriormente, foram realizados dois ensaios clínicos de fase II, em pacientes com carcinoma de células renais (NCT00740441) e em leucemia mieloide aguda (NCT01034410). Observou-se que a taxa de resposta ao AS1411 ocorreu em 3 pacientes com carcinoma renal e 4 pacientes com leucemia mieloide aguda, com respostas clínicas douradoras. O tamanho do tumor diminuiu significativamente ou desapareceu e houve baixa toxicidade [88, 91, 100, 101]. No ensaio clínico em pacientes com carcinoma renal, um dos pacientes apresentou uma redução tumoral significativa e permaneceu sem progressão tumoral pelo menos 2 anos após a conclusão da terapia [100]. Neste sentido, o AS1411 apresenta um perfil farmacológico seguro e capacidade de induzir respostas duráveis em alguns pacientes com câncros avançados [91, 100].

Os resultados obtidos nos ensaios clínicos indicam que o AS1411 pode ser um agente anticancerígeno eficaz e seguro, no entanto, apresenta uma eliminação rápida do corpo, uma farmacologia sub-ótima e uma baixa potência, aspetos limitantes para sua progressão como medicamento aprovado. Uma das alternativas para ultrapassar estas limitações é o desenvolvimento de novas formulações de AS1411 com farmacocinética melhorada e maior potência. Dentro destas novas formulações existem várias possibilidades como o desenvolvimento de versões modificadas de AS1411 mediante a inserção de nucleótidos na sequência, a identificação de combinações sinérgicas de AS1411 com fármacos existentes, a conjugação com nanoestruturas orgânicas ou inorgânicas ou como agente de entrega direcionada de fármacos ou moléculas [60, 91, 102].

O AS1411 tem sido utilizado como um agente de entrega direcionada devido às suas propriedades numa variedade de nanossistemas (Figura 11) como nanopartículas de ouro [103], lipossomas, micelas e outros nanoagregados poliméricos, conjugado na superfície destes sistemas [91, 94]. Outra estratégia já descrita, é a utilização da ligação

não covalente a AS1411 para o transporte de moléculas com potencial anticancerígeno como a porfirina TMPyP4 e um derivado de laranja de acridina C₈ [104, 105].

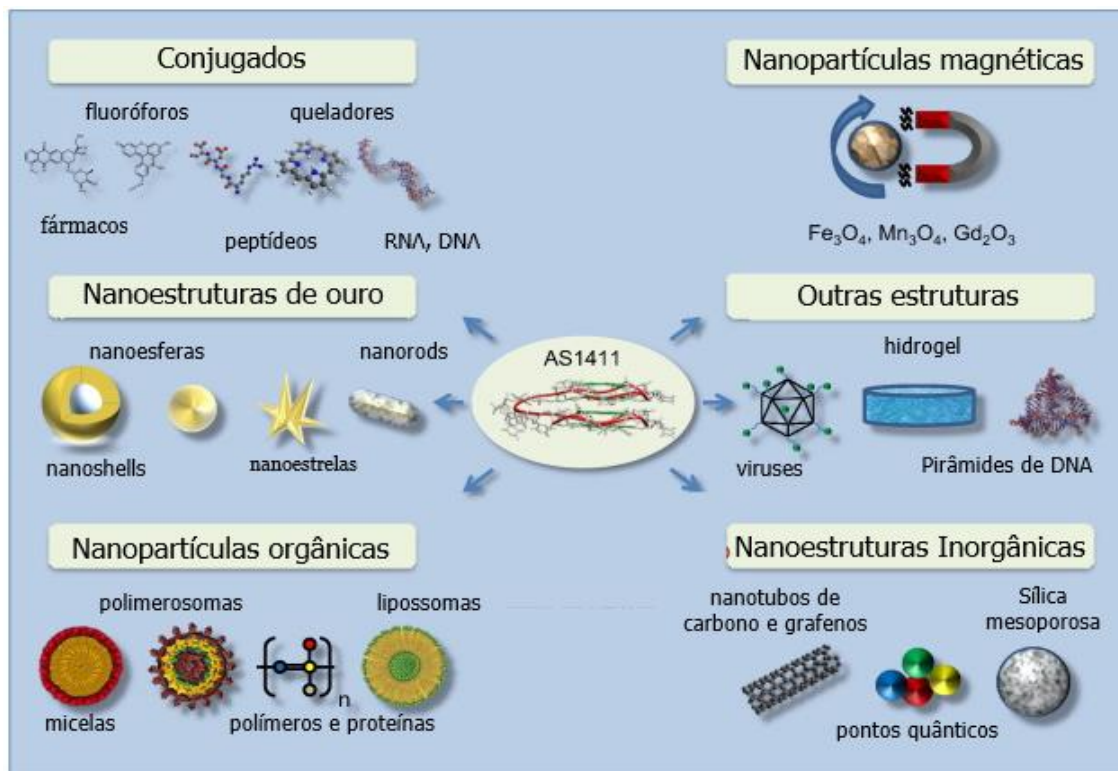


Figura 11: Ilustração da variedade de estruturas às quais o AS1411 foi conjugado para ser utilizado como agente de entrega direcionada no cancro. Adaptado de [91].

1.7. AS1411 como sistema de entrega de medicamentos

1.7.1 Conjugado AS1411-agente terapêutico

Tendo em conta as propriedades pré-clínicas promissoras mostradas pelo AS1411, e pela sua capacidade de reconhecer a NCL nas células cancerosas de forma eficaz e seletiva, este aptamero pode ser utilizado para transportar potenciais medicamentos anticancerígenos [69, 93, 104].

Neste sentido, foi conjugado outro agente anticancerígeno amplamente utilizado, a doxorrubicina (Dox), ao AS1411 resultando na formação do complexo denominado AS1411-Dox para terapia do cancro de fígado. Os resultados dos testes *in vivo* indicaram que o complexo AS1411-Dox inibiu a progressão tumoral com quase a mesma eficácia do que a Dox livre, mas sem os efeitos adversos graves, que estão associados aos tratamentos com Dox, como a perda de peso que se relaciona à baixa tolerância do fármaco [106].

Shieh *et al.* descreveu o conjugado AS1411-TMPyP4 para terapia fotodinâmica em células de cancro de mama. O TMPyP4 é um composto comumente utilizado na terapia fotodinâmica, para tratar tecidos malignos ou pré-malignos. Quando excitado pela luz ótima, pode gerar oxigénio singlete que reage com biomoléculas próximas e promove a morte celular [69, 107]. Observou-se que o complexo foi eficientemente absorvido pelas células cancerosas, promovendo maior acumulação de TMPyP4 nestas células em comparação com as células normais do epitélio. Após exposição à luz, o complexo apresentou maior dano na linha celular de cancro de mama do que nas células normais [107].

Carvalho *et al.*, desenvolveu um nanossistema de entrega direcionada baseado em AS1411 com um ligando G4 (AS1411-C₈) em células de cancro cervical, o estudo *in vitro* demonstrou a utilidade do aptamero como transportador do ligando C₈ e mostrou ser seletivo para o tumor [105].

De esta forma, o AS1411 demonstrou poder ser aplicado não só como fármaco, mas também como transportador de diferentes agentes terapêuticos [105–107].

1.7.2 Conjugado AS1411-nanopartícula

As NPs adequadamente modificadas podem ser combinados com aptameros para a entrega direcionada de medicamentos. O AS1411 oferece aos conjugados aptamero-NP a capacidade de entrega seletiva e as NPs oferecem boas propriedades para a conjugação de fármacos no interior ou na superfície [68].

Dentro dos sistemas estudados foram desenvolvidas nanoesferas de ouro, conjugados a AS1411 (AS1411-GNS) para determinar o seu potencial terapêutico em células do cancro de mama, demonstrando captação celular superior, efeitos antiproliferativos e citotóxicos evidentemente aumentados e seletividade para as células cancerosas em comparação com células não malignas [103].

Também foram desenvolvidas várias NPs orgânicas. Li *et al.*, desenvolveu uma micela composta multifuncional com modificação de superfície do aptamero AS1A11 para entrega direcionada de Dox a tumores de cancro de mama. Este sistema consistiu num polímero anfifílico, denominado de pluronic F127, que está associado com uma capacidade de carregamento de fármacos e estabilidade física deficiente, modificado com AS1411 e poli(etileno glicol)-b-polilactídeo (β -CD-PELA) ligados a beta-ciclodextrina, que se pode auto-organizar em micelas com baixa concentração micelar crítica (CMC) e aumentar a capacidade de absorção de fármaco e a estabilidade da micela [69, 108]. Os resultados obtidos no estudo *in vivo*, indicaram que as micelas compostas funcionalizadas com AS1411 apresentam atividade antitumoral aprimorada

e cardiotoxicidade reduzida, acumulação aumentada no tumor e um tempo de circulação prolongado no sangue [108].

Para o tratamento do CPNPC foi desenvolvido uma nanopartícula carregada com gemcitabina (GEM), um fármaco anticancerígeno de primeira linha com AS1411 anexado na superfície com polietilenoglicol-poli (ácido lático-co-glicólico) formando o complexo (Apt-GEM-NP). Os resultados obtidos neste estudo indicaram uma libertação contínua do fármaco, captação celular e citotoxicidade superior, indicando direcionamento ativo. Houve também um aumento do efeito inibitório da proliferação celular devido à entrega seletiva de GEM às células cancerosas [86].

Também foi desenvolvida por Yang *et al.*, uma micela baseada em quitosano-ss-polietilenonimina-ácido urocânico (CPU) revestida com AS1411, com dupla sensibilidade pH/redox e efeitos de direcionamento seletivo. Esta micela polimérica foi produzida para transportar Dox e siRNA do Toll-like receptor 4 (TLR4-siRNA), que afeta o processo de sobrevivência, migração e invasão das células cancerígenas. O estudo *in vitro* revelou uma libertação sustentada de genes e fármaco das micelas funcionalizadas sobre condições fisiológicas e atividade antiproliferativa na linha celular A549. Enquanto no estudo *in vivo*, a administração de micelas revestidas com AS1411 contendo os dois medicamentos anticancerígenos demonstrou excelente penetração no tumor, eficácia antitumoral e baixa toxicidade na circulação sistêmica [109].

De forma geral, os resultados destes estudos sugerem que estes sistemas de entrega baseados em nanossistemas/fármacos ligados ao AS1411 apresentam uma maior internalização nas células cancerosas e/ou acumulação nos tumores em comparação com sistemas não direcionados, ou com fármacos livres. Estes efeito resulta na redução da toxicidade nos tecidos normais, que é um problema comum na administração da maioria dos fármacos anticancerígenos [91, 104].

Como mencionado anteriormente, devido à sua natureza rica em G, o AS1411 pode adotar múltiplas estruturas G4 mono e bimoleculares, indicando ter um alto grau de polimorfismo estrutural [91]. Com o objetivo de encontrar a conformação bioativa do AS1411 e minimizar o grau de polimorfismo, vários estudos têm sido desenvolvidos, nomeadamente a utilização de derivados do AS1411 formados por adições e/ou substituições de nucleótidos, inserção de nucleosídeos modificados dentro da sequência e a conjugação de diferentes grupos químicos fornecendo características físico-químicas especiais [104, 110].

Recentemente foi demonstrado que a modificação lipídica de uma sequência de oligonucleótidos propensa a formar G4 tem o potencial de favorecer a termodinâmica e a cinética da formação de G4 paralelo tetramolecular, em comparação com sequências não específicas (Figura 12). Desta forma, a modificação lipídica tem-se utilizado para a estabilização da estrutura de G4. Além disso, foi ainda observado que os G4s paralelos tetramoleculares anfifílicos foram capazes de formar agregados micelares estáveis. A estabilidade destes conjuntos micelares depende da natureza do lípido, da sequência do oligonucleótidos e da natureza dos sais presentes [69, 111].

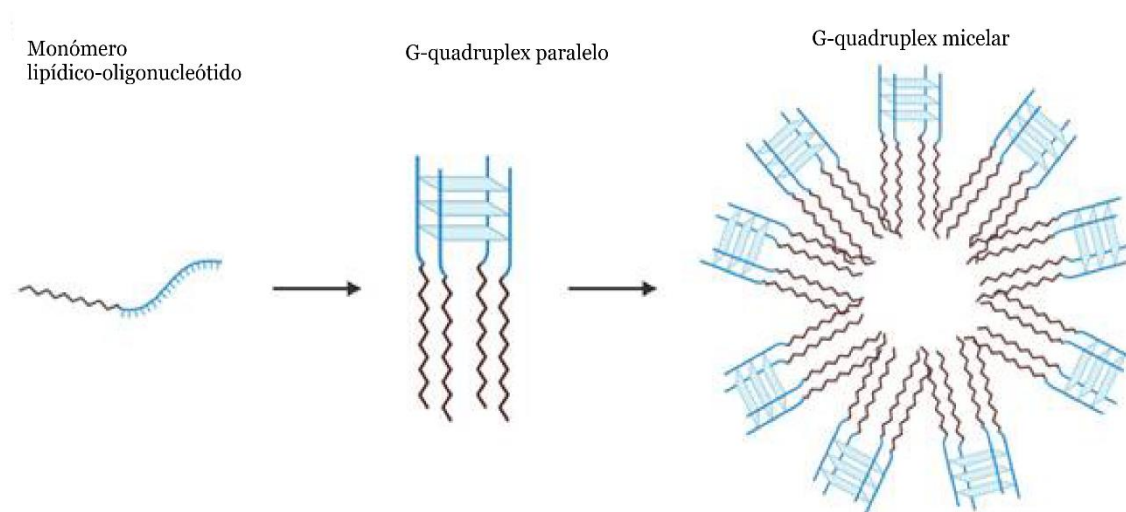


Figura 12: Representação esquemática da auto-organização lipídica de G4s tetramoleculares paralelos. Dependendo da natureza do lípido, da sequência de oligonucleótidos e dos sais presentes, o paralelo tetramolecular G4 pode formar estruturas micelares. Adaptado de [69].

Riccardiet *al.*, analisou o comportamento conformacional e a propensão de agregação de diferentes derivados de AS1411 conjugados com caudas lipofílicas, em comparação com AS1411 não modificado. Os resultados indicaram que a conjugação favorece drasticamente a formação de agregados AS1411, contudo não afeta a formação e a estabilidade térmica das estruturas G4. Também indicaram que a natureza do lípido e do ligando tem um papel fundamental no tamanho e estabilidade dos agregados obtidos (micelas simples, agregados alongados, nanoagregados e mais complexos) [112]. No entanto, a utilização destas sequências lípido-modificadas em aplicações nanotecnológicas para a entrega direcionada de agentes/fármacos anticancerígenos, é pouco explorada.

Neste trabalho utilizou-se uma sequência AS1411 lípido-modificado, formado por uma cadeia mono octadecil, $C_{18}H_{37}$ e analisou-se a sua capacidade de formar nanoagregados. Os nanoagregados surgem como nanotransportadores supramoleculares coloidais promissores em terapias direcionadas. Estes nanossistemas possuem propriedades

importantes como o tamanho em nanómetros, alta eficiência da carga e a estabilidade *in vivo*. São adequados para o encapsulamento de fármacos pouco solúveis em água mediante encapsulamento físico. O transporte ativo pode ser conseguido pelo direcionamento específico, pela ligação seletiva aos recetores expressos na superfície das células cancerosas [113]. O AS1411-C₁₈H₃₇ foi associado ao fármaco anticancerígeno aprovado pela Administração de alimentos e medicamentos (*FDA*) dos Estados Unidos da América para o tratamento de CPNPC em estadio inicial e avançado. Uma importante limitação deste fármaco é sua rápida degradação metabólica e estreito índice terapêutico. Deste modo, é importante melhorar a sua janela terapêutica aumentando assim a sua eficiência no tratamento do cancro [86, 114]. Como alternativa para potenciar as propriedades farmacocinéticas, aumentar a sua meia-vida e, a sua capacidade anticancerígena pretende-se, com este trabalho, a utilização deste nanossistema.

O nanossistema formado foi caracterizado utilizando técnicas como a eletroforese em gel de agarose, dispersão dinâmica da luz (DLS), microscopia eletrónica de transmissão (MET), microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e espectroscopia de CD. Para verificar a atividade na viabilidade celular foi realizado o método (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) (MTT) em linhas celulares A549 e NHDF.

Capítulo 2

2. Objetivos do trabalho

Para abordar uma nova alternativa terapêutica para o tratamento do cancro de pulmão, e considerando as múltiplas vantagens das estruturas G4 e do uso dos aptameros, o principal objetivo deste trabalho é desenvolver um nanossistema baseado no aptamero AS1411 lípido-modificado para entrega específica do fármaco GEM, para terapia do CPNPC.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Produção e caracterização de nanopartículas a partir do 5´-lípido-AS1411;
- Encapsulamento do fármaco GEM na nanopartícula formada;
- Avaliação da libertação da GEM ao longo do tempo;
- Avaliação do efeito antiproliferativo do nanossistema numa linha celular cancerosa do pulmão (A549) e numa linha celular saudável (NHDF).

Capítulo 3

3. Materiais e Métodos

3.1 Síntese e Purificação do aptamero

O aptamero 5'-octadecil-AS141 ($C_{18}H_{37}$ -5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3') foi sintetizado, em colaboração, pela Dra. Brune Violet utilizando a metodologia de fosforamidite num sintetizador de ADN automatizado H8 (K&A Laborgeraete, Alemanha) em escala μmol em suporte de iniciador 1000 Å, conforme o método já publicado [111]. O aptamero foi purificado utilizando uma coluna de HPLC de fase reversa. A pureza e identidade do aptamero foi comprovada por espectrometria de massa MALDI-TOF.

O oligonucleótido lipídico liofilizado foi lavado utilizando concentradores Millipore com membranas de celulosa. Deste modo, foi dissolvido em 2 mL de água Milli-Q no concentrador e posteriormente centrifugado a uma velocidade de 3000 G durante 30 min à temperatura ambiente. Após o primeiro ciclo de centrifugação, descartou-se a solução e foram adicionados mais 2 mL de água Milli-Q, este processo foi repetido por mais cinco vezes. No fim deste processo, o concentrador foi invertido e centrifugou-se durante 2 min a 3000 G para a recolha do oligonucleótido lipídico.

A concentração do oligo-lípido foi determinada por espectroscopia UV num espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Scientific™ Evolution 201 – EUA), com uma célula de quartzo de 10 mm a partir do valor de absorbância a 260 nm e do coeficiente de extinção molar (ϵ) do oligonucleótido seguindo a relação Lambert-Beer. O ϵ foi calculado utilizando a ferramenta *onlineoligo analyzer* da *Integrated DNA Technology*. A solução de oligo-lípido foi preparada com água Milli-Q com concentrações de 349.23 μM e 901.1 μM e armazenadas a -20 °C até à sua posterior utilização.

3.2 Formação de nanoagregado

Tendo em conta os dados já reportados na literatura para a formação dos nanoagregados foram testados, numa primeira fase, vários tampões de fosfato de potássio 20 mM, contendo diferentes concentrações de NaCl, KCl e MgCl_2 (145 mM NaCl, 5 mM KCl; 145 mM NaCl, 40 mM KCl; 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl_2) [92, 112, 115, 116].

Os nanoagregados formaram-se espontaneamente após a ressuspensão do conjugado oligo-lípido em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 6.9 (contendo 145 mM de NaCl e 20 mM de KCl, daqui em diante referido como tampão 1×). Esta suspensão foi centrifugada a 12 000 RCF durante 20 min, recolhendo-se apenas o sobrenadante.

O sobrenadante, foi filtrado utilizando um filtro de seringa de 0.2 µm (Termo Scientific Titan3™) e armazenado a 4 °C até a sua utilização. Os nanoagregados foram formados na ausência e na presença de GEM a uma concentração de 30 µM.

De acordo com os resultados obtidos por Carvalho *et al.*, para a maioria das experiências, a concentração de nanoagregado utilizada foi de 5 µM, correspondente à concentração oligo-lípido em solução [104].

3.2.1 Encapsulamento da GEM

A GEM foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 1 mM. Numa primeira fase foram realizadas experiências para determinar a quantidade/concentração máxima de GEM no nanossistema, fazendo uma análise da intensidade de fluorescência das amostras (tampão 1× + GEM; nanoagregado + GEM) num intervalo de concentrações (0 µM; 0.25 µM; 5 µM; 10 µM; 15 µM; 20 µM; 25 µM; 30 µM; 35 µM; 40 µM) em comprimentos de onda de excitação/emissão de 360/640 nm, respetivamente.

Neste trabalho, 30 µM de GEM foi adicionado à solução que contem nanoagregados, seguindo-se a agitação continua durante toda a noite, utilizando a HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.3 Caracterização dos nanoagregados

A caracterização dos nanoagregados formados foi realizada através de diferentes técnicas, de forma a determinar a sua distribuição do tamanho e morfologia.

3.3.1 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel foi realizada utilizando gel de agarose 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1× a 120 V durante 50 min. Como marcador de peso molecular de ADN foi usado um marcador de 25 pares de bases HyperLadder™ 25bp (Bioline, UK). A eletroforese foi realizada com uma fonte de alimentação Biometra P25 a 25 °C em tampão TBE 1×(Sigma-Aldrich, USA). O gel foi corado com 0.001% de Xpert Green DNA Stain (GRiSP, Portugal) e visualizado num sistema UVitec FireReader (UVitec, UK).

3.3.2 DLS

A distribuição do tamanho de partículas e o índice de polidispersidade/dispersão (PDI) foram determinados através da técnica DLS utilizando o instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). As amostras foram analisadas em triplicado a uma temperatura de 25 °C, usando como solução dispersante o tampão fosfato 1×. O nanoagregado foi analisado antes e depois do encapsulamento da GEM.

3.3.3 MEV

A morfologia, tamanho e a agregação dos nanoagregados foram avaliados por MEV, utilizando um microscópio Hitachi S-2700 (Krefeld, Alemanha).

As amostras (nanoagregado encapsulando GEM e nanoagregado) foram misturadas com tungstênio 2% para um maior contraste na imagem. De seguida, as amostras foram colocadas numa lamela de vidro e deixadas secar à temperatura ambiente (de forma que ocorra desidratação/secagem das amostras).

Foram realizados vários ensaios MEV e conforme aos resultados obtidos realizaram-se alterações na formulação dos nanoagregados. No primeiro ensaio foram analisados duas amostras, nanoagregado com GEM 15 µM e nanoagregado com GEM 30 µM (na formação dos nanoagregados a solução só foi filtrada), as imagens foram adquiridas com uma amplificação de 1 000×, 1 500×, 15 000×.

Posteriormente foram testadas três amostras de nanoagregados com diferentes condições, a primeira solução com nanoagregados foi submetida a 3 lavagens com água Milli-Q, outra que foi centrifugada e posteriormente filtrada e por último a amostra de nanoagregado com GEM 30 µM (na formação do nanoagregado a solução foi submetida a centrifugação e filtração). Estas amostras foram visualizadas e as imagens foram adquiridas com uma amplificação de 10 000×, 12 000×, 15 000×.

De acordo com as imagens obtidas das amostras em diferentes condições, foi repetido este ensaio, analisando uma amostra, que após a formação espontânea de nanoagregados foi submetida a centrifugação e filtração. Seguidamente encapsulou-se 30 µM de GEM. As imagens desta amostra foram adquiridas com uma amplificação de 5 000×, 10 000×, 20 000×.

3.3.4 MET

De forma a obter imagens bidimensionais mais definidas e analisar a morfologia e tamanho dos nanoagregados, também foi utilizada a técnica de TEM utilizando um microscópio Hitachi-HT7700 (Krefeld, Alemanha).

A preparação das amostras foi realizada de acordo com o procedimento anteriormente mencionado.

Neste ensaio foram analisadas duas amostras: nanoagregado de AS144-C₁₈H₃₇ e nanoagregado de AS1411-C₁₈H₃₇ com GEM 15 µM. As imagens foram adquiridas com ampliações 8 000×, 15 000×, 20 000× e 25 0000×.

3.3.5 CD

Os espectros de CD foram adquiridos usando um espectropolarímetro CDF-426S/15 (Jasco J-815, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier.

O oligo-lípido foi usado numa concentração a 10 µM em tampão 1×. As leituras foram realizadas numa célula de quartzo de 1 mm a 25 °C, contendo um volume final de 250 µL. Os espectros foram adquiridos entre os comprimentos de onda de 200 nm e 340 nm, com uma velocidade de varrimento de 100 nm/min, largura de banda de 1 nm, um tempo de resposta de 1 seg com varrimento contínuo e 3 acumulações.

3.4 Liberação da GEM

A liberação de GEM a partir das nanopartículas realizou-se mediante o método de dialise [117]. Para a caracterização do processo de liberação *in vitro* da GEM foram adicionados 100 µL da amostra de nanoagregado numa mini-unidade de dialise Slide-A-Lyzer™ (Thermo Fisher Scientific, USA). A dialise foi realizada em tubos eppendorf de 1,5 mL sobre agitação constante utilizando o sistema de mistura de amostra Hula Mixer (Thermo Fisher Scientific, USA) em 1 mL de solução tampão 1×.

Durante diferentes períodos (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h e 48 h), num tubo eppendorf foi colocado 1 mL de solução tampão 1× e na unidade de diálise colocou-se 100 µL do nanoagregado encapsulado com GEM e encaixou-se neste tubo, a seguir foi colocado num agitador HulaMixer Sample Mixer (Thermo Fisher Scientific, EUA) durante o tempo correspondente. Após o tempo correspondente, as amostras de 100 µL foram recolhidas e o mesmo volume de tampão 1× fresco foi adicionado ao meio de diálise, com o objetivo de manter um volume constante durante o ensaio.

A liberação da GEM foi quantificada pela medição de fluorescência das amostras recolhidas utilizando um espectrofluorômetro Spectramax Gemini XS (Molecular Devices LLC, USA), usando comprimentos de onda de excitação/emissão de 360/ 640 nm, respetivamente.

3.5 Ensaio de viabilidade celular

Para a avaliação dos efeitos na proliferação celular foram utilizadas duas linhas celulares, uma linha celular de adenocarcinoma de pulmão humano (A549) e uma linha de fibroblastos normais da derme humana (NHDF). As linhas celulares foram

cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² e mantidos a 37 °C numa incubadora de atmosfera húmida com 5% de CO₂.

A linha celular A549 foi cultivada em meio Ham's F-12 (Sigma-Aldrich) contendo 2 g/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro fetal de bovino (SFB) e 1% de antibiótico/antimicótico (AB – solução com 10.000 unidades/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina-B) (Sigma-Aldrich). As células NHDF foram cultivadas em meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio e 1% AB.

Após a tripsinização e contagem, 100 µL de uma suspensão de células em meio apropriado com densidade de 2 × 10⁴ células/mL foi semeada em cada poço de uma placa de 96 poços, deixando-se aderir durante 48 h. Após o tempo de adesão, o meio foi removido e substituído pelas diferentes soluções de estímulo a realizar (detalhado na **Tabela 2**), incubando-se por 72 h. As células não tratadas foram utilizadas como controlo negativo.

Tabela 2: Concentrações de cada estímulo utilizado nos ensaios de viabilidade celular.

Estímulos	Concentrações usadas (µM)
GEM	100; 50; 1; 0.5; 0.25; 0.05; 0.025; 0.015; 0.010; 0.005; 0.0025; 0.0001
Nanoagregado	10; 5; 1; 0.5; 0.1; 0.05; 0.025; 0.01; 0.05; 0.001
Nanoagregado + GEM	10; 5; 1; 0.5; 0.1; 0.05; 0.025; 0.01; 0.05; 0.001

A viabilidade celular foi avaliada quantificando a extensão de redução do MTT(Sigma-Aldrich). Este é um método colorimétrico no qual a molécula de MTT é reduzida, em células viáveis, ao seu derivado, formazano [118]. Após o tempo de incubação de 72 h, o meio foi substituído por 100 µL de uma solução de MTT, preparada no meio adequado isento de SFB, seguindo-se um período de incubação a 37 °C durante 4h na ausência de luz. Passado este tempo, a solução MTT foi removida e os cristais de formazano formados foram dissolvidos em DMSO. A absorvância foi medida no leitor de microplacas BioRad xMark™ (BioRad, EUA) a 570 nm.

A viabilidade celular foi expressa como média ± SEM de três ensaios independentes realizados em quadruplicado. Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir da curva dose-resposta, utilizando OriginPro2016.

Capítulo 4

4. Resultados e Discussão

AS1411 é um oligonucleótido de ADN capaz de formar uma estrutura de G4, que atua como um aptamero para a NCL, uma proteína sobre-expressa na superfície celular das células A549 [109]. Além disso, o AS1411 possui várias características que podem ser utilizadas na terapia do cancro, em particular no CP.

O AS1411 tem uma farmacologia sub-ótima e baixo potencial anticancerígeno em comparação com outros agentes, no entanto, demonstrou ter um perfil farmacológico seguro e também apresentou uma acumulação seletiva no tumor, características importantes para ser utilizado como potencial agente de entrega seletiva de fármacos [91].

O aptamero AS1411 tem sido utilizado para funcionalizar e direcionar NPs contendo diferentes agentes anticancerígenos para vários tipos de células. Além disso, os nanossistemas funcionalizados com este aptamero podem fazer a entrega seletiva às células tumorais, reduzindo assim, a toxicidade associada à entrega não seletiva das terapias convencionais do cancro [91, 94]. O AS1411 consegue direcionar eficazmente as NPs aos tumores via NCL, sobre expressa em células cancerosas. Após a sua ligação específica, a endocitose de NPs aumenta, resultando numa maior internalização [91].

Devido à sua natureza rica em G, o AS1411 apresenta um alto grau de polimorfismo estrutural. De forma a diminuir esta limitação têm-se desenvolvido diversas estratégias, como a substituição e/ou adição de nucleotídeos, utilização de sequências com nucleosídeos modificados ou conjugação com diferentes grupos químicos, que resultam na estabilização da estrutura do aptamero [111, 112] e no aumento da sua função terapêutica [94, 102].

Ao longo dos anos têm-se formulado vários sistemas de entrega de fármacos baseados em G4, utilizados para a terapia de diversos cancros, através de diferentes estratégias. Recentemente, explorou-se uma nova abordagem baseada em sistemas supramoleculares, uma estratégia utilizada para sintetizar nanoestruturas através de forças não covalentes [119, 120].

Na literatura tem sido relatado que os G4 representam um transportador supramolecular atrativo para a entrega seletiva de agentes terapêuticos, mas o seu polimorfismo conformacional é um limitante. Desta forma a modificação lípidica de

sequências de oligonucleótidos propensas a formarem G4 oferecem estabilidade à estrutura [104, 111, 112]. Recentemente foi reportado, a formação espontânea de agregados estáveis para oligonucleótidos formadores de G4 conjugados com lípidos [111, 121].

Neste trabalho propõe-se, a formulação de NPs baseadas em G4 para terapia do CP. Os nanoagregados, têm surgido recentemente, como um transportador coloidal supramolecular promissor para terapia direcionada. Estas estruturas são adequadas para o encapsulamento de fármacos pouco solúveis em água [113].

4.1. Caracterização de nanoagregados AS1411-lípido modificado

Os nanoagregados foram formados após a ressuspensão do conjugado lípido-oligonucleótido em tampão. Tendo em conta a CMC reportada na literatura [104], a concentração de oligo-lípido em solução utilizada na maioria dos ensaios deste trabalho é de 5 μ M.

4.1.1 Eletroforese em gel de agarose

Riccardi *et al.*, explorou o comportamento conformacional e as propriedades de agregação de aptâmeros de AS1411 conjugados com lípidos, observando, através de gel de agarose o comportamento do AS1411 e 5'-estearil-AS1411 (uma sequência AS1411 com uma cauda 5'-lipídica), tendo como oligonucleótido de referência uma sequência de telômero humano 26 (tel₂₆), conhecido por adotar estruturas G4 unimoleculares em solução. Ao analisar os resultados obtidos para o 5'-estearil-AS1411, observou-se uma banda bem definida, com mobilidades semelhante à sequência tel₂₆ e acompanhada por um arrastamento da banda correspondente a grandes agregados. Mas esta banda, não é evidente a uma concentração de 5 μ M, é pouco detectável a 10 μ M, só tornou-se evidente a 50 μ M. Também observou-se que espécies bimoleculares, bem caracterizadas para AS1411 [57], estão ausentes nos sistemas lípido-modificados, enquanto, em altas concentrações, grandes agregados são as espécies predominantes. Os resultados obtidos indicaram que o AS1411 e o seu derivado lípido-modificado estão presentes em solução em múltiplas espécies G4 (geralmente unimoleculares), enquanto ao derivado de AS1411 lípido-modificado incluem agregados [112].

Adicionalmente, como foi mencionado anteriormente, existe evidência de que o aptâmero AS1411 conjugado com lípidos dobra-se em estruturas G4 unimoleculares estáveis e paralelas, por conseguinte, as caudas lipídicas favorecem a formação de conjuntos micelares (em concentrações <10 μ M) [111, 112].

Neste contexto, foi realizada a caracterização do nanossistema formado pelo oligonucleótido AS1411 modificado com lípido, através da eletroforese em gel de agarose. Como demonstrado por Carvalho *et al.* a composição do tampão (50 mM NaCl, 5 mM KCl e 5 mM MgCl₂), é importante para a formação de agregados [104]. Neste sentido, foram avaliados diferentes tampões de maneira a determinar o melhor tampão para a formação dos nanoagregados. Após os estudos realizados, o melhor tampão mostrou ser o tampão 1× (tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 6.9, contendo 145 mM de NaCl e 20 mM de KCl).

A capacidade do oligonucleótido AS1411 modificado com a cauda lipídica para formar nanoagregado, utilizando tampão 1× e água foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 13).

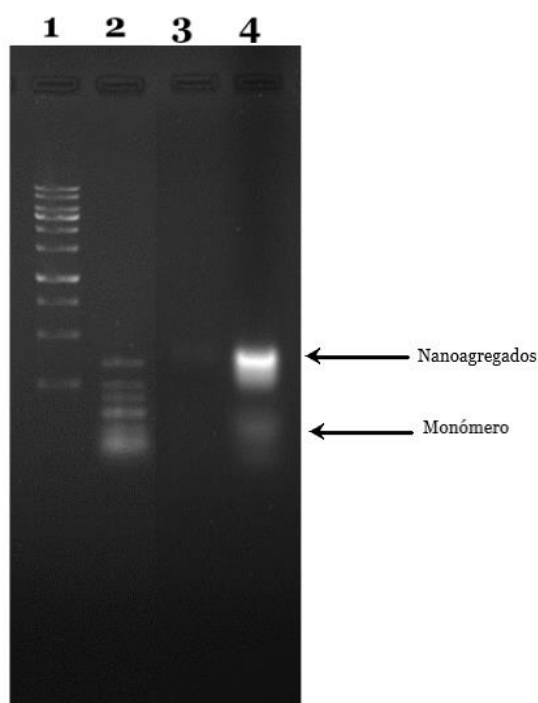


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1%. Poço 1: marcador 1 kB; Poço 2: marcador 25 bp; Poço 3: 5'-lípido-AS1411 (5 µM) em tampão 1×; Poço 4: 5'-lípido-AS1411 (20 µM) em água.

Pode ser identificada uma banda com pouca intensidade formada por AS1411-lípido modificado em tampão 1× na concentração de 5 µM (poço 3) e no poço 4 observa-se o arrastamento de uma banda bem definida formada por AS1411-lípido modificado em água numa concentração de 20 µM. Desta forma foi observada a capacidade de formação de nanoagregados na presença e na ausência de sais, também pode-se observar a presença de espécies monoméricas. Do mesmo modo, evidenciou-se que com o aumento da concentração do AS1411-lípido modificado se observa uma banda mais definida. Conforme aos resultados obtidos, observa-se a capacidade de AS1411

lípidio modificado de formar nanoagregados estáveis, tolerando as condições de separação da eletroforese em gel mesmo na ausência de sais, assim como a presença de espécies características de G4.

Posteriormente, foi avaliada a capacidade de formação de nanoagregados contendo diferentes concentrações de fármaco GEM (15 μM e 30 μM) e nanoagregados sem encapsular fármaco (Figura 14).

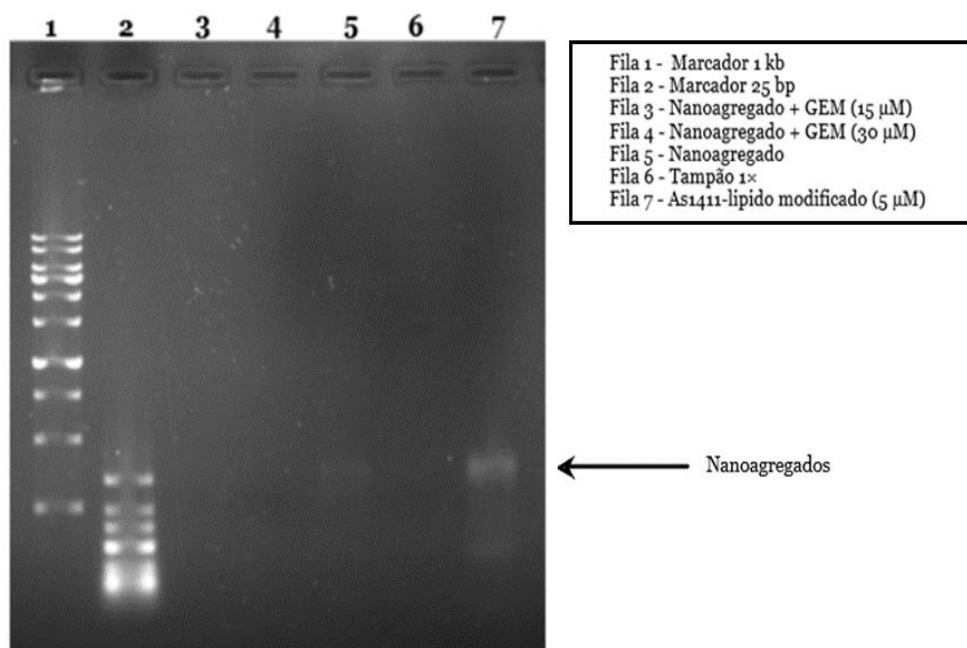


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1%. Poço 1: marcador 1kb; Poço 2: marcador 25 bp; Poço 3: nanoagregados com GEM (15 μM); Poço 4: nanoagregados com GEM (30 μM); Poço 5: nanoagregado (5 μM); Poço 6: tampão 1 \times ; Poço 7: AS₁₄₁₁-lípidio (5 μM).

Pode-se observar, a presença de uma banda com baixa intensidade formada pela presença de AS₁₄₁₁-lípidio modificado (poço 7). É ainda visível a migração de uma banda (pouco intensa) corresponde ao nanoagregado sem encapsular fármaco (poço 5). Nas bandas 3 e 4 que têm nanoagregados com GEM em concentrações de 15 μM e 30 μM , respectivamente, não se observou o aparecimento de bandas.

O arrastamento da banda 7 pode indicar a formação de uma estrutura estável do complexo AS₁₄₁₁-lípidio, na banda 5 observa-se migração muito pouco definida, que pode ser atribuível à presença de grandes agregados, que nesta concentração é pouco detetável. Desta forma, nas bandas 3 e 4 não se consegue observar migração, por causa da concentração do oligo-lípido. Com o aumento de concentração de oligo-lípido é provável que se observe uma banda mais definida.

Os resultados obtidos, indicam que o oligo-lípido nestas condições, tem a capacidade de formar nanoagregados e dobrar-se numa estrutura G4 unimolecular estável. De

forma a caracterizar melhor o nanossistema, foram ainda realizados vários ensaios biofísicos.

4.1.2 Dispersão dinâmica da luz

Após a formação dos nanoagregados estes foram caracterizados em termos de tamanho, dispersão e morfologia, utilizando as técnicas de DLS, MEV e MET.

A técnica de DLS baseia-se no movimento browniano das partículas, que é condicionado pelo coeficiente de dispersão das partículas, e relaciona-o com o seu tamanho. Uma característica deste movimento, é que as partículas pequenas têm a capacidade de se mover mais rapidamente do que as partículas maiores [122].

Esta técnica é utilizada para determinar o tamanho, a estabilidade coloidal e a distribuição de tamanho de partículas (nanopartículas, polímeros, proteínas) em suspensão. Desta forma, consegue-se obter informação relevante sobre o tamanho hidrodinâmico médio (*Z-average*) das partículas, o índice de polidispersidade (*PDI*) e a distribuição de tamanho de acordo à intensidade, volume e número. O PDI descreve o grau de “não uniformidade” de uma distribuição, um PDI baixo (<0.2) indica uniformidade de tamanhos na amostra, ou seja, a amostra é monodispersa. Ao contrário, um PDI elevado indica que a amostra é heterogénea e pode apresentar populações com diferentes tamanhos.

Na Tabela 3 estão representados os resultados obtidos na determinação do tamanho dos nanoagregados e da homogeneidade das amostras.

Tabela 3: Caracterização dos nanoagregados em termos de tamanho e polidispersibilidade. Os dados da tabela correspondem à média das 3 leituras da amostra. O desvio padrão foi calculado para as 3 medições.

Amostra	Tamanho da nanopartícula (nm)	PDI
Nanoagregados	159.7 ± 26.4	0.303
Nanoagregados + GEM (30 µM)	535.7 ± 48.3	0.736

Os nanoagregados formados por 5'-lípidio-AS1411 numa concentração de 5 µM apresentaram um tamanho médio de partícula de 159.7 ± 26.4 nm com um PDI relativamente alto. Estes resultados indicam que a amostra apresenta alta dispersibilidade e foram confirmados pelos resultados de DLS (Figura 15). Após a análise de DLS do nanoagregado sem encapsular fármaco pode-se observar a existência de duas populações de diferentes tamanhos (Figura 15A). Também foi avaliada uma amostra com nanoagregados formados por 5'-lípidio-AS1411 numa concentração de 10

μM (Figura 16), apresentando um tamanho médio de partícula de $306.7 \pm 33.2 \text{ nm}$, assim se observou uma variação significativa no tamanho das amostras com diferentes concentrações de oligo-lípido. Como é conhecido, a concentração de lípidos pode ter um efeito significativo sobre o tamanho das nanopartículas [123], portanto, é provável que em concentrações maiores de oligo-lípido seja observado um aumento no tamanho das partículas formadas.

De forma semelhante, os nanoagregados encapsulando $30 \mu\text{M}$ de GEM apresentaram um tamanho médio de $535.7 \pm 48.3 \text{ nm}$ com um PDI ainda maior do que o apresentado para o nanoagregado sem GEM. Nesta amostra, também são observadas duas populações de tamanho (Figura 15B). Conforme estes resultados, observa-se um aumento do tamanho nos nanoagregados após a incorporação do fármaco, que pode ser atribuído ao encapsulamento da GEM no núcleo hidrofóbico do nanoagregado. Também se pode verificar esta variação de tamanhos nos picos de intensidade dos nanoagregados sem encapsular e dos nanoagregados com GEM, indicando um aumento de tamanho destes últimos.

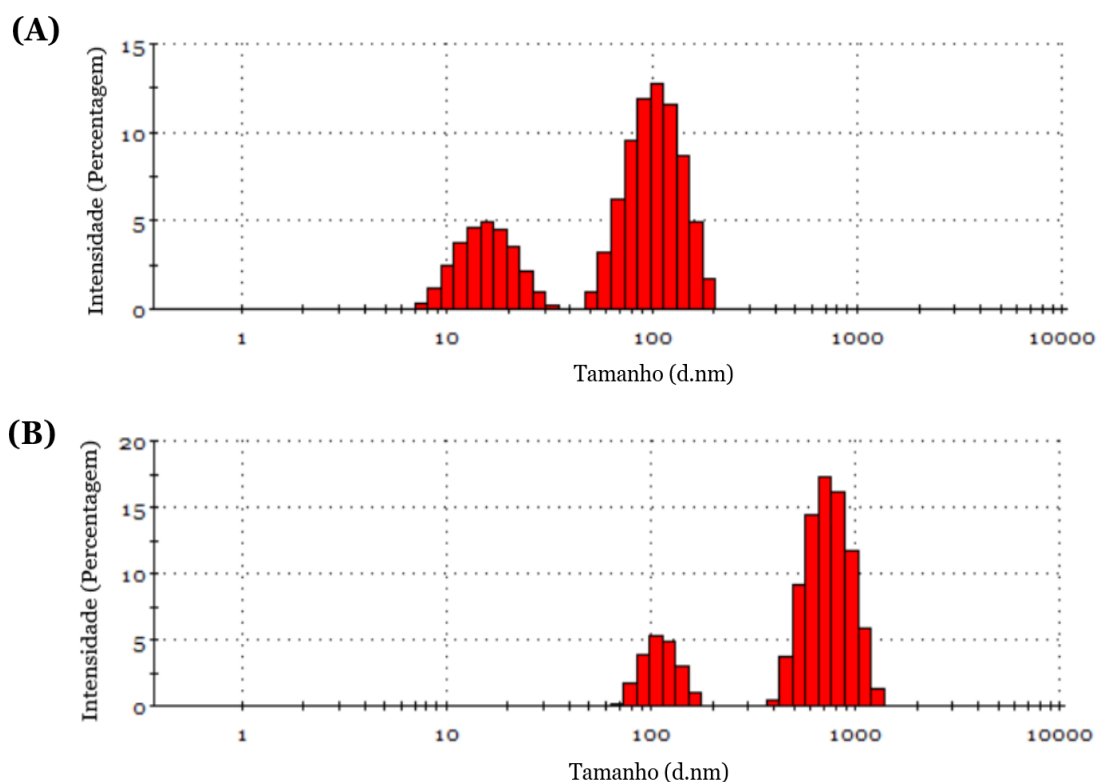


Figura 15: Distribuição de tamanho de acordo à intensidade. (A) Análise DLS de nanoagregados formados por 5'-lípidio-AS1411 em tampão $1\times$. São observados dois picos de intensidade (pico 1: $15.67 \pm 0.57 \text{ nm}$; pico 2: $104.59 \pm 4.23 \text{ nm}$) e (B) Análise DLS de nanoagregados 5'-lípidio-AS1411 encapsulando a GEM ($30 \mu\text{M}$). São observados, dois picos de intensidade (pico 1: $145.13 \pm 52.2 \text{ nm}$; pico 2: $904.7 \pm 185.8 \text{ nm}$).

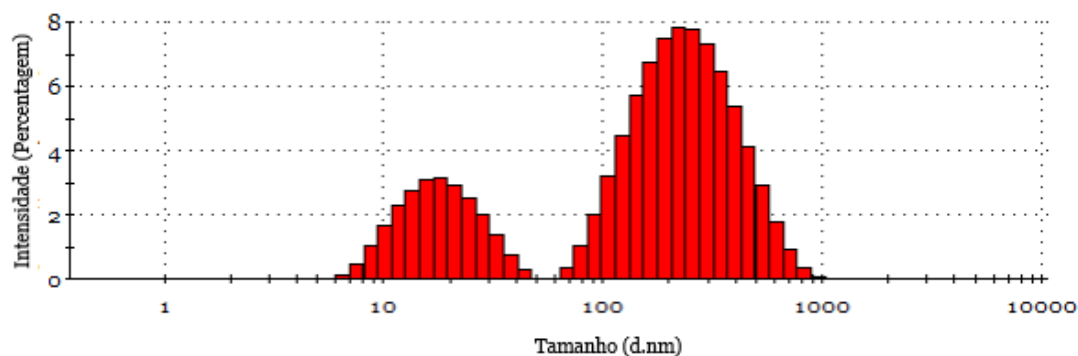


Figura 16: Distribuição de tamanho de acordo à intensidade de nanoagregados formados por 5'-lípidio-AS1411 numa concentração de 10 μM em tampão 1 \times . São observados dois picos de intensidade (pico 1: 17.47 ± 2.57 nm ; pico 2: 252.3 ± 15.47 nm)

4.1.3 Técnicas de microscopia eletrónica

Numa fase posterior as amostras de nanoagregados foram analisadas por microscopia eletrónica, especificamente por MEV e MET.

Nas micrografias obtidas pode-se observar que os nanoagregados formados por 5'-lípidio-AS1411 numa concentração de 5 μM , têm uma estrutura esférica bem definida e apresentam um tamanho médio de 210 nm (Figura 17A). Os nanoagregados encapsulando GEM apresentam um tamanho médio de 326 nm (Figura 17B). De este modo, confirma-se o aumento de tamanho dos nanoagregados após incorporação do GEM, já indicado pela técnica de DLS.

A distribuição de tamanho dos nanoagregados determinado por MEV foi ligeiramente diferente daquele observado por DLS. Esta disparidade entre os resultados é principalmente provocada pelo processo de preparação das amostras para a MEV, uma vez que são avaliadas em seco e não estão hidratadas como no DLS. Ainda assim, pode-se observar a presença de diferentes populações de tamanhos nas duas amostras, confirmando a heterogeneidade das amostras.

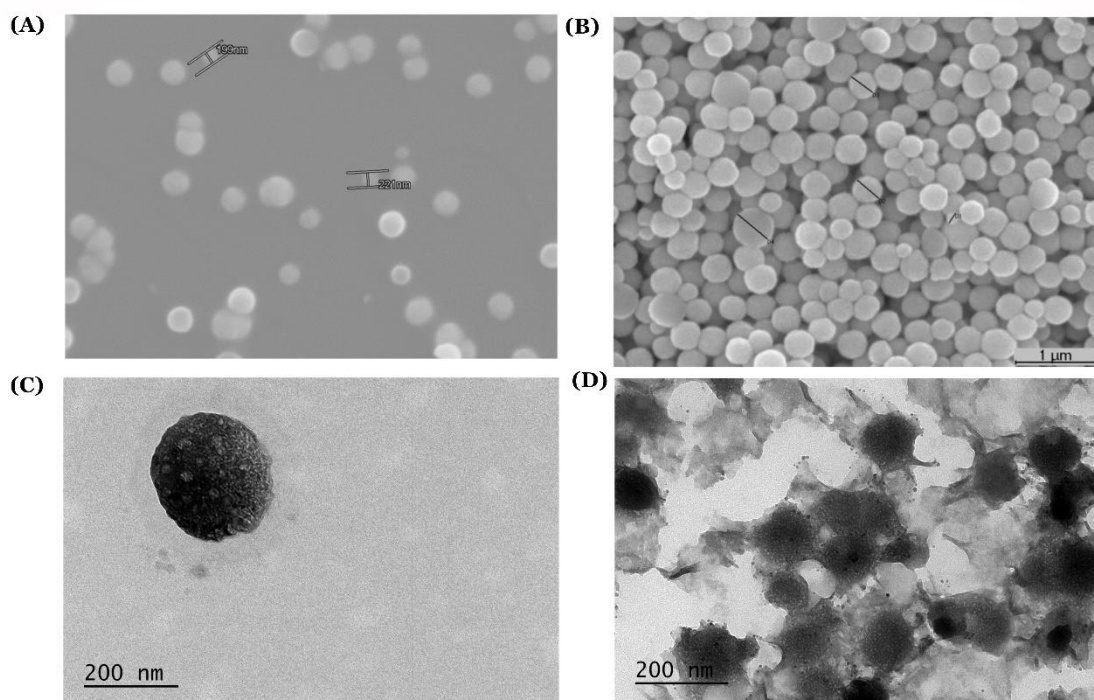


Figura 17: Micrografias obtidas utilizando MEV de (A) nanoagregados formados por 5' lípido-AS1411 em tampão 1x (ampliação 12 000×), onde foram medidas duas partículas, (D1: 199 nm; D2: 221 nm e de (B) nanoagregados 5' -lípido-AS1411 encapsulando 30 μM de GEM (ampliação 20 000×) (D1: 147 nm; D2:343 nm; D3:326 nm; D4:488 nm). Micrografias obtidas mediante análises MET de (C) nanoagregados formados a partir 5' -lípido-AS1411 em tampão 1x (ampliação 25 000×) e de (D) nanoagregados 5' -lípido-AS1411 encapsulando 15 μM de GEM (ampliação 25 000×).

4.1.4 Dicroísmo circular

Existe evidência sobre a natureza altamente polimórfica do aptamero AS1411 [57, 91], pelo que foi avaliado o efeito da conjugação lipídica na estrutura conformacional deste aptamero através da técnica CD. Esta técnica biofísica permite analisar a estrutura, as alterações conformacionais e o efeito dos cátions na estrutura [124, 125].

Conforme o espectro de CD de AS1411 relatado em vários trabalhos [57, 88, 112], este aptamero pode apresentar uma banda negativa aos 240 nm, e duas bandas positivas, a maior a cerca de 260 nm e uma mais fraca a cerca de 295 nm. Estas bandas características correspondem a estruturas de G4 predominantemente com topologia paralela com uma pequena porção com conformação G4 antiparalela, evidenciada pela banda fraca a 295 nm.

Na Figura 18 está indicado o espectro de CD obtido para o 5' -lípido-AS1411 em tampão 1x. O espectro de CD para o AS1411-lípido modificado apresenta uma banda negativa a 240 nm e uma banda positiva a 260 nm. Estas características são consistentes com uma estrutura de G4 com topologia paralela [112, 121, 125]. O espectro de CD não apresenta

uma banda positiva a 295 nm, indicando a ausência de conformações G4 com topologia antiparalela. Desta forma pode-se concluir que a modificação lipídica, nesta sequência de AS1411, promove a formação de uma estrutura G4 paralela estável.

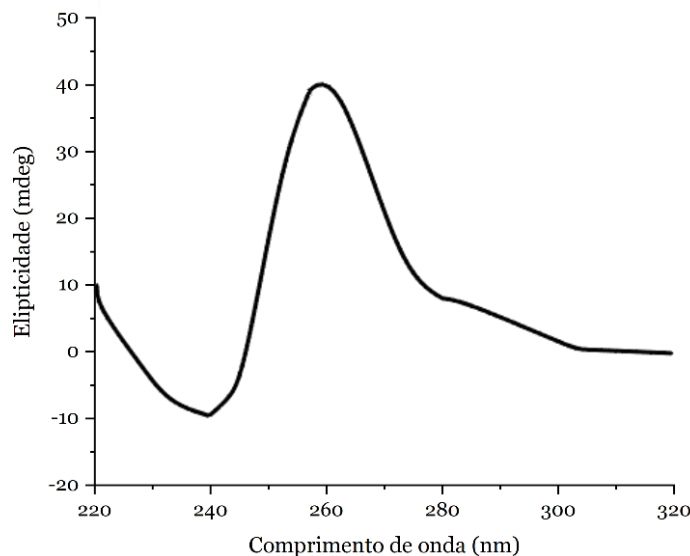


Figura 18: Espectro de CD de 5'-lípidio-AS1411 em tampão 1x, onde se apresentam bandas características de uma estrutura G4 paralela.

4.2. Liberação da GEM

A avaliação *in vitro* da liberação do fármaco GEM dos nanoagregados foi realizada pelo método de diálise. Neste método, a separação física da formulação é conseguida por uma membrana de diálise, onde o fármaco libertado das nanopartículas é difundido através da membrana para o compartimento exterior, do qual se recolhe a amostra para análise posterior (Figura 19) [117]. O resultado obtido mediante este método oferece uma correlação com a liberação de fármaco *in vivo*.

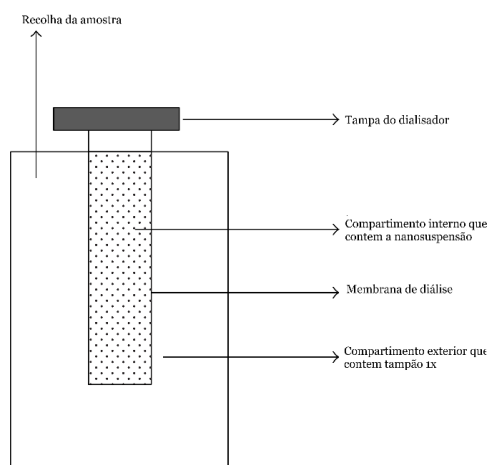


Figura 19: Representação gráfica do método de diálise. Adaptado de [117].

O perfil de liberação da GEM nos nanoagregados, foi avaliada em tampão 1× e acompanhou-se ao longo do tempo (Figura 20). O valor da concentração, que corresponde à observância obtida, foi calculado mediante a curva padrão da GEM, que foi realizada num intervalo de concentrações de 0.25 - 30 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$.

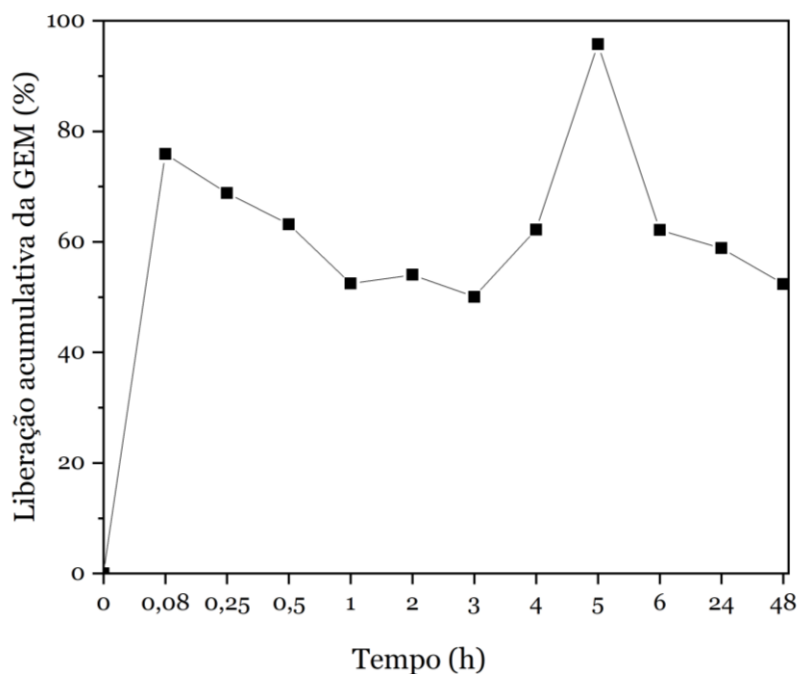


Figura 20: Perfil de liberação cumulativa da GEM dos nanoagregados 5'-lipido-AS1411 em tampão 1×

Uma vez obtida a curva de calibração do fármaco, calculou-se a percentagem cumulativa de liberação do fármaco para cada hora. Na Tabela 4 pode-se observar um aumento da liberação do fármaco a partir da 4 h, atingindo o máximo de liberação após 5 h. Após 5 h pode-se observar uma evidente diminuição na capacidade de liberação do fármaco.

Na Tabela 4 estão representadas as percentagens de liberação de GEM obtidas ao longo do tempo. Conforme aos resultados obtidos pode-se observar que os nanoagregados carregados com GEM mostraram uma liberação contínua do fármaco ao longo de 48 h, com uma liberação cumulativa média de cerca de 63.25% até o final do período avaliado.

Tabela 4: Percentagem de libertação da GEM ao longo do tempo.

Tempo (h)	GEM libertado (%)
0.08	75.91
0.25	68.81
0.5	63.17
1	52.45
2	54.05
3	50.04
4	62.21
5	95.79
6	62.14
24	58.85
48	52.36

4.3. Ensaios de viabilidade celular

De modo a avaliar o efeito na viabilidade celular dos nanoagregados foram realizados ensaios MTT. Para estes estudos foi utilizada a linha A549 e NHDF.

Numa primeira fase, foi avaliado o efeito na viabilidade celular da GEM livre em concentrações entre 0.0001 – 100 μM em ambas linhas celulares (Figura 21).

Na linha celular cancerosa A549 é possível observar que nas concentrações mais baixas de GEM, apresenta-se maior toxicidade nesta linha, comparado com as células NHDF e há redução da viabilidade celular com o aumento da concentração do fármaco. Pode-se observar que a GEM apresenta efeito citotóxico mais acentuado na linha celular A549 em concentrações entre 0.015 – 100 μM . No entanto, um aumento da toxicidade é também provocado na linha saudável. Como mencionado anteriormente, os fármacos quimioterápicos provocam também toxicidade em células normais [40], o que se pode comprovar nos resultados obtidos.

Como representado na Figura 21, a partir da concentração de 0.25 μM há maior toxicidade na linha celular saudável quando comparada com a linha celular cancerosa A549.

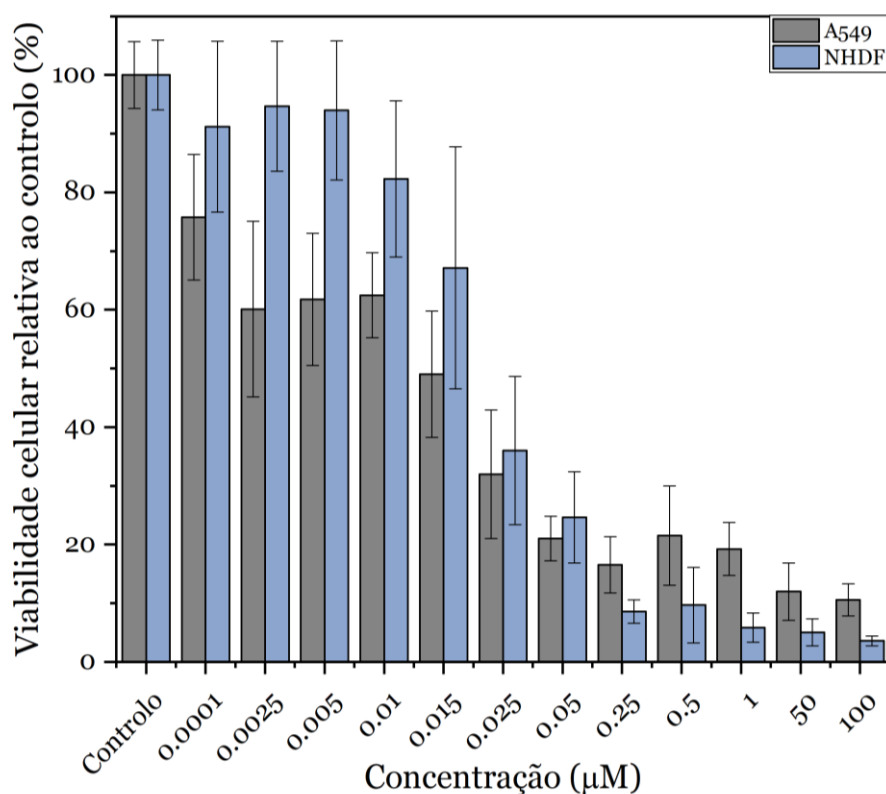


Figura 21: Percentagem da viabilidade celular de acordo ao contro do fármaco GEM em diferentes concentrações, nas linhas celulares A549 e NHDF.

Os valores IC_{50} para a GEM, apresentaram valores semelhantes para ambas linhas celulares A549 e NHDF (0.019 μM e 0.020 μM , respetivamente). Na Figura 24A pode-se observar a curva de viabilidade celular dependente da concentração do fármaco livre para A549 e NHDF, indicando que o GEM livre tem um efeito citotóxico em ambas linhas celulares.

Estes resultados evidenciam ainda o esperado efeito na falta de seletividade da GEM, embora se verifique toxicidade nas duas linhas celulares, nas concentrações mais altas há uma redução maior da viabilidade celular nas células normais.

De forma a contornar esta limitação foi testado o nanossistema formado a partir do AS1411-lípido modificado, pretendendo-se uma diminuição do efeito citotóxico nas células normais e um aumento da toxicidade na linha celular cancerosa quando comparado com o GEM livre.

Numa fase inicial foi determinado o efeito na viabilidade celular do nanoagregado formado a partir de 5'-lípido-AS1411 sem GEM encapsulado (Figura 22).

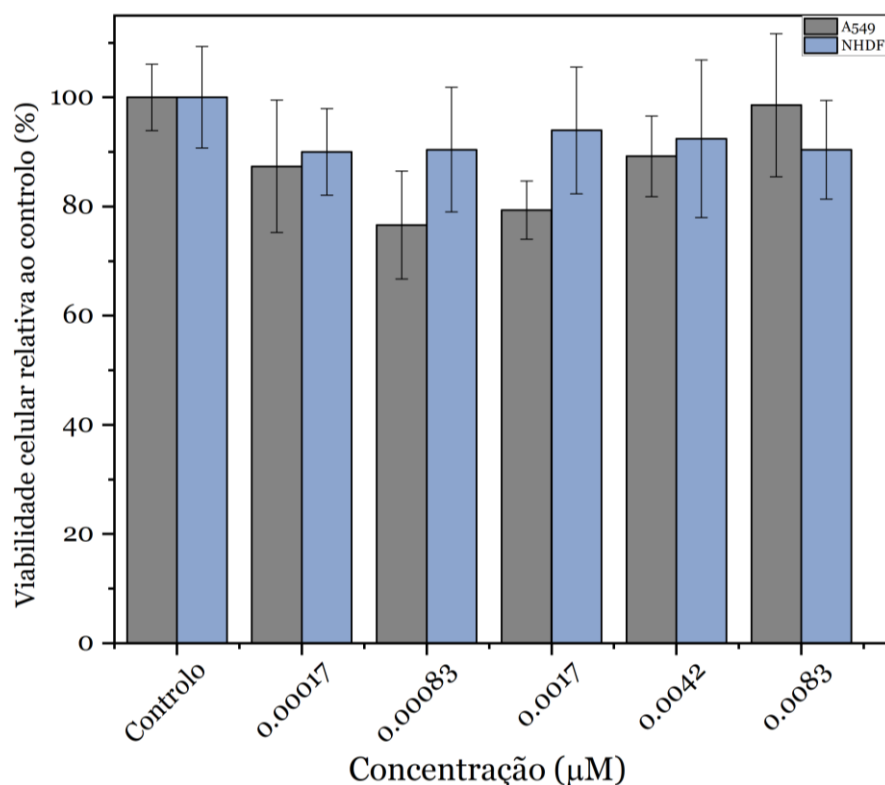


Figura 22: Percentagem de viabilidade celular provocada nas linhas celulares A549 e NHDF pelo nanoagregado formado a partir de 5'-lípidio-AS1411 em diferentes concentrações.

Pode-se observar que há maior toxicidade nas células A549 do que nas células NHDF, no entanto a diferença não é significativa, sugerindo que o nanoagregado não induz diminuição na viabilidade celular.

Esta diminuição na viabilidade das células A549, pode ser atribuível à presença de AS1411 na superfície dos nanoagregados, e aos seus efeitos antiproliferativos e seletivos. Estes resultados indicam que o nanotransportador não é tóxico para ambas as linhas celulares, não se observando um efeito significativo na redução da viabilidade celular.

Posteriormente, foi avaliado o efeito induzido na viabilidade celular pela exposição das linhas celulares ao nanoagregado carregado com GEM em concentrações entre 0.001 – 10 μM durante 72 h, mantendo a proporção de 1:6 (oligo-lípido:GEM) (Figura 23).

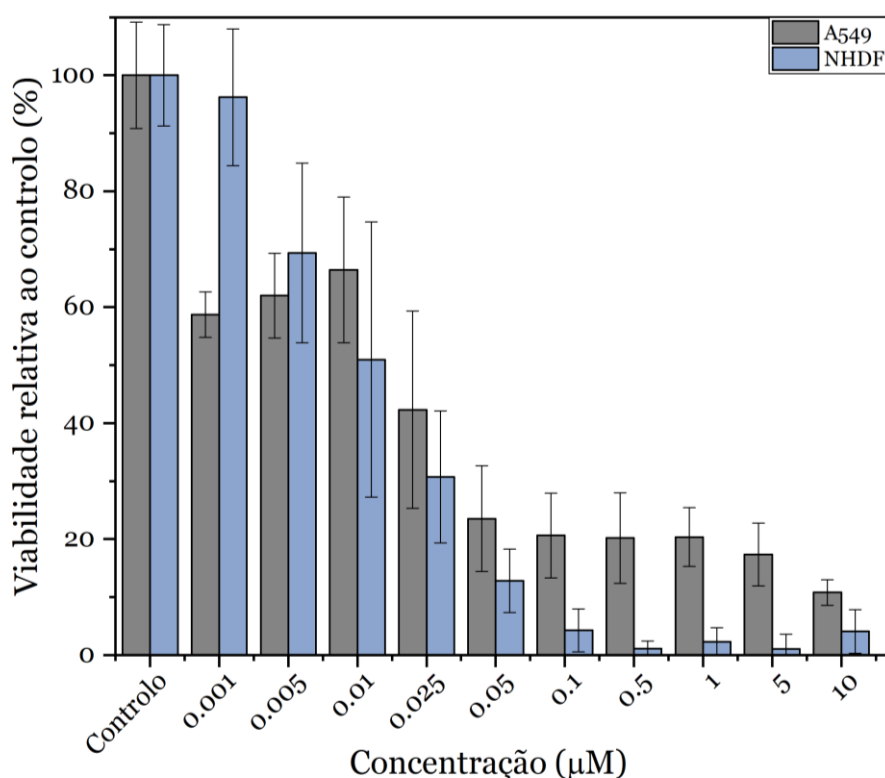


Figura 23: Percentagem da viabilidade celular induzida pelo nanoagregado carregado com GEM em concentrações entre 0.001 – 10 µM, mantendo uma proporção de 1:6, oligo-lípido:GEM.

Na Figura 23 pode-se observar que nas duas concentrações mais baixas (0.001 µM e 0.005 µM) há um efeito citotóxico significativamente maior nas células cancerosas A549 quando comparadas com as células NHDF. Ao aumentar a concentração do nanoagregado carregado com GEM, este efeito é contrário, sendo que há um maior efeito citotóxico na viabilidade celular das células NHDF.

Os resultados obtidos indicam que o nanossistema carregado com GEM não mostrou ser significativamente mais eficaz nas células A549, quando comparado com o GEM livre. Enquanto nas células NHDF, apresenta-se maior efeito citotóxico na presença da GEM quando comparado com o nanossistema carregado com GEM.

Os valores de IC₅₀ para o nanoagregado com GEM foram 0.033 µM para A549 e 0.012 µM para NHDF (Figura 24B).

Os estudos do efeito do nanossistema na viabilidade celular das células A549 e NHDF permitiram concluir que este nanossistema, apesar de caracterizado, mostra não ser totalmente eficaz para o CPNPC.

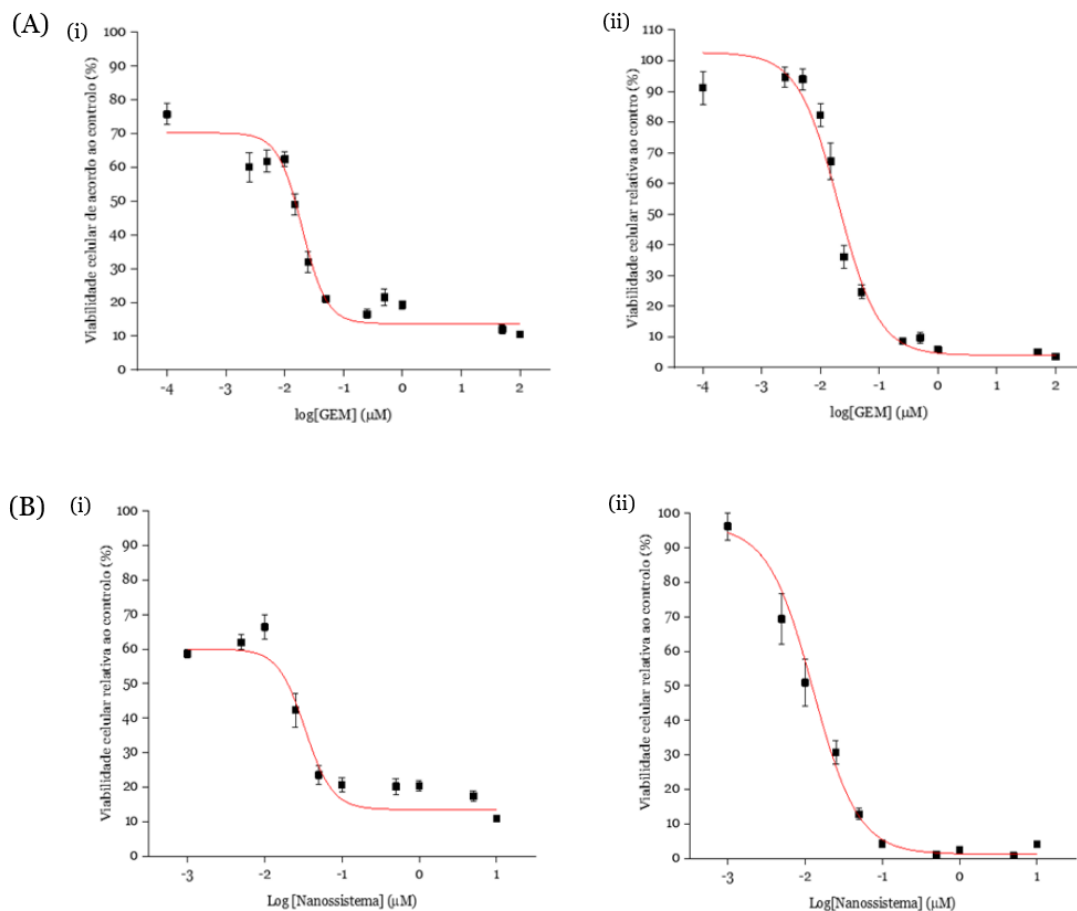


Figura 24:(A) Curvas dependentes da concentração de viabilidade celular de acordo ao controlo em (i) A549 e (ii) NHDF, após incubação de GEM em concentrações entre 0.001 – 100 μM , durante 72 h e (B) Curvas dependentes da concentração de viabilidade de acordo ao controlo em (i) A549 e (ii) NHDF, após incubação do nanoagregado com GEM em concentrações entre 0.001 – 10 μM , durante 72 h.

Capítulo 5

5. Conclusões e Perspetivas futuras

Nos últimos anos tem sido de grande relevância o estudo de novas estratégias terapêuticas para diversos tipos de cancros, tendo havido um interesse exponencial no desenvolvimento de novos sistemas de entrega de medicamentos quimioterápicos. Estes sistemas, têm como objetivo melhorar o perfil farmacocinético do fármaco e permitir a entrega específica ao tumor. Deste modo, pretende-se melhorar a qualidade de vida do doente, com a diminuição de diversos sintomas que causados pela toxicidade não específica e aumentar a eficácia do tratamento.

As nanopartículas são uma estratégia inovadora que oferece várias vantagens como sistemas de entrega direcionado, ainda assim, a maioria de formulações encontradas na literatura envolvem diversas etapas de sínteses além de precisarem ser conjugadas a um agente de direcionamento para a entrega específica do fármaco. Evidências sugerem que o AS1411 é um ótimo agente de direcionamento, utilizado como constituinte numa variedade de sistemas de entrega. Recentemente, tem-se relatado que a modificação lipídica de oligonucleótidos formadores de G4, aumentam a estabilidade da estrutura e permitem a formação de agregados micelares. A estabilidade destes sistemas micelares dependem da natureza do lípido, da sequência do oligonucleótido e da natureza dos sais presentes em solução.

O presente trabalho teve como finalidade o desenvolvimento de um nanossistema baseado no aptamero G4 AS1411 conjugado com um lípido, para entrega seletiva do fármaco quimioterápico GEM, sendo uma estratégia terapêutica para o CPCNP.

Neste trabalho, foi demonstrado que a modificação lipídica de AS1411 permite a formação de nanoagregados, que posteriormente foram utilizados para a entrega seletiva do fármaco GEM. Os nanoagregados formados foram caracterizados mediante diferentes ensaios biofísicos de forma a determinar a sua morfologia e tamanho.

Numa primeira fase, foi avaliada a capacidade do AS1411 conjugado com lípido para formar nanoagregados, para o qual foi necessário a determinação de um tampão que favoreça a sua formação. Observou-se a formação de nanoagregados sugerido pelo arrastamento das bandas de oligonucleótidos e a presença de monómeros, indicando estruturas G4 unimoleculares.

Os nanoagregados formados apresentaram um tamanho médio de 159.7 ± 26.4 nm. Após encapsulação da GEM os nanoagregados aumentaram o tamanho médio para 535.7 ± 48.3 nm, indicando a encapsulação física do fármaco. Também se observou um aumento de tamanho do nanoagregado ao aumentar a concentração de oligo-lípido. Enquanto, à morfologia, apresentaram ter estruturas esféricas bem definidas, quer os nanoagregados sem a encapsulação do fármaco quer os nanoagregados com GEM. Além disso, determinou-se que o lípido conjugado na extremidade 5' da sequência G4, não afeta a capacidade de AS1411 para formar uma estrutura G4 estável.

Nos nanoagregados com fármaco foi avaliada a percentagem de libertação da GEM, indicando uma libertação contínua deste fármaco ao longo do tempo. Finalmente, foram realizados estudos de viabilidade celular, de forma a determinar a toxicidade dos nanoagregados formados. Os nanoagregados sem a incorporação da GEM promoveram uma diminuição semelhante na viabilidade de células cancerosas e saudáveis, indicando a segurança do nanossistema. O nanoagregado com GEM, não mostrou ser eficaz na entrega seletiva do fármaco, uma vez que provocou a diminuição da viabilidade das células saudáveis.

Como perspetivas futuras, pode ser considerado a formulação de um nanossistema utilizando outro fármaco anticancerígeno utilizando no tratamento do CPCNP, com a doxorrubicina. Também se poderia considerar a nova formulação do nanossistema com outro aptamero G4, nomeadamente um derivado de AS1411.

Referências

- [1] L. Pecorino, “What is cancer?,” in *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*, Third edit., Oxford University press, 2012, pp. 1–20.
- [2] J. S. Bertram and L. Pecorino, “The molecular biology of cancer,” *Mol Aspects Med*, vol. 21, no. 6, pp. 167–223, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8).
- [3] N. Chatterjee and G. C. Walker, “Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis,” *Environ Mol Mutagen*, vol. 58, no. 5, pp. 235–263, 2017, doi: <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- [4] G. Frosina, “Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA,” *Eur. J. Biochem*, vol. 267, no. 8, pp. 2135–2149, 2000, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01266.x>.
- [5] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [6] R. A. Weinberg and D. Hanahan, “The Hallmarks of Cancer,” *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000, doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- [7] H. Sung, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F., “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [8] F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass, and I. Soerjomataram, “The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide,” *Cancer*, vol. 127, no. 16, pp. 3029–3030, 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/cncr.33587>.
- [9] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 4, pp. 313–313, 2018, doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [10] Global Cancer Observatory, “Global Cancer Observatory,” *International Agency for Research on Cancer 2020 WHO*, 2020. <https://gco.iarc.fr/today/home> (accessed Aug. 18, 2021).

- [11] Y. Sekido, K. M. Fong, and J. D. Minna, "Molecular Genetics of Lung Cancer," *Annu Rev Med*, vol. 54, pp. 73–87, 2003, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.med.54.101601.152202>.
- [12] P. P. Massion and D. P. Carbone, "The molecular basis of lung cancer: Molecular abnormalities and therapeutic implications," *Respir Res*, vol. 4, no. 12, pp. 1–15, 2003, doi: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-4-12>.
- [13] H. Lemjabbar-Alaoui, O. U. I. Hassan, Y. W. Yang, and P. Buchanan, "Lung cancer: Biology and treatment options," *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, vol. 1856, no. 2, pp. 189–210, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
- [14] R. J. Cersosimo, "Lung cancer: A review," *American Journal of Health- System Pharmacy*, vol. 59, no. 7, pp. 611–642, 2002, doi: <https://doi.org/10.1093/ajhp/59.7.611>.
- [15] B. C. Bade and C. S. dela Cruz, "Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, Prevention," *Clin Chest Med*, vol. 41, no. 1, pp. 1–24, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>.
- [16] S. S. Hecht, "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 91, no. 14, pp. 1194–1210, 1999. doi: <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>.
- [17] J. Subramanian and R. Govindan, "Lung cancer in never smokers: A review," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no. 5, pp. 561–570, 2007. doi: [10.1200/JCO.2006.06.8015](https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.8015).
- [18] Y. Mao, D. Yang, J. He, and M. J. Krasna, "Epidemiology of Lung Cancer," *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 25, no. 3. Elsevier Inc, pp. 439–445, 2016. doi: [10.1016/j.soc.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.001).
- [19] L. G. Collins, C. Haines, R. Perkel, and R. E. Enck, "Lung cancer: diagnosis and management," *Am Fam Physician*, vol. 75, no. 1, pp. 56–63, 2007.
- [20] S. Tsim, C. A. O'Dowd, R. Milroy, and S. Davidson, "Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): A review," *Respiratory Medicine*, vol. 104, no. 12. Elsevier Ltd, pp. 1767–1774, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.08.005>.
- [21] M. Duruisseaux and M. Esteller, "Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 51. Elsevier, pp. 116–128, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.09.005> Get rights and content.

- [22] W. D. Travis, "Pathology of Lung Cancer," *Clinics in Chest Medicine*, vol. 32, no. 4. Elsevier Inc, pp. 669–692, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.005>.
- [23] W. D. Travis, E. Brambilla, A. P. Burke, A. Marx, and A. G. Nicholson, "Introduction to the 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 10, no. 9. pp. 1240–1242, 2015. doi: <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000663>.
- [24] N. Duma, R. Santana-Davila, and J. R. Molina, "Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment," *Mayo Clin Proc*, vol. 94, no. 8, pp. 1623–1640, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>.
- [25] M. Zheng, "Classification and Pathology of Lung Cancer," *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 25, no. 3. Elsevier Inc, pp. 447–468, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>.
- [26] W. A. Cooper, D. C. L. Lam, S. A. O’Toole, and J. D. Minna, "Molecular biology of lung cancer," *Journal of Thoracic Disease*, vol. 5, no. SUPPL.5. pp. S479–S490, 2013. doi: [10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03).
- [27] H. Araujo, L. Horn, R. E. Merritt, K. Shilo, Xu-Welliver, and DP., "Cancer of the Lung," in *Abeloff’s Clinical Oncology*, Sixth Edit., Philadelphia: Elsevier, 2020, pp. 1108–1156. Accessed: Aug. 10, 2022. [Online]. Available: <https://abeloffs-clinical-oncology.elsevierdigitaledition.com>
- [28] K. Wadowska, I. Bil-Lula, Ł. Trembecki, and M. Śliwińska-Mossoń, "Genetic markers in lung cancer diagnosis: A review," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 13, p. 4569, 2020, doi: [10.3390/ijms21134569](https://doi.org/10.3390/ijms21134569).
- [29] P. Martin, N. B. Leighl, M. S. Tsao, and F. A. Shepherd, "KRAS mutations as prognostic and predictive markers in non-small cell lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 8, no. 5, pp. 530–542, 2013, doi: [10.1097/JTO.ob013e318283d958](https://doi.org/10.1097/JTO.ob013e318283d958).
- [30] I. Ferrer, J. Zugazagoitia, S. Herberth, W. John, L. Paz-Ares, and G. Schmid-Bindert, "KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy," *Lung Cancer*, vol. 124, pp. 53–64, 2018, doi: [10.1016/j.lungcan.2018.07.013](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013).
- [31] H. Kadara, P. Scheet, I. I. Wistuba, and A. E. Spira, "Early events in the molecular pathogenesis of lung cancer," *Cancer Prevention Research*, vol. 9, no. 7, pp. 518–527, 2016, doi: [10.1158/1940-6207.CAPR-15-0400](https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0400).

- [32] P. Goldstraw , Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, Shepherd FA, “Non-small-cell lung cancer,” *Lancet*, vol. 378, no. 9804, pp. 1727–1740, 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(10)62101-0.
- [33] S. Devarakonda, D. Morgensztern, and R. Govindan, “Genomic alterations in lung adenocarcinoma,” *Lancet Oncology*, vol. 16, no. 7, pp. e342–e351, 2015, doi: 10.1016/S1470-2045(15)00077-7.
- [34] S. S. Fois, P. Paliogiannis, A. Zinellu, A. G. Fois, A. Cossu, and G. Palmieri, “Molecular epidemiology of the main druggable genetic alterations in non-small cell lung cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 2, p. 612, 2021, doi: 10.3390/ijms22020612.
- [35] Z. Marino F, Bianco R, Accardo M, Ronchi A, Cozzolino I, Morgillo F, Rossi G, Franco R., “Molecular heterogeneity in lung cancer: From mechanisms of origin to clinical implications,” *Int J Med Sci*, vol. 16, no. 7, pp. 981–989, 2019, doi: 10.7150/ijms.34739.
- [36] L. JackieJohnson, S. Pillai, and S. P. Chellappan, “Genetic and biochemical alterations in non-small cell lung cancer,” *Biochem Res Int*, vol. 2012, p. 18, 2012, doi: <https://doi.org/10.1155/2012/940405>.
- [37] R. S. Herbst, D. Morgensztern, and C. Boshoff, “The biology and management of non-small cell lung cancer,” *Nature*, vol. 553, pp. 446–454, 2018, doi: <https://doi.org/10.1038/nature25183>.
- [38] I. Wieleba, K. Wojas-Krawczyk, and P. Krawczyk, “Aptamers in Non-small cell lung cancer treatment,” *Molecules*, vol. 25, no. 14, p. 3138, 2020, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25143138>.
- [39] D. Xiang , Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani AZ, Zhou SF, Kong L, Li Y, Pu C, Duan W., “Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: The next generation of cancer medicine,” *Theranostics*, vol. 5, no. 1, pp. 23–42, 2015, doi: doi:10.7150/thno.10202.
- [40] M. Kim, D. M. Kim, K. S. Kim, W. Jung, and D. E. Kim, “Applications of cancer cell-specific aptamers in targeted delivery of anticancer therapeutic agents,” *Molecules*, vol. 23, no. 4, p. 830, 2018, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23040830>.
- [41] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*, Fifth Edit. New York, 2004. [Online]. Available:

<https://biokamikazi.files.wordpress.com/2013/10/biochemistry-stryer-5th-ed.pdf>

- [42] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edi. New York: WH Freeman New York, 2005. doi: <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>.
- [43] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid,” *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953, doi: <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- [44] A. Travers and G. Muskhelishvili, “DNA structure and function,” *FEBS Journal*, vol. 282, no. 12, pp. 2279–2295, 2015, doi: <https://doi.org/10.1111/febs.13307>.
- [45] P. Belmont, J. F. Constant, and M. Demeunynck, “Nucleic acid conformation diversity: From structure to function and regulation,” *Chem Soc Rev*, vol. 30, no. 1, pp. 70–81, 2001, doi: 10.1039/a904630e.
- [46] S. B. Zimmerman, “The three-dimensional structure of DNA.,” *Annual review of biochemistry*, vol. 51, pp. 395–427, 1982. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.002143>.
- [47] S. M. Mirkin, “Discovery of alternative DNA structures: A heroic decade (1979–1989),” *Frontiers in Bioscience*, vol. 13, no. 3, pp. 1064–1071, 2008, doi: <https://doi.org/10.2741/2744>.
- [48] Limongelli V, De Tito S, Cerofolini L, Fragai M, Pagano B, Trotta R, Cosconati S, Marinelli L, Novellino E, Bertini I, Randazzo A, Luchinat C, Parrinello M, “The G-triplex DNA,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 52, no. 8, pp. 2269–2273, 2013, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201206522>.
- [49] C. K. Kwok and C. J. Merrick, “G-Quadruplexes: Prediction , Characterization , and Biological Application,” *Trends Biotechnol*, vol. 35, no. 10, pp. 997–1013, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.012>.
- [50] J. Carvalho, J. L. Mergny, G. F. Salgado, J. A. Queiroz, and C. Cruz, “G-quadruplex, Friend or Foe: The Role of the G-quartet in Anticancer Strategies,” *Trends Mol Med*, vol. 26, no. 9, pp. 848–861, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.002>.
- [51] D. Yang and C. Lin, “Human Telomeric G-Quadruplex Structures and G-Quadruplex,” in *Telomeres and Telomerase: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1587, Z. Songyang, Ed. Humana New York, 2017, pp. 171–195. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6892-3>.

- [52] C. Carvalho, Josué, Ferreira, João, Pereira, P., Coutinho, E., Guédin, Aurore, Nottelet, Pierre, Salgado, Gilmar F., Mergny, Jean Louis, Queiroz, J. A., Sousa, F., Cabrita, Eurico J., Cruz, “Stabilization of novel immunoglobulin switch regions G-quadruplexes by naphthalene and quinoline-based ligands,” *Tetrahedron*, vol. 72, no. 9, pp. 1229–1237, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.01.022>.
- [53] D. Bhattacharyya, G. M. Arachchilage, and S. Basu, “Metal cations in G-quadruplex folding and stability,” *Front Chem*, vol. 4, no. 38, pp. 1–14, 2016, doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00038>.
- [54] H. Guiset Miserachs, “Structure and Dynamics of Human RNA G-Quadruplex Motifs,” University of Zurich, 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.5167/uzh-118724>
- [55] S. L. B. König, A. C. Evans, and J. L. Huppert, “Seven essential questions on G-quadruplexes,” *Biomolecular Concepts*, vol. 1, no. 2, pp. 197–213, Aug. 2010. doi: 10.1515/bmc.2010.011.
- [56] A. Guédin, J. Gros, P. Alberti, and J. L. Mergny, “How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability,” *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no. 21, pp. 7858–7868, 2010, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq639>.
- [57] M. M. Dailey, M. Clarke Miller, P. J. Bates, A. N. Lane, and J. O. Trent, “Resolution and characterization of the structural polymorphism of a single quadruplex-forming sequence,” *Nucleic Acids Res*, vol. 38, no. 14, pp. 4877–4888, 2010, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq166>.
- [58] J. Spiegel, S. Adhikari, and S. Balasubramanian, “The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes,” *Trends Chem*, vol. 2, no. 2, pp. 123–136, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.07.002>.
- [59] N. Kosiol, S. Juranek, P. Brossart, A. Heine, and K. Paeschke, “G-quadruplexes: a promising target for cancer therapy,” *Mol Cancer*, vol. 20, no. 1, pp. 1–18, 2021, doi: <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01328-4>.
- [60] C. Roxo, W. Kotkowiak, and A. Pasternak, “G-quadruplex-forming aptamers—characteristics, applications, and perspectives,” *Molecules*, vol. 24, no. 20, p. 3781, 2019, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24203781>.
- [61] B. Gatto, M. Palumbo, and C. Sissi, “Nucleic Acid Aptamers Based on the G-Quadruplex Structure: Therapeutic and Diagnostic Potential,” *Curr Med Chem*,

- vol. 16, no. 10, pp. 1248–1265, 2009, doi: <https://doi.org/10.2174/092986709787846640>.
- [62] H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. R. Rosato, W. Tan, and Y. Zu, “Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer therapy,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 3, no. 8, p. e182, 2014, doi: <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.32>.
- [63] A. v. Lakhin, V. Z. Tarantul, and L. v. Gening, “Aptamers: Problems, solutions and prospects,” *Acta Naturae*, vol. 5, no. 4, pp. 34–43, 2013, doi: <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>.
- [64] J. Banerjee and M. Nilsen-Hamilton, “Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research,” *J Mol Med*, vol. 91, no. 12, pp. 1333–1342, Dec. 2013, doi: <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1085-2>.
- [65] M. H. Ali, M. E. Elsherbiny, and M. Emara, “Updates on Aptamer Research,” *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 10, p. 2511, May 2019, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20102511>.
- [66] S. M. Nimjee, R. R. White, R. C. Becker, and B. A. Sullenger, “Aptamers as Therapeutics,” *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 57, no. 1, pp. 61–79, Jan. 2017, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104558>.
- [67] L. Ma, Haitao, Liu, Jinping, Ali, M. Monsur, Mahmood, M. Arif Iftakher, Labanieh and Y. Lu, Mengrou, Iqbal, Samir M., Zhang, Qun, Zhao, Weian, Wan, “Nucleic acid aptamers in cancer research, diagnosis and therapy,” *Chem Soc Rev*, vol. 44, no. 5, pp. 1240–1256, 2015, doi: <https://doi.org/10.1039/C4CS00357H>.
- [68] G. Zhu, M. Ye, M. J. Donovan, E. Song, Z. Zhao, and W. Tan, “Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy,” *Chemical Communications*, vol. 48, no. 85, pp. 10472–10480, 2012, doi: <https://doi.org/10.1039/c2cc35042d>.
- [69] J. Lopes-Nunes, P. Oliveira, and C. Cruz, “G-Quadruplex-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy,” *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 7, p. 671, Jul. 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/ph14070671>.
- [70] A. Mokhtarzadeh, M. Tabarzad, J. Ranjbari, M. de la Guardia, M. Hejazi, and M. Ramezani, “Aptamers as smart ligands for nano-carriers targeting,” *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 82, pp. 316–327, Sep. 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.018>.

- [71] C. Tan, Weihong, Wang, Hui, Chen, Yan, Zhang, Xiaobing, Zhu, Haizhen, Yang and C. Yang, Ronghua, Liu, "Molecular aptamers for drug delivery," *Trends Biotechnol*, vol. 29, no. 12, pp. 634–640, Dec. 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.009>.
- [72] He F, Wen N, Xiao D, Yan J, Xiong H, Cai S, Liu Z, Liu Y., "Aptamer-Based Targeted Drug Delivery Systems: Current Potential and Challenges," *Curr Med Chem*, vol. 27, no. 13, pp. 2189–2219, Apr. 2020, doi: <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008142831>.
- [73] X. Wu, J. Chen, M. Wu, and J. X. Zhao, "Aptamers: Active Targeting Ligands for Cancer Diagnosis and Therapy," *Theranostics*, vol. 5, no. 4, pp. 322–344, 2015, doi: <https://doi.org/10.7150/thno.10257>.
- [74] X. Li, Q. Zhao, and L. Qiu, "Smart ligand: Aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy," *Journal of Controlled Release*, vol. 171, no. 2, pp. 152–162, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.06.006>.
- [75] Mohtar N, Parumasivam T, Gazzali AM, Tan CS, Tan ML, Othman R, Fazalul Rahiman SS, Wahab HA, "Advanced Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems and Their Cellular Evaluation for Non-Small Cell Lung Cancer Treatment," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 14, p. 3539, Jul. 2021, doi: [10.3390/cancers13143539](https://doi.org/10.3390/cancers13143539).
- [76] M. J. Campolongo, S. J. Tan, J. Xu, and D. Luo, "DNA nanomedicine: Engineering DNA as a polymer for therapeutic and diagnostic applications," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 62, no. 6, pp. 606–616, Apr. 2010, doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.004>.
- [77] D. H. Robinson and J. W. Mauger, "Drug delivery systems," *Am J Hosp Pharm*, vol. 48, no. 10 SUPPL.1, pp. S14–S23, 1991, doi: https://doi.org/10.1093/ajhp/48.10_Suppl_1.S14.
- [78] E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, A. Z. Wang, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery," *Trends Biotechnol*, vol. 26, no. 8, pp. 442–449, 2008, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.006>.
- [79] N. Joudeh and D. Linke, "Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists," *J Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1, p. 262, 2022, doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>.

- [80] A. M. Ealias and M. P. Saravanakumar, "A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application," *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, vol. 263, no. 3, 2017, doi: 10.1088/1757-899X/263/3/032019.
- [81] V. M. Chem, J Mater, Rossi, Beatriz, Menezes, Canuto De, Rodrigues, Karla Faquine, Schatkoski and R. Pereira, Monteiro, Guimara, "Current advances in drug delivery of nanoparticles for respiratory disease treatment," *J. Mater. Chem. B*, vol. 9, pp. 1745–1761, 2021, doi: 10.1039/d0tb01783c.
- [82] A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, and J. Huwyler, "Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 200, pp. 138–157, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.030.
- [83] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 5, pp. 1310–1316, 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.
- [84] N. Muhamad, T. Plengsuriyakarn, and K. Na-Bangchang, "Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: A systematic review," *Int J Nanomedicine*, vol. 13, pp. 3921–3935, 2018, doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S165210>.
- [85] Y. Wang, Hongmei, Zhao, Xin, Guo, Caihong, Ren, Dunqiang, Zhao and W. Xiao, Wei, Jiao, "Aptamer-dendrimer bioconjugates for targeted delivery of miR-34a expressing plasmid and antitumor effects in non-small cell lung cancer cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, p. e0139136., 2015, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139136>.
- [86] M. Alibolandi, M. Ramezani, K. Abnous, and F. Hadizadeh, "AS1411 Aptamer-Decorated Biodegradable Polyethylene Glycol-Poly (lactic-co-glycolic acid) Nanopolymersomes for the Targeted Delivery of Gemcitabine to Non-Small Cell Lung Cancer in Vitro," *J Pharm Sci*, vol. 105, no. 5, pp. 1741–1750, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.02.021>.
- [87] A. López-Serrano, R. M. Olivas, J. S. Landaluze, and C. Cámara, "Nanoparticles: A global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact," *Analytical Methods*, vol. 6, no. 1, pp. 38–56, 2014, doi: 10.1039/c3ay40517f.
- [88] P. J. Bates, D. A. Laber, D. M. Miller, S. D. Thomas, and J. O. Trent, "Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for

- cancer,” *Exp Mol Pathol*, vol. 86, no. 3, pp. 151–164, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2009.01.004>.
- [89] E. M. Reyes-Reyes, Y. Teng, and P. J. Bates, “A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: Uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism,” *Cancer Res*, vol. 70, no. 21, pp. 8617–8629, Nov. 2010, doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0920>.
- [90] G. W. Collie and G. N. Parkinson, “The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines,” *Chem Soc Rev*, vol. 40, no. 12, pp. 5867–5892, 2011, doi: [10.1039/c1cs15067g](https://doi.org/10.1039/c1cs15067g).
- [91] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O’Toole, and J. O. Trent, “G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms,” *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1861, no. 5, pp. 1414–1428, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.015>.
- [92] Z. Bagheri, B. Ranjbar, H. Latifi, M. I. Zibaii, T. T. Moghadam, and A. Azizi, “Spectral properties and thermal stability of AS1411 G-quadruplex,” *Int J Biol Macromol*, vol. 72, pp. 806–811, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.016>.
- [93] C. Platella, C. Riccardi, D. Montesarchio, G. N. Roviello, and D. Musumeci, “G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics,” *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1861, no. 5, pp. 1429–1447, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.027>.
- [94] P. Safarzadeh Kozani, P. Safarzadeh Kozani, and M. T. Malik, “AS1411-functionalized delivery nanosystems for targeted cancer therapy,” *Explor Med*, vol. 2, pp. 146–166, Apr. 2021, doi: <https://doi.org/10.37349/emed.2021.00039>.
- [95] Y. Huang, H. Shi, H. Zhou, X. Song, S. Yuan, and Y. Luo, “The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin,” *Blood*, vol. 107, no. 9, pp. 3564–3571, 2006, doi: [10.1182/blood-2005-07-2961](https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2961).
- [96] P. J. Xu, Xiaohua, Hamhouyia, Fofi, Thomas, Shelia D., Burke, Tom J., Girvan, Allicia C., McGregor, W. Glenn, Trent, John O., Miller, Donald M., Bates, “Inhibition of DNA Replication and Induction of S Phase Cell Cycle Arrest by G-rich Oligonucleotides,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 46, pp. 43221–43230, 2001, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M104446200>.

- [97] S. Soundararajan, W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck, and D. J. Fernandes, "The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells," *Cancer Res*, vol. 68, no. 7, pp. 2358–2365, 2008, doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5723>.
- [98] Liu J, Wei T, Zhao J, Huang Y, Deng H, Kumar A, Wang C, Liang Z, Ma X, Liang XJ., "Multifunctional aptamer-based nanoparticles for targeted drug delivery to circumvent cancer resistance," *Biomaterials*, vol. 91, pp. 44–56, 2016, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.013>.
- [99] D. A. Laber, B. S. Taft, G. H. Kloecker, P. J. Bates, J. O. Trent, and D. M. Miller, "Extended phase I study of AS1411 in renal and non-small cell lung cancers," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 18_suppl, pp. 13098–13098, Jun. 2006, doi: [10.1200/jco.2006.24.18_suppl.13098](https://doi.org/10.1200/jco.2006.24.18_suppl.13098).
- [100] E. M. Rosenberg, Jonathan E., Bambury, Richard M., Van Allen, N. Drabkin, Harry A., Lara, Primo N., Harzstark, Andrea L., Wagle, and D. A. Figlin, Robert A., Smith, Gregory W., Garraway, Levi A., Choueiri, Toni Erlandsson, Fredrik, Laber, "A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma," *Invest New Drugs*, vol. 32, no. 1, pp. 178–187, Nov. 2014, doi: [10.1007/s10637-013-0045-6](https://doi.org/10.1007/s10637-013-0045-6).
- [101] D. Stuart, R. K., Stockerl-Goldstein, K., Cooper, M., Devetten, M., Herzig, R., Medeiros, B., Schiller, G., Wei, A., Acton, G., Rizzieri, "Randomized phase II trial of the nucleolin targeting aptamer AS1411 combined with high-dose cytarabine in relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML)," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 15_suppl, pp. 7019–7019, May 2009, doi: [10.1200/jco.2009.27.15_suppl.7019](https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.15_suppl.7019).
- [102] Yazdian-Robati R, Bayat P, Oroojalian F, Zargari M, Ramezani M, Taghdisi SM, Abnous K., "Therapeutic applications of AS1411 aptamer, an update review," *Int J Biol Macromol*, vol. 155, pp. 1420–1431, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.118>.
- [103] P. J. Malik, Mohammad T, O'Toole, Martin G., Casson, Lavona K, Thomas, Shelia D, Bardi, Gina T, Reyes-Reyes, Elsa Merit, Ng, Chin K, Kang, Kyung A, Bates, "AS1411-conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy," *Oncotarget*, vol. 6, no. 26, pp. 22270–22281, 2015, doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4207>.
- [104] Carvalho J, Lopes-Nunes J, Vialet B, Rosado T, Gallardo E, Vale J, Eloy C, Ferreira S, Palmeira-de-Oliveira R, Campello MPC, Paulo A, Barthélémy P,

- Mergny JL, Salgado GF, Queiroz JA, Ellington AD, Cruz C., “Nanoaggregate-forming lipid-conjugated AS1411 aptamer as a promising tumor-targeted delivery system of anticancer agents in vitro,” *Nanomedicine*, vol. 36, no. 102429, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102429>.
- [105] Carvalho J, Paiva A, Cabral Campello MP, Paulo A, Mergny JL, Salgado GF, Queiroz JA, Cruz C., “Aptamer-based Targeted Delivery of a G-quadruplex Ligand in Cervical Cancer Cells,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 7945, 2019, doi: [10.1038/s41598-019-44388-9](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44388-9).
- [106] Trinh TL, Zhu G, Xiao X, Puszyk W, Sefah K, Wu Q, Tan W and Liu C. “A synthetic aptamer-drug adduct for targeted liver cancer therapy,” *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0136673, 2015, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136673>.
- [107] Y. Shieh, S. Yang, M. Wei, and M. Shieh, “Aptamer-Based Tumor-Targeted Drug,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 3, pp. 1433–1442, 2010, doi: <https://doi.org/10.1021/nn901374b>.
- [108] X. Li, Y. Yu, Q. Ji, and L. Qiu, “Targeted delivery of anticancer drugs by aptamer AS1411 mediated Pluronic F127/cyclodextrin-linked polymer composite micelles,” *Nanomedicine*, vol. 11, no. 1, pp. 175–184, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.08.013>.
- [109] Yang S, Ren Z, Chen M, Wang Y, You B, Chen W, Qu C, Liu Y, Zhang X., “Nucleolin-Targeting AS1411-Aptamer-Modified Graft Polymeric Micelle with Dual pH/Redox Sensitivity Designed to Enhance Tumor Therapy through the Codelivery of Doxorubicin/TLR4 siRNA and Suppression of Invasion,” *Mol Pharm*, vol. 15, no. 1, pp. 314–325, 2018, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b01093>.
- [110] Fan X, Sun L, Li K, Yang X, Cai B, Zhang Y, Zhu Y, Ma Y, Guan Z, Wu Y, Zhang L, Yang Z., “The Bioactivity of D-/L-Isonucleoside- and 2'-Deoxyinosine-Incorporated Aptamer AS1411s Including DNA Replication/MicroRNA Expression,” *Mol Ther Nucleic Acids*, vol. 9, pp. 218–229, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.09.010>.
- [111] B. Vialet, A. Gissot, R. Delzor, and P. Barthélémy, “Controlling G-quadruplex formation via lipid modification of oligonucleotide sequences,” *Chem. Commun.*, vol. 53, no. 84, pp. 11560–11563, 2017, doi: [10.1039/C7CC05693A](https://doi.org/10.1039/C7CC05693A).
- [112] Riccardi C, Musumeci D, Russo Krauss I, Piccolo M, Irace C, Paduano L, Montesarchio D., “Exploring the conformational behaviour and aggregation

- properties of lipid-conjugated AS1411 aptamers,” *Int J Biol Macromol*, vol. 118, no. Part B, pp. 1384–1399, 2018, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.137>.
- [113] V. K. Sharma, A. Jain, and V. Soni, “Nanoaggregates: Emerging delivery tools for tumor therapy,” *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 30, no. 6, pp. 535–563, 2013, doi: [10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013007706](https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013007706).
- [114] C. Manegold, “Gemcitabine in non-small cell lung cancer,” *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 4, no. 3, pp. 345–360, 2004, doi: [10.1586/14737140.4.3.345](https://doi.org/10.1586/14737140.4.3.345).
- [115] T. A. J6, D. F. S. Petri, L. M. Beltramini, N. Lucyszyn, and M. R. Sierakowski, “Xyloglucan nanoaggregates: Physico-chemical characterisation in buffer solution and potential application as a carrier for camptothecin, an anti-cancer drug,” *Carbohydr Polym*, vol. 82, no. 2, pp. 355–362, Sep. 2010, doi: [10.1016/j.carbpol.2010.04.072](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.072).
- [116] J. Zhang, R. Chen, X. Fang, F. Chen, Y. Wang, and M. Chen, “Nucleolin targeting AS1411 aptamer modified pH-sensitive micelles for enhanced delivery and antitumor efficacy of paclitaxel Template for Preparation of Manuscripts for Nano Research,” 2014, doi: [10.1007/s12274-014-0619-4](https://doi.org/10.1007/s12274-014-0619-4).
- [117] S. D’Souza, “A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms,” *Advances in Pharmaceutics*, vol. 2014, pp. 1–12, 2014, doi: [10.1155/2014/304757](https://doi.org/10.1155/2014/304757).
- [118] A. Bahuguna, I. Khan, V. K. Bajpai, and S. C. Kang, “MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug,” *Bangladesh J Pharmacol*, vol. 12, no. 2, pp. 115–118, 2017, doi: [10.3329/bjp.v12i2.30892](https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892).
- [119] J. Zhou, L. Rao, G. Yu, T. R. Cook, X. Chen, and F. Huang, “Supramolecular cancer nanotheranostics,” *Chem Soc Rev*, vol. 50, no. 4, pp. 2839–2891, 2021, doi: [10.1039/d0cs00011f](https://doi.org/10.1039/d0cs00011f).
- [120] M. J. Webber and R. Langer, “Drug delivery by supramolecular design,” *Chem Soc Rev*, vol. 46, no. 21, pp. 6600–6620, 2017, doi: [10.1039/c7cs00391a](https://doi.org/10.1039/c7cs00391a).
- [121] L. Cozzoli, L. Gjonaj, M. C. A. Stuart, B. Poolman, and G. Roelfes, “Responsive DNA G-quadruplex micelles,” *Chemical Communications*, vol. 54, no. 3, pp. 260–263, 2018, doi: [10.1039/c7cc07899d](https://doi.org/10.1039/c7cc07899d).

- [122] S. Bhattacharjee, “DLS and zeta potential - What they are and what they are not?” *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [123] P. G. Kakadia and B. R. Conway, “Solid lipid nanoparticles for targeted delivery of triclosan into skin for infection prevention,” *J Microencapsul*, vol. 35, no. 7–8, pp. 695–704, 2018, doi: 10.1080/02652048.2019.1576796.
- [124] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, and S. Neidle, “Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure,” *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no. 19, pp. 5402–5415, 2006, doi: 10.1093/nar/gkl655.
- [125] J. Carvalho, J. A. Queiroz, and C. Cruz, “Circular dichroism of G-Quadruplex: A laboratory experiment for the study of topology and ligand binding,” *J Chem Educ*, vol. 94, no. 10, pp. 1547–1551, 2017, doi: 10.1021/acs.jchemed.7b00160.