



Luís Henrique Eufrásio da Silva Cabanas

Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético associada a diferentes nanossistemas de base polimérica

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica
na Especialidade de Instrumentação e Biomateriais

Março de 2018



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Luís Henrique Eufrásio da Silva Cabanas

Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético associada a diferentes nanossistemas de base polimérica

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Vetores e Terapia Génica do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), sob a orientação científica do Doutor Henrique Faneca (CNC) e co-orientação da Doutora Rosemeyre Cordeiro (CNC).

Março de 2018

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação contou com diferentes altos e baixos, tendo havido, também, alguns percalços. Gostaria de começar por agradecer ao Doutor Henrique Faneca pela oportunidade, disponibilidade, paciência e conhecimentos transmitidos ao longo desta viagem.

À Rose, que me acompanhou também da melhor forma, seja na vertente teórica ou na transmissão de conhecimento das práticas laboratoriais, estando sempre disponível para ajudar.

Um agradecimento muito especial à Daniela, que me acompanhou ao longo de todo o processo, tendo prestado uma ajuda de valor incalculável e sem qualquer obrigação para comigo.

Aos meus pais, por, como sempre até aqui, me terem dado a oportunidade de estudar e de fazer as coisas sem dificuldades acrescidas, amparando as minhas pequenas quedas e dando toda a força do mundo para tentar sempre fazer melhor.

Por fim, mas não menos importante, aos meus amigos que, sem muitas vezes o saberem, me deram lições que serviram e continuarão a servir para os meus sucessos pessoais e que, de uma forma ou de outra, estiveram sempre ao meu lado quando precisei.

Conteúdo

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xv
Lista de Siglas	xvii
1 Introdução	1
1.1 História da Terapia Génica	1
1.2 Sistemas de transporte e entrega de material genético	4
1.2.1 Vetores virais	5
1.2.1.1 Vetores derivados de Adenovírus	7
1.2.1.2 Vetores derivados de Vírus Adeno-Associados	7
1.2.1.3 Vetores derivados de Herpes Simplex Virus (HSV)	8
1.2.1.4 Vetores derivados de Retrovírus	9
1.2.1.5 Vectores derivados de Lentivírus	9
1.2.2 Vetores Não-Virais	10
1.2.2.1 Métodos Físicos	11
1.2.2.2 Métodos Químicos	13
1.3 Nanopartículas Poliméricas	16
1.3.1 Conjugação do PEG com polímeros catiónicos	22
1.3.2 <i>Targeting</i> e <i>uptake</i> das nanopartículas	24
1.3.3 Escape endolisossomal e transporte citoplasmático	25
1.3.4 Importação do material genético para o núcleo celular	26
1.4 Objetivos	28
2 Materiais e Métodos	30
2.1 Materiais	30
2.2 Métodos	30

2.2.1	Cultura de células	30
2.2.2	Preparação dos políplexos	31
2.2.3	Capacidade de Transfeção – Ensaio de Luminescência	31
2.2.4	Ensaio de Viabilidade Celular	33
2.2.5	Caracterização Físico-Química das formulações	33
2.2.5.1	Análise da difusão dinâmica da luz e Potencial Zeta	34
2.2.5.2	Ensaio de intercalação do Brometo de Etídio	35
2.2.5.3	Ensaio de eletroforese em gel de agarose	36
3	Resultados e Discussão	37
3.1	Capacidade de transfeção das nanopartículas em COS 7 – Ensaio de Luminescência	38
3.2	Citotoxicidade dos políplexos na linha celular COS 7 – Ensaio de viabilidade celular	51
3.3	Citotoxicidade dos polímeros	59
3.4	Capacidade de transfeção das nanopartículas em HepG 2 – Ensaio de Luminescência	62
3.5	Citotoxicidade dos políplexos na linha celular HepG 2 – Ensaio de viabilidade celular	65
3.6	Caracterização Físico-Química dos políplexos	69
3.6.1	Tamanho e potencial zeta dos políplexos	69
3.6.2	Proteção e condensação do material genético	75
4	Conclusão e Perspetivas Futuras	80
4.1	Conclusão	80
4.2	Perspetivas Futuras	85
5	Referências	87

Índice de Figuras

- Figura 1- Principais marcos na história da terapia génica (Adaptado de History of Gene Therapy. Gene. 2013; 525 (2): 162-169). 2
- Figura 2- Representação gráfica das principais condições estudadas em ensaios de terapia génica (Visualizado em <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>). 3
- Figura 3- Barreiras para entrega de genes in vivo (Retirado de Non-Viral vectors for gene-based therapy. Nat Publ Gr. 2014; 15(8): 541-555). 5
- Figura 4- Principais tipos de vírus utilizados como vectores de material genético (Retirado de Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol. 2003;21(3):117-122). 6
- Figura 5- Formação de lipoplexos (Retirado de Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. 2010:640-645). 14
- Figura 6- Ilustração esquemática da conjugação de lipossomas e ligandos (Retirado de Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. Theranostics. 2014;4(3):240-255). 15
- Figura 7- Polímero carregado positivamente e DNA carregado negativamente formam estruturas denominadas de poliplexos. (Retirado de Design and development of polymers for gene delivery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(7):581-593). 17
- Figura 8- Estruturas químicas dos polímeros catiónicos mais utilizados em terapia génica (Adaptado de Non-viral vectors for gene-based therapy. Nat Publ Gr. 2014;15(8):541-555). 19
- Figura 9- Estrutura do polímero poli (2-aminoetil metacrilato) (Adaptado de Poly (2-aminoethyl methacrylate) with well-defined chain length for DNA vaccine delivery to dendritic cells. Biomacromolecules. 2011;12(12):4373-4385). 22
- Figura 10- Estrutura química do polietilenoglicol (PEG). 22

Figura 11- Mecanismos segundo os quais se crê que o PEG aja quando conjugado com nanopartículas (Retirado de PEGylation of nanocarrier drug delivery systems: State of the art. J Biomed Nanotechnol. 2008;4(2):133-148). 24

Figura 12- Equação representativa do processo de bioluminescência. 31

Figura 13- Estruturas químicas do homopolímero PAMA (à esquerda) e do copolímero em bloco PEG-b-PAMA (à direita). 37

Figura 14- Efeito da composição e da razão de carga N/P (polímero/ material genético) dos poliplexos na sua atividade de transfeção em células COS-7 na ausência de soro. Os diferentes polímeros PAMA (a) e copolímeros PEG- β -PAMA (b) foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/ P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 39

Figura 15- Efeito da presença de soro na atividade de transfeção de poliplexos preparados a partir do homopolímero PAMA (a) e do copolímero PEG- β -PAMA (b) na linha celular COS 7. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na subsecção Métodos na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 42

Figura 16- Efeito da razão de carga e da presença do PEG na atividade biológica dos poliplexos preparados a partir do par PAMA₁₇₆₀₀/ PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀/ PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na presença e ausência de soro em células COS 7. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em unidades RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 49

Figura 17- Efeito do peso molecular dos polímeros e da razão de carga (N/P) dos poliplexos na viabilidade células COS 7. Os poliplexos foram preparados a partir do

homopolímero PAMA (a) e do copolímero PEG- β -PAMA (b). Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/ P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos . Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 52

Figura 18-Efeito da presença de soro na viabilidade celular após o tratamento com diversos poliplexos preparados a partir do homopolímero PAMA (a) e do copolímero PEG- β -PAMA (b) na linha celular COS 7. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/ P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão obtidas de triplicados). 55

Figura 19- Efeito da concentração dos diferentes polímeros e copolímeros na viabilidade de células COS 7 na presença de soro. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 60

Figura 20- Efeito da razão de carga e da presença do polímero PEG na atividade biológica dos poliplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA (a) e dos copolímeros PEG- β -PAMA (b) na linha celular HepG 2 na presença de soro. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 63

Figura 21- Efeito da presença de soro na viabilidade celular após o tratamento com diversos poliplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA (a) e dos copolímeros PEG- β -PAMA (b) na linha celular HepG 2. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/P indicados. O

procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 67

Figura 22- Efeito da razão de carga e da composição dos poliplexos no seu diâmetro médio. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em nanómetros (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 70

Figura 23- Efeito da razão de carga e da composição dos poliplexos na sua carga superficial. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em miliVolt (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 71

Figura 24- Efeito do tempo no tamanho dos poliplexos preparados a partir do homopolímero PAMA e do copolímero PEG- β -PAMA incubados em soro. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em nanómetros (média \pm desvio padrão obtida de triplicados). 74

Figura 25-Acesso do brometo de etídio ao material genético das nanopartículas preparadas a partir dos homopolímeros PAMA e dos copolímeros PEG- β -PAMA em diferentes razões de carga polímero/material genético. Os diferentes polímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em percentagem relativamente a um controlo positivo (correspondente ao acesso da sonda a material genético não protegido) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados). 76

Figura 26-Resultados de ensaio de gel em agarose para as formulações selecionadas. O homopolímero PAMA₂₆₄₀₀ e o copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ foram ambos complexados com 1 µg de pCMV.Luc nas três razões de carga indicadas. Utilizou-se DNA livre e poliplexos preparados a partir do polímero PEI como controlo para este ensaio. O procedimento seguiu de acordo com o descrito na secção Materiais e Métodos.

78

Índice de Tabelas

Tabela 1-Tabela descritiva dos principais métodos físicos de entrega de genes (Informação recolhida de: Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. Ann Biomed Eng. 2013;41(3):446-468. Non-viral gene delivery methods. Curr Pharm Biotechnol. 2013;14(1):46-60. Non viral vectors in gene therapy - An overview. J Clin Diagnostic Res. 2015;9(1):GE01-GE06. Gene therapy and DNA delivery systems. Int J Pharm. 2014;459(1-2):70-83.).	11
Tabela 2- Propriedades dos diferentes polímeros utilizados.	38

Resumo

Com a modernização das diferentes técnicas de biotecnologia, assistiu-se a um avanço brutal no conhecimento da área da genética, desempenhando este um importante papel noutras áreas, destacando-se, dentro deste conjunto, a medicina. A comunhão de áreas como a medicina e a genética resulta, entre outras coisas, no aprimorar de técnicas como a terapia génica, afirmando-se esta como uma das técnicas de maior potencial para tratamento ou cura de diferentes patologias por via da correção da expressão de diferentes genes responsáveis pelas mesmas.

A eficácia da terapia génica está intimamente ligada aos sistemas de transporte e entrega de material genético utilizados, devendo estes promover uma entrega do material genético competente e, acima de tudo, segura. Neste âmbito, já se estudaram diferentes tipos de vetores, tanto virais como não virais, chegando-se à conclusão que, apesar da fraca eficácia de transfeção face aos virais, os vetores não virais são muito mais seguros, aliando a isso diversas características, como a versatilidade, grande capacidade de empacotamento, capacidade de funcionalização química e baixa imunogenicidade. No conjunto de vetores não virais, os nanossistemas de base polimérica assumem-se como uns dos mais promissores. Assim sendo, ao longo deste projeto avaliou-se a entrega de genes promovida por poliplexos formados a partir do polímero catiónico poli (2-aminoetil metacrilato), estudando-se a influência que o peso molecular do polímero, a copolimerização deste com o polietilenoglicol (PEG) e a razão de carga (N/P) dos poliplexos formados têm em parâmetros como a atividade biológica e a citotoxicidade tanto dos poliplexos como apenas dos polímeros (no caso da citotoxicidade). De forma a conduzir um estudo rigoroso e a retirar mais conclusões, fez-se uma caracterização físico química das nanopartículas estudadas, consistindo esta na avaliação da carga superficial (potencial zeta) e tamanho dos poliplexos, bem como na capacidade que os polímeros têm de proteger o material genético, após a formação de complexos.

A avaliação da atividade biológica dos poliplexos estudados na presença e ausência de soro, mostrou que a presença deste componente conduz a um aumento da transfeção, destacando-se, neste parâmetro, os poliplexos formados a partir do

copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀. Estes resultados permitem concluir também que copolimerização com o PEG permitiu obter melhores resultados, principalmente ao nível da atividade biológica, superiorizando-se estes aos valores obtidos com os poliplexos formados a partir do polímero PEI, considerado o *gold standard*. A presença do PEG induziu algumas melhorias na citotoxicidade dos poliplexos em destaque, não sendo, no entanto, suficientes para se destacar face ao controlo utilizado (PEI). A caracterização físico-química dos poliplexos baseados no copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ mostrou que estes têm uma boa capacidade de proteção do DNA, um potencial zeta positivo e um tamanho que poderá permitir que as nanopartículas se mantenham em circulação por bastante tempo e beneficiar do efeito de permeabilidade e retenção melhorada.

Palavras chave: Terapia Génica, polímero catiónico, poliplexos, sistema de transporte e entrega de material genético, cancro.

Abstract

Modernizing the different Biotechnology techniques led to several advances regarding areas such as genetics, taking these part in a broad spectrum of sciences, including medicine. The combination of areas such as medicine and genetics results, amongst other things, in the enhancement of techniques like gene therapy, assuming itself as one of the techniques with greater potential for treating or healing different pathologies by correcting the expression of different genes responsible for them.

The efficacy of gene therapy is intimately connected with the different systems of transport and delivery of genetic material used, having these the obligation to promote a competent and, above all, safe delivery of the genetic material. Having this in mind, different types of vectors have already been studied, both viral and non viral, coming to the conclusion that, despite the low transfection efficacy regarding viral vectors, non viral systems are safer, combining that with different characteristics, such as versatility, packaging capacity, ability to be chemically functionalized and low immunogenicity. Regarding the set of non viral vectors, polymeric nanosystems appear as one of the most promising strategies. Taking this in account, during this project, the delivery of genes promoted by polyplexes formed with the cationic polymer poly (methacrylate 2-aminoethyl) was evaluated, studying the influence that the polymer's molecular weight, the copolymerization with polyethylene glycol (PEG) and the polyplexes' charge ratio (N/P) have in parameters as the biological activity of the polyplexes and the cytotoxicity of both polyplexes and polymers. In order to proceed to a thorough study and to collect further conclusions, a physico chemical characterization of the nanoparticles has also been done, consisting this in the evaluation of the zeta potential and size of the polyplexes, as well as in the polymer's condensing capacity after the formation of complexes.

The evaluation of the polyplexes' biological activity studied in the presence and absence of serum, showed that the presence of this component enhances the transfection levels, highlighting, in this parameter, the polyplexes based in the copolymer PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀. These results show that the copolymerization with PEG led to better results, specially concerning biological activity, being these higher than the

ones obtained with the gold standard PEI polyplexes. The presence of PEG enhanced several improvements in the polyplexes' cytotoxicity, not being able to produce better results than the ones obtained with the control (PEI), though. PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ polyplexes' physico chemical characterization showed a good DNA protection, a positive zeta potential and a size that may allow nanoparticles to last longer in circulation and benefit from enhanced permeation and retention (EPR) effect.

Key words: gene therapy, cationic polymer, polyplexes, genetic material transport and delivery systems, cancer.

Lista de Siglas

ATP- Adenosina tri-fosfato

ATRP- Polimerização radicalar por transferência atômica

BSA- Albumina de soro bovino

COS 7- CV-1 in origin, and carrying the SV40 genetic material

DLS- *Dynamic Light Scattering*

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

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

DTT- *Dithiothreitol*

EDTA- *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EtBr- *Ethidium bromide*

FBS- *Fetal bovine serum*

HCC- Hepatocarcinoma celular

Luc- Luciferase

Mn- Peso molecular

N/P- Rácio azoto/fosfato

PAMA- Poli (2-aminoetil metacrilato)

PBS- *Phosphate-buffered saline*

PdI- *Polidispersion index*

PDMAEMA- *Poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)*

pDNA- *Plasmide deoxyribonucleic acid*

PdI- Índice de polidispersão

PEG- Polietilenoglicol

PEG-b-PAMA- Polietileno glicol beta poli (2-aminoetil metacrilato)

PEI- Polietilenimina

P β AE- Poli (β -amino éster)

RLU- *Relative light units*

RNA- *Ribonucleic acid*

SDS- *Sodium dodecyl sulfat*e

TBE- *Tris/Borate/EDTA*

1 Introdução

1.1 História da Terapia Génica

O avanço dos estudos na área da genética é transversal a outros campos, como o caso da medicina e, por conseguinte, o da Terapia Génica, consistindo esta técnica na inserção de material genético exógeno numa célula específica, tendo em vista a correção da expressão dos genes responsáveis pela condição patológica, conferindo essas modificações possibilidade de tratamento ou cura da patologia em causa¹. Para se atingir o objetivo proposto com a terapia génica, é necessário que o material genético chegue íntegro ao interior das células-alvo, sendo para o efeito necessários sistemas de transporte e entrega de material genético², tema central da presente dissertação.

Existem duas classificações possíveis para a terapia génica: terapia génica de células somáticas, incapaz de produzir uma hereditariedade da resposta, e terapia génica de células germinativas¹, capaz de gerar uma hereditariedade das modificações genómicas². A aplicação de técnicas de terapia génica levanta bastantes questões a nível ético, forçando a uma legislação bastante apertada que permite a sua realização apenas em células somáticas³. Genericamente, existem duas formas de se conduzir este tipo de terapia, sendo elas: *in vivo* ou *ex vivo*, consoante a entrega de genes é feita diretamente no paciente ou em células retiradas do paciente e reimplantadas novamente¹.

O conceito de Terapia Génica, como o conhecemos, surge nos primórdios da década de 70 do passado século⁴, havendo a necessidade de assinalar diversos marcos importantíssimos para a construção e desenvolvimento da técnica em si, encontrando-se estes esquematizados na Figura 1.

Os primeiros ensaios clínicos em humanos foram realizados em dois elementos do sexo feminino com um distúrbio no ciclo da ureia, utilizando-se o vírus Papilloma Shope como agente responsável pela introdução do gene codificador da arginase nas duas pacientes^{5,6}, já que alguns produtos deste ciclo são catalisados por esta enzima. Apesar do ensaio se ter revelado um insucesso, veio-se provar mais tarde que o genoma deste vírus não continha sequências que codificavam a arginase, desmentindo as primeiras conclusões.

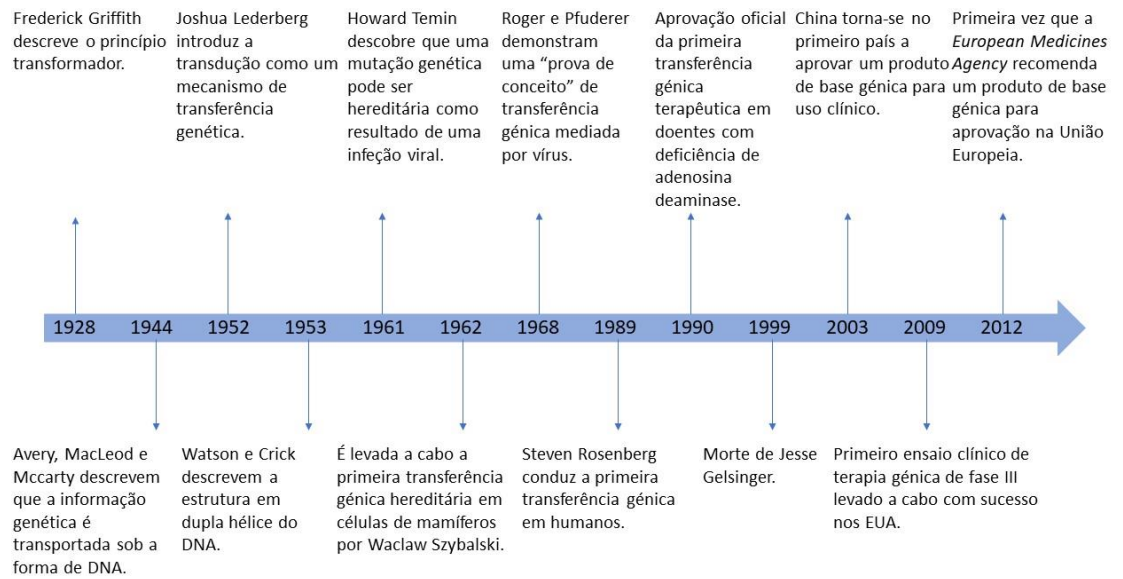


Figura 1- Principais marcos na história da terapia génica (Adaptado de *History of Gene Therapy*. *Gene*. 2013; 525 (2): 162-169).

Em 1990, Martin Cline executou pela primeira vez um ensaio de terapia génica utilizando DNA recombinante em dois pacientes com uma deficiência genética que resulta numa condição denominada de β -talassemia³, motivado por resultados positivos obtidos anteriormente na transferência de material genético exógeno em células estaminais de medula óssea de ratos⁷. Apesar da realização dos ensaios, o Conselho de Revisão Institucional demonstrou as suas preocupações face à sua eficácia^{8,9}.

Em 1990 é aprovado oficialmente, pela *US Food and Drug Administration* (FDA), o primeiro ensaio clínico usando um gene terapêutico, conduzido por Michael R. Blaese¹⁰. Os sujeitos-alvo deste estudo foram dois pacientes com uma imunodeficiência severa combinada causada por um défice de adenosina deaminase. O tratamento proposto envolvia a manipulação genética *ex vivo* dos glóbulos brancos dos pacientes, de forma a ser introduzido o gene responsável por codificar a enzima anteriormente referida. Graças aos resultados obtidos, a mesma terapia é pouco depois colocada em prática na União Europeia¹¹, iniciando-se, por esta altura, diversos ensaios de transferência genética tendo como objetivo a criação de terapias para outras doenças.

No entanto, e apesar do avanço verificado no campo da terapia génica, assiste-se, em 1999, à trágica morte de Jesse Gelsinger, estando esta relacionada com a administração de um vetor adenoviral¹².

Atualmente, o cancro é a doença mais visada pelas técnicas de terapia génica, sendo cerca de 65 % dos ensaios clínicos realizados direcionados para doenças do foro oncológico³, como se observa pela Figura 2. Existem também resultados promissores quanto à aplicação de técnicas de terapia génica em doenças hereditárias como a amaurose congénita de Leber¹³, β talassemia^{14,15}, imunodeficiência severa combinada grave associada ao cromossoma X (SCID-X1¹⁶, entre outras.

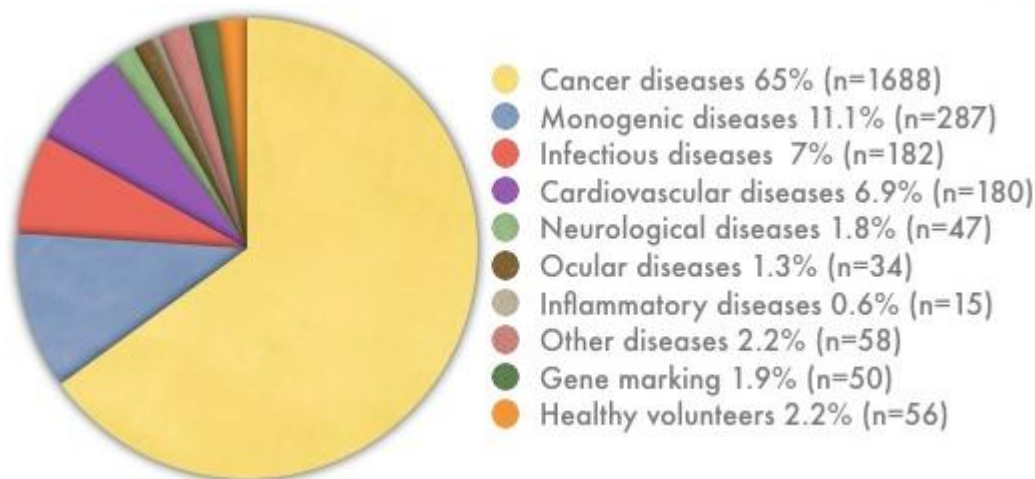


Figura 2- Representação gráfica das principais condições estudadas em ensaios de terapia génica (Visualizado em <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>).

Alguns produtos de base génica foram já aprovados, como o Gendicine™, desenvolvido pela *SiBiono Gene Tech Co.*, aprovado em 2003 na China, sendo este constituído por um adenovírus manipulado geneticamente sem capacidade replicativa^{17,18}, que visa combater o carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço; o Oncorine™, aprovado em 2005 no mesmo país e desenvolvido pela *Sunway Biotech Co. Ltd*, que se destina a pacientes com cancro naso faríngeo refratário em estágios avançados, sendo constituído por um tipo de adenovírus com capacidade de replicação condicionada; o Cerepro®, desenvolvido pela *Ark Therapeutics Group PLC* e certificado na União Europeia em 2004, é constituído por um adenovírus contendo o gene da timidina cinase, tendo como objetivo o tratamento do glioblastoma multiforme¹⁹, tratando-se do primeiro medicamento a completar um ensaio clínico de fase III³; o Glybera®, desenvolvido pela *Amsterdam Molecular Therapeutics*, faz uso de um vetor viral adenoassociado para tratar a deficiência severa da lipase, tendo sido aprovado em 2012³.

1.2 Sistemas de transporte e entrega de material genético

O desenvolvimento das técnicas de terapia génica está dependente da existência de métodos eficazes de transferência de material genético. Por definição, um vetor é uma estrutura que contém o gene terapêutico de interesse, tendo diversas funções, como a proteção do gene, a mediação da entrada do mesmo nas células-alvo e, no caso da utilização de pDNA, oferecer a garantia de uma transcrição estável do gene aquando da sua chegada ao núcleo celular²⁰. A utilização de nanossistemas para transporte e entrega de material genético visa melhorar o processo de transferência génica, tornando-o mais eficiente, específico e seguro²¹.

Um vetor, para se considerar ideal, deve obedecer a um conjunto de características, como por exemplo, não levar a uma resposta imunitária aguda; capacidade ilimitada de empacotamento do transgene; conduzir a uma expressão prolongada do gene terapêutico; deve ser específico; deve ser capaz de entregar o material genético a células quiescentes e em divisão; deve ser de fácil preparação; baixo custo e estar disponível comercialmente a concentrações elevadas; e deve também permitir que, após entrada no núcleo, o material genético permaneça numa posição episomal ou integre uma região específica do genoma²².

A introdução de material genético exógeno em células visa regular a expressão génica nas mesmas, podendo este ser de diferentes tipos, como por exemplo DNA, RNA, *small interfering RNA* (siRNA), micro RNA (miRNA) ou oligonucleótidos *antisense* (ASON)²³. O tipo de material genético a transportar é, também, um dos fatores de seleção do vetor a utilizar, já que existem diferentes desafios para a entrega de cada um dos tipos de material genético referidos, de acordo com as características físico-químicas das diferentes macromoléculas. Independentemente do tipo de material genético a transportar, os vetores têm de ultrapassar diversos obstáculos, como por exemplo a degradação enzimática, a excreção por parte do sistema renal, a deteção por parte do sistema imunitário e, após a entrada na célula, a degradação por parte do sistema endolisossomal²³, processos ilustrados na Figura 3.

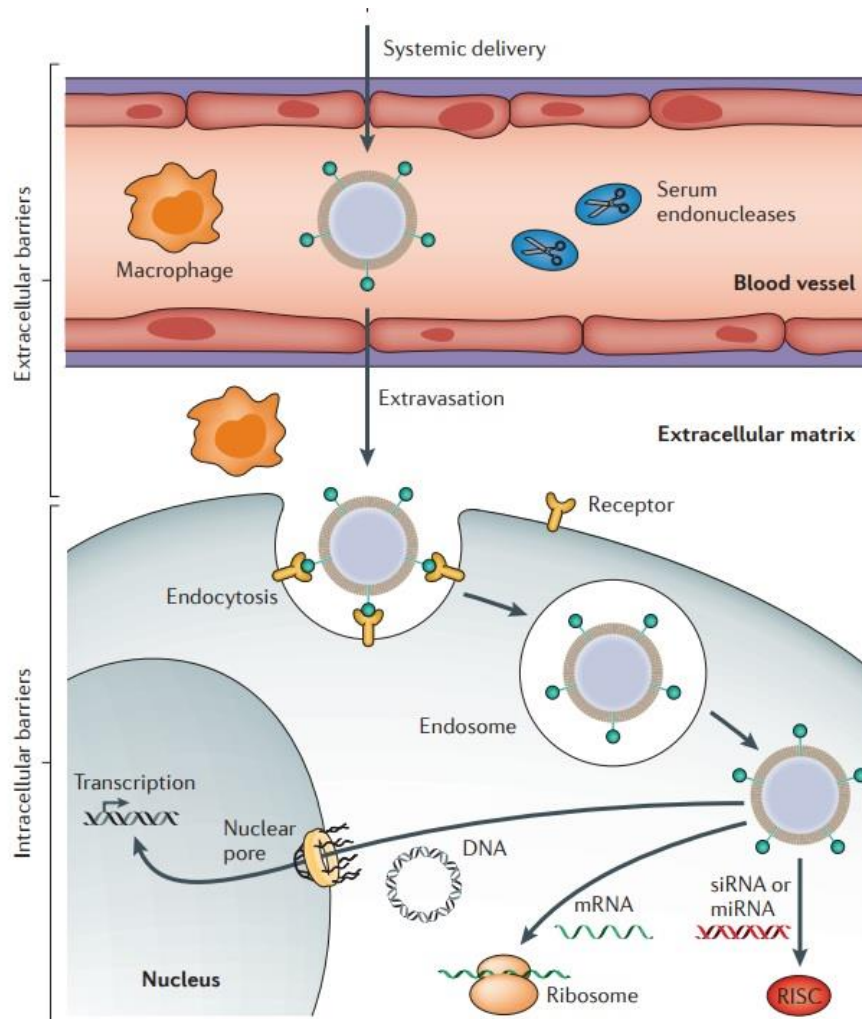


Figura 3- Barreiras para entrega de genes in vivo (Retirado de *Non-Viral vectors for gene-based therapy*. Nat Publ Gr. 2014; 15(8): 541-555).

Os vetores podem ser classificados de uma forma abrangente como vetores virais ou não-virais. Tal como o nome sugere, englobam-se dentro dos vetores virais todos os vetores que utilizam um vírus como transportador de material genético, ficando os restantes inseridos nos grupos de vetores não-virais. As principais diferenças entre si serão abordadas com mais detalhe nos próximos subcapítulos.

1.2.1 Vetores virais

Os vírus podem ser considerados verdadeiras máquinas biológicas que, eficientemente, ganham acesso às células de forma a tirarem proveito da sua maquinaria e facilitarem a sua replicação²⁴. Para serem usados em terapia génica, é

necessário proceder a uma manipulação prévia do genoma viral, de modo a que sejam removidas as partes do genoma responsáveis pelo caráter imunogénico do vírus²⁴. No entanto, devem ser mantidas as regiões responsáveis pelo empacotamento do genoma viral na cápside e pela integração do material genético do vetor na cromatina das células-alvo²⁴. Para além disso, é necessário que as regiões que foram eliminadas do genoma viral sejam substituídas por sequências responsáveis por produzir um efeito terapêutico.

Os vetores virais assumem-se como os mais utilizados em técnicas de terapia génica, devendo-se este facto à sua elevada eficiência de transdução *in vivo*²⁵, havendo, ainda assim, alguns riscos associados à sua utilização, como a resposta imunitária despoletada^{26,25}, risco de ativação de oncogenes e indução de mutações, dificuldade e custo na produção^{26,27} e capacidade limitada de empacotamento do transgene²⁷. A segurança dos pacientes é primordial, devendo os vetores ter uma replicação condicionada, reduzida citotoxicidade e imunogenicidade, e uma baixa probabilidade de recombinação homóloga²⁸.

Os vetores virais podem ser classificados como vetores de integração e vetores episomais²⁹. Vetores do primeiro tipo são capazes de inserir o transgene no genoma hospedeiro, conduzindo a uma expressão prolongada do transgene, como por exemplo os retrovírus e os lentivírus, ao passo que os vetores episomais, como os adenovírus e os *Herpes Simplex Virus*, entregam os genes sob a forma episomal, o que dificulta a obtenção de uma expressão génica prolongada³⁰.

Os vírus mais utilizados para a produção de vetores virais são os adenovírus, retrovírus, vírus adenoassociados (AAV), lentivírus, vírus *Herpes Simplex* (HSV) e alfavírus²⁸, cujas principais características se encontram ilustradas na Figura 4.

Vector	Packaging capacity	Host range	Clinical trials	Features
AAV	Low <4 kb	Broad, infects both non-dividing and dividing cells	+	Slow expression onset, genome integration (\pm), long-term expression, inefficient large-scale virus production
Adenovirus	Medium <7.5 kb	Broad low transduction of neurons	+	Transient expression, strong immunogenicity
Alphaviruses	Medium <7.5 kb	Broad, neuron and glial cell-specific strains	+	Transient, but extreme, expression levels; low immunogenicity
Herpes simplex virus	High >30 kb	Broad, neurons, stem cells, muscle cells	-	Latent infection, long-term expression, low toxicity (mutants)
Lentivirus	Medium 8 kb	Broad, dividing and non-dividing cells	-	Genome integration, long-term expression, safety concerns low titers, production inefficient
Retrovirus	Medium 8 kb	Restricted, dividing cells only	+	Genome integration, long-term expression

Figura 4- Principais tipos de vírus utilizados como vectores de material genético (Retirado de *Latest development in viral vectors for gene therapy. Trends Biotechnol. 2003;21(3):117-122*).

Seguidamente, abordar-se-ão as diferentes características de cada vírus utilizado como vetor, bem como as vantagens e desvantagens da sua aplicação. Segundo dados de 2017, consultados em <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>, os vírus abordados de aqui em diante são utilizados em aproximadamente 60 % dos ensaios clínicos de terapia génica.

1.2.1.1 Vetores derivados de Adenovírus

Os vetores derivados de adenovírus são bastante usados, tendo já sido realizados mais de 500 ensaios clínicos (segundo o *site* <http://www.abedia.com/wiley/indications.php>). Este grande interesse deve-se à capacidade de gerar *stocks* de vetor estáveis a altas concentrações²⁸ e de conter sequências de transgene com alguma dimensão (aproximadamente 8 kb³¹). Existem mais pontos positivos na aplicação deste tipo de vetores, como por exemplo a sua capacidade de infetar células divisíveis e não divisíveis, bem como a sua manutenção dentro da célula ocorrer sob a forma episomal³², levando a elevados níveis de expressão transiente³³, o que, no entanto, pode ser também um ponto negativo.

Contudo, apresentam desvantagens, sobretudo devido à sua imunogenicidade³². Estes vetores induzem uma resposta imunitária inata³⁴, ameaçando a eficácia da entrega de material genético²⁸. Essa imunidade deve-se ao facto de praticamente toda a gente já ter sido infetada com um ou mais serotipos deste vírus³². Outra desvantagem deste tipo de vetores é o facto de não se atingir uma expressão génica de longo período, se bem que, de forma a prolongar a expressão *in vivo*, já se formularam vectores híbridos Ad-AAV (constituídos por adenovírus e vírus adenoassociado), de modo a ocorrer integração cromossomal²⁸.

1.2.1.2 Vetores derivados de Vírus Adeno-Associados

Os vetores derivados de vírus adenoassociados (AAV) são um dos tipos mais populares de sistemas de entrega de material genético, o que se deve maioritariamente

a uma expressão eficaz e de longo prazo do transgene²⁸, já que a integração do material genético pode-se dar tanto por expressão episomal, como por integração cromossômica aleatória deste³¹. Para além destas características, apresentam uma reduzida toxicidade e não estão associados a uma resposta inflamatória, exceto a síntese de anticorpos que poderá limitar uma readministração³¹. Foi já evidenciado que estes vetores são capazes de aceder a diferentes tipos de células, sendo este fenómeno mais eficiente em células não divisíveis³⁵.

No entanto, apresentam algumas desvantagens, como a baixa capacidade de incorporação do transgene^{31,28} e uma ineficiente produção em massa²⁸. Para além das características já enunciadas, o ser humano possui uma imunidade inata para vírus adenoassociados e a integração genómica do transgene é aleatória²⁸.

1.2.1.3 Vetores derivados de Herpes Simplex Virus (HSV)

O *Herpes Simplex Virus* (HSV) é um dos vírus cujo genoma apresenta maior tamanho (aproximadamente 150 kb), o que lhe confere uma maior capacidade de transporte de material genético exógeno, com tamanhos compreendidos entre 30 e 50 kb^{20,31}. Outra das características deste tipo de vírus é uma capacidade de transdução bastante eficiente em diversas linhas celulares³¹ (incluindo neurónios), podendo estas ser tanto divisíveis como não divisíveis²⁰.

De salientar que, após infeção, o genoma viral permanece na célula hospedeira sob forma episomal durante toda a vida do organismo “recetor”²⁸, denominado de estado de latência. Neste estado, verifica-se uma ausência de doença em pacientes com o sistema imunitário saudável. Os perigos associados a *Herpes Simplex Virus* (HSV) recombinantes³¹, problemáticas relativas à duração da expressão do transgene³⁶ e, por último, o aparecimento de efeitos secundários associados à co produção do vetor com um vírus adjuvante³⁶, constituem obstáculos no que diz respeito à utilização destes vírus como sistemas de transporte de material genético.

1.2.1.4 Vetores derivados de Retrovírus

O primeiro ensaio clínico de terapia génica foi realizado com vetores retrovirais¹⁰, sendo que estes tiveram a sua origem em vírus cujo genoma é constituído por RNA, principal característica que os diferencia em relação a outros tipos de vetores abordados até aqui.

Grande parte dos ensaios clínicos conduzidos até hoje fizeram uso de sistemas deste tipo, o que se deve maioritariamente a um *design* simples e eficaz dos mesmos³¹. Após retro-transcrição do RNA constituinte do seu genoma, as cadeias de DNA formadas são integradas na cromatina das células do hospedeiro, o que permite uma expressão do transgene a longo prazo²⁸, apesar de não haver garantias de uma expressão estável³¹.

De forma a que o vetor consiga transportar o material genético até à cromatina das células-alvo, tem que ocorrer divisão celular, para que a membrana nuclear não impeça a integração genómica^{31,37}. Para além desta características, existem questões relativas à segurança de aplicação deste tipo de vetores, advindo essas de uma certa oncogenicidade e inserção aleatória no genoma hospedeiro³⁸. Este tipo de vetores tem a capacidade de transportar transgenes de tamanhos até 8 kb²⁰, o que é uma desvantagem face a outros tipos de vetores.

1.2.1.5 Vectores derivados de Lentivírus

Os lentivírus são considerados um subtipo de retrovírus, no entanto, possuem características enquanto sistema de transporte e entrega de material genético que tornam uma distinção entre ambos apropriada²⁸. Grande parte dos vetores lentivirais utilizados baseiam-se no vírus da imunodeficiência humana (HIV)³⁹, já que este possui características vantajosas enquanto sistema de transporte e entrega de material genético. Os vetores lentivirais apresentam a capacidade de infetar de forma eficiente células não divisíveis²⁸, apresentando um elevado tropismo para células do sistema nervoso. Para além disto, estes vetores conseguem transduzir células estaminais hematopoiéticas, sendo uma das características que partilham com os

vetores retrovirais. Outra propriedade exibida é a promoção de uma expressão estável e de longa duração do transgene³¹, com a vantagem de apresentarem baixo risco de mutação insercional e oncogenicidade, já que tendem a integrar longe dos promotores celulares³⁸.

Vetores deste tipo apresentam a capacidade de transportar sequências de material genético exógeno até 8 Kbp²⁸. Contudo, a expressão do transgene pode ser ameaçada por uma integração aleatória na cromatina das células hospedeiras³¹.

1.2.2 Vetores Não-Virais

Os vetores não-virais surgiram como uma alternativa que visa colmatar as falhas apresentadas pelo uso de alguns vírus como sistemas de transporte e entrega de material genético. As suas principais vantagens são a segurança, a adaptabilidade e a facilidade de produção em larga-escala, apresentando também características como: especificidade demonstrada através da inserção de ligandos, estabilidade coloidal devido à adição de moléculas inibidoras de processos imunitários (como o polietilenoglicol), e capacidade considerável de libertar material genético no citoplasma das células alvo⁴⁰. É também de salientar que vetores não-virais exibem a capacidade de poderem ser readministrados sucessivamente⁴¹, algo que nem sempre é conseguido com vírus, já que é desenvolvida imunidade em relação aos mesmos.

Contudo, os sistemas de transporte e entrega de material genético de base não viral apresentam ainda algumas lacunas, nomeadamente em relação aos níveis de transferência e expressão dos transgenes desejados⁴¹, estando esta dependente de diferentes fatores, consoante o vetor não-viral utilizado. Ainda assim, no caso da utilização de pDNA, a barreira física que constitui a membrana nuclear é altamente limitadora dos níveis de expressão do transgene atingidos, existindo resultados demonstrativos de que, de modo a se atingir o mesmo nível de expressão do transgene, é necessário introduzir-se, por microinjeção, entre 30 a 100 vezes mais material genético no citoplasma do que quando este é introduzido diretamente no núcleo celular, mesmo em células que estão em divisão⁴². A proteção do material genético no meio extracelular também é extremamente importante, de forma a que não haja uma degradação potenciada por alterações no pH, nucleases, protéases ou opsonização⁴². Os vetores

não-virais ter-se-ão ainda que associar à membrana plasmática e atravessá-la, de forma a entrar no meio intracelular, sendo, portanto, um longo processo até à expressão do transgene ser conseguida.

Os vetores não virais podem ser divididos em métodos físicos e químicos⁴², de acordo com a forma segundo a qual o material genético é introduzido na célula. O trabalho exposto nesta tese prende-se com o estudo da capacidade de transfeção de compostos de origem não-viral, mais precisamente com as soluções que alguns polímeros podem oferecer como transportadores de produtos terapêuticos de base génica.

1.2.2.1 Métodos Físicos

Os métodos físicos de entrega de genes baseiam-se numa entrega direta de material genético a células, tentando evitar problemáticas associadas à especificidade, via endocítica e imunogenicidade⁴³. Na Tabela 1 estão representados os principais métodos físicos, bem como as suas respetivas vantagens e desvantagens.

Tabela 1-Tabela descritiva dos principais métodos físicos de entrega de genes (Informação recolhida de: Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. Ann Biomed Eng. 2013;41(3):446-468. Non-viral gene delivery methods. Curr Pharm Biotechnol. 2013;14(1):46-60. Non viral vectors in gene therapy - An overview. J Clin Diagnostic Res. 2015;9(1):GE01-GE06. Gene therapy and DNA delivery systems. Int J Pharm. 2014;459(1-2):70-83.).

Técnica	Descrição	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Microinjeção	Injeção direta de material genético no núcleo celular.	Seguro; Possibilidade de combinação com outras técnicas.	Baixa eficiência; Depende do tamanho das células.	Migração de RNA; Imunocitoquímica; Animais Transgénicos.
Gene gun	Precipitação de material genético em partículas de ouro ou tungsténio; Entrega direta no citoplasma ou núcleo celular.	Ultrapassam a camada mais exterior da pele.	Profundidade de acesso das partículas; Lesões no tecido alvo; Falta de especificidade; Poucas células transfetadas.	Vacinas génicas; Diagnóstico com auxílio de corantes fluorescentes; Entrega de genes <i>in vivo</i> .

<i>Técnica</i>	<i>Descrição</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>	<i>Aplicações</i>
<i>Eletroporação</i>	Aplicação de um campo elétrico.	Eficácia; Mantém os tecidos intactos; Células divisíveis e não divisíveis; Transfeta um grande número de células.	Baixa viabilidade celular; Inflamação; Deposição de metais; Custo; Invasivo.	Entrega de genes <i>in vivo</i> ; Combinação com quimioterapia; Uso em células estaminais.
<i>Sonoporação</i>	Ultrassons de alta intensidade; Induz formação de poros devido ao movimento de um fluido.	Não invasiva;	Baixo controlo da entrada do DNA; Eficácia.	Absorção transdérmica de medicamentos; Entrega de genes <i>in vivo</i> ; Imagiologia.
<i>Irradiação com laser</i>	Perfuração de células através da variação da frequência de um laser.	Seleção e imobilização da célula pretendida.	Custo.	Necessita de mais investigação.
<i>Injeção hidrodinâmica</i>	Aproveitamento da força física gerada por uma injeção rápida de um grande volume para aumentar a permeabilidade celular.	Eficiência; Níveis altos de expressão transgene; Simplicidade.	Volume injetado é demasiado grande;	Funções génicas; Medicamentos de base génica; Entrega intra-hepática de genes.
<i>Magnetofection</i>	Criação de um campo magnético para direcionar a entrega de material genético.	Não invasivo; Precisão. Baixa citotoxicidade; Alta eficiência.	Magnetes externos têm de ser fortes;	Reprogramação celular; Transfeção de culturas primárias.

A microinjeção é ainda considerada o método físico mais eficiente e direto de entrega de genes⁴⁴, apesar das desvantagens inerentes ao mesmo. Tem-se vindo a assistir a um claro desenvolvimento dos métodos físicos de entrega de material genético, no entanto, o *modus operandi* destes assentará sempre na deformação da membrana celular, ameaçando a viabilidade das células⁴⁴, o que será sempre um obstáculo à aplicação deste tipo de técnicas. Existem diversos estudos que planeiam trazer novas tecnologias para o mercado. Algumas dessas técnicas, como por exemplo

a entrega de genes através de vibração molecular induzida por um campo elétrico, surgem como alternativa à eletroporação⁴⁴. Esta técnica não compreende a aplicação de uma corrente elétrica nas células, sendo a entrada do material genético exógeno facilitada pela vibração induzida pelos eletrodos^{44,45}. Existem algumas vantagens associadas a esta técnica, como por exemplo a alta eficiência de transfeção aliada a uma baixa citotoxicidade, para além da promoção de uma expressão do transgene bastante estável⁴⁴.

1.2.2.2 Métodos Químicos

Os vetores químicos são outra subclasse de sistemas de transporte e entrega de material genético pertencente aos vetores não virais. Estas estruturas têm sido intensivamente estudadas devido às vantagens que apresentam em relação aos vetores virais, como por exemplo, a segurança, a capacidade de transportarem material genético de maiores dimensões, a baixa toxicidade e a facilidade de produção⁴⁴. Dentro desta subclasse, destacam-se alguns sistemas, como os lipossomas, os polímeros catiónicos, o fosfato de cálcio e, por fim, as nanopartículas híbridas constituídas por lípidos e polímeros^{40,46}. Até à data, os sistemas de transporte mais estudados e utilizados são os de base polimérica e os de base lipídica⁴⁷.

1.2.2.2.1 Co precipitação de fosfato de cálcio

O método de co-precipitação de fosfato de cálcio é uma opção bastante atrativa devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de adsorver material genético e eficiência face ao custo^{46,48,49}. Esta técnica surge aquando da exploração da distribuição intracelular de DNA internalizado devido à precipitação de fosfato de cálcio, advindo daí evidências que sugeriam a existência de uma via na qual vesículas intermediárias transferiam DNA exógeno do complexo endolisossomal até ao núcleo⁴⁹. No entanto, as condições sob as quais surgem co-precipitados de material genético e fosfato de cálcio suficientemente eficazes para transfecções são bastante exigentes a nível físico-químico, estando a eficácia da transfeção e os níveis de expressão

do transgene sujeitos às condições a que a reação acontece⁴⁶, o que, aliado a uma pobre reprodutibilidade^{50,51}, constituem as maiores desvantagens desta técnica.

1.2.2.2.2 Lipossomas catiónicos

Os lipossomas catiónicos possuem a vantagem de interagir eletrostaticamente com o material genético carregado negativamente, formando lipoplexos²¹ (ilustrados na Figura 5). Estas estruturas conferem algumas vantagens à utilização deste tipo de vetores, já que facilitam o *uptake* celular, melhoram a entrega dos genes a nível intracelular e protegem o material genético de degradação enzimática²¹.

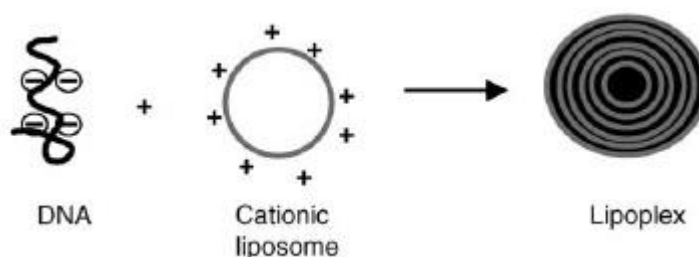


Figura 5- Formação de lipoplexos (Retirado de *Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking*. 2010:640-645).

De todos os vetores não-virais referidos até agora, os baseados em lípidos catiónicos são os mais estudados e utilizados^{46,21}, visto apresentarem um grande leque de vantagens aquando do transporte e entrega de material genético. A estrutura dos lípidos catiónicos compreende três componentes: a cabeça hidrofílica, âncora hidrofóbica e o espaçador⁵², que liga estas duas partes. Tendo em conta que a parte hidrofílica dos lípidos é constituída por grupos amina, a sua carga é positiva, o que é crucial para as interações eletrostáticas com o material genético (carregado negativamente) que estão na base da formação dos lipoplexos. Atendendo ao número de cargas da cabeça hidrofílica, os lípidos catiónicos podem ser classificados como monovalentes ou multivalentes, sendo estes últimos os usados com mais sucesso²¹.

As propriedades dos espaçadores são bastante importantes na escolha de lípidos catiónicos como sistemas de transporte de material genético, já que, para além de serem responsáveis pela “ponte” entre a cabeça hidrofílica e o domínio hidrofóbico,

determinam também a toxicidade, a biodegradabilidade e a eficiência na transfeção apresentadas por estas estruturas^{53,54}.

Consideram-se os lipossomas catiónicos bastante promissores para aplicação em técnicas de terapia génica devido a algumas particularidades que possuem, como o facto de apresentarem baixa toxicidade e imunogenicidade, em relação aos vetores virais, e possuírem bastante versatilidade⁵⁵ também em relação aos mesmos. Para além disto, são facilmente preparados e apresentam grande capacidade de transporte e entrega de grandes quantidades de material genético⁴⁶. A conjugação de ligandos aos lipossomas aumenta a especificidade destes sistemas de transporte de material genético⁵⁶, conforme ilustrado na Figura 6.

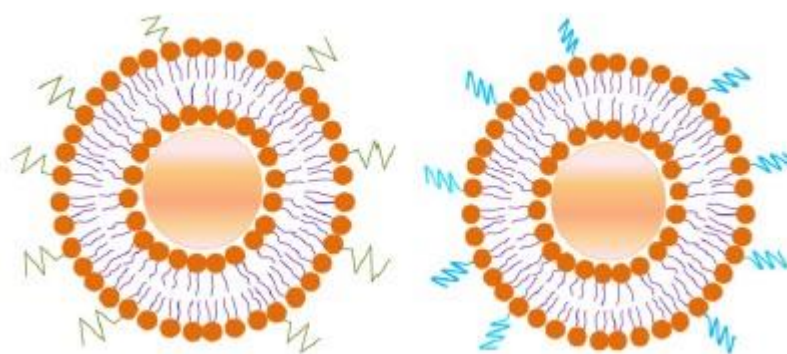


Figura 6- Ilustração esquemática da conjugação de lipossomas e ligandos (Retirado de *Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. Theranostics. 2014;4(3):240-255*).

Apesar de desempenharem um papel importante na citotoxicidade apresentada por este tipo de sistemas, a presença de cargas positivas é essencial para a ligação dos lipoplexos à superfície das células que se visa transfetar, por via de interações eletrostáticas²¹. Atualmente, acredita-se que a maior parte dos lipoplexos são internalizados por endocitose^{57,58}, verificando-se, no entanto, que uma das maiores barreiras à entrega de material genético associada aos lipoplexos é a ineficiente dissociação entre o material genético e o componente lipídico aquando da chegada ao invólucro nuclear²¹.

Apesar de apresentarem vantagens em relação aos vetores virais, urge melhorar propriedades como a eficiência de transfeção e a citotoxicidade destes nanossistemas⁴⁶. A toxicidade apresentada por estes sistemas de transporte advém tanto da presença de cargas positivas capazes de interagir inespecificamente com

componentes celulares, como da natureza do espaçador^{46,59}. No entanto, estas desvantagens conseguem ser colmatadas, havendo duas formas de o realizar: modificando a componente hidrofílica do lípido ou alterando o grupo do espaçador. No último caso pode-se, por exemplo, utilizar espaçadores compostos por ésteres ou amidas, o que confere maior biodegradabilidade aos lipossomas, diminuindo a sua toxicidade⁴⁶.

Em suma, a utilização de lipossomas catiónicos reúne bastante aceitação por parte da comunidade científica devido às vantagens citadas anteriormente, o que não invalida a necessidade de continuar a procura por outros tipos de sistemas de transporte e entrega de material genético. Neste sentido, surgem os polímeros como vetores não-virais, classe essa que possui um enorme potencial. Tendo em conta que o tema central desta dissertação é a utilização deste tipo de estruturas, será dedicado um subcapítulo da introdução para uma discussão mais pormenorizada das mesmas.

1.3 Nanopartículas Poliméricas

A utilização de polímeros catiónicos como nanossistemas para entrega de material genético é uma das estratégias que tem vindo a ganhar alguma preponderância, o que é explicado, entre outras características, pela versatilidade destas estruturas. Através de modificações da sua estrutura, é possível alterarem-se algumas das propriedades dos polímeros⁶⁰, influenciando assim a sua toxicidade e/ou atividade biológica²¹. Para além disto, os polímeros catiónicos assumem-se como vetores seguros, biodegradáveis e pouco tóxicos, quando comparados com a totalidade dos vetores virais utilizados até aos dias de hoje⁴⁶. Para além disto, acrescentam a capacidade de transportar uma maior quantidade de material genético⁶¹.

Por norma, os polímeros catiónicos possuem uma elevada densidade de cargas positivas (proveniente dos grupos amina), o que promove a ocorrência de interações eletrostáticas com as cargas negativas dos ácidos nucleicos, levando à formação de partículas com tamanhos à volta dos 100 nm^{21,47,60}, designadas de poliplexos (Figura 7). Estes têm a capacidade de proteger o material genético contra a ação das nucleases presentes no meio; de estabelecer interações eletrostáticas com a

membrana celular, facilitando o seu *uptake* que ocorre através de endocitose; e, por último, de promover o escape endolisossomal²¹.

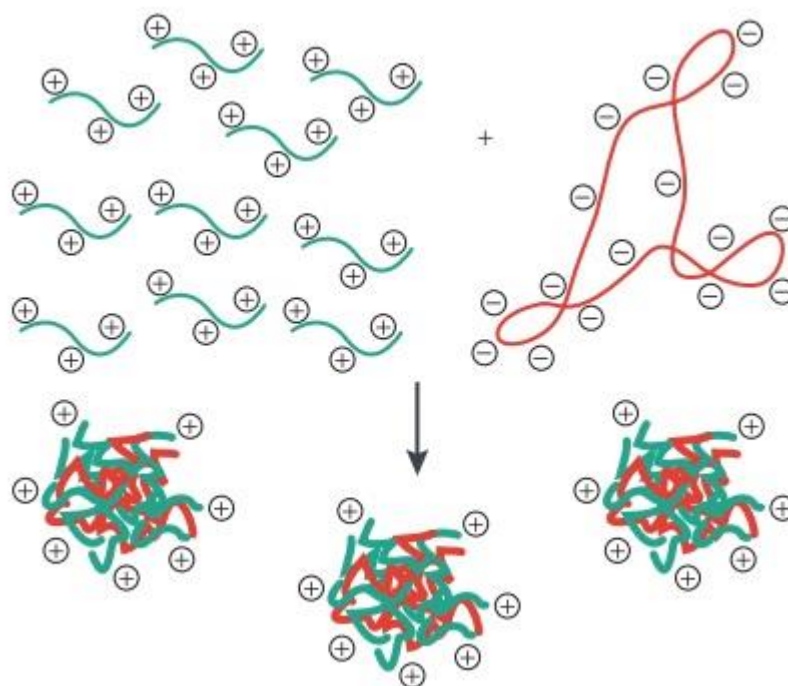


Figura 7- Polímero carregado positivamente e DNA carregado negativamente formam estruturas denominadas de políplexos. (Retirado de *Design and development of polymers for gene delivery*. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(7):581-593).

Ainda assim, existem algumas desvantagens quanto ao uso de polímeros catiónicos, já que estes induzem alguma citotoxicidade que se julga ser proveniente da densidade de cargas positivas e do peso molecular^{62,63,64}. Para além das características inerentes ao uso de polímeros catiónicos, existem ainda outros tipos de obstáculos que comprometem a eficiência da transfeção e o *targeting* das nanopartículas *in vivo*, já que o material genético atravessa uma série de barreiras até chegar, em primeiro lugar, às células-alvo e, depois, ao núcleo das mesmas (no caso de pDNA).

As nanopartículas poliméricas podem ser administradas localmente, como acontece com o caso de injeções intratumorais, por via sistémica ou por via oral. O sistema imunitário, em particular, o sistema reticuloendotelial, constituído por macrófagos e monócitos, é responsável pela identificação e destruição de compostos estranhos ao nosso corpo, participando na eliminação de nanopartículas poliméricas em

circulação⁶⁵. Essa eliminação ocorre através de fagocitose, sendo esta induzida pela associação entre as proteínas opsoninas e, neste caso, as nanopartículas poliméricas⁶⁵.

Existe ainda a possibilidade das nanopartículas poliméricas interagirem não-especificamente com as proteínas do soro, já que estas são carregadas negativamente, formando agregados que serão excretados pelo sistema reticuloendotelial⁶⁶. Para além do referido anteriormente, as nanopartículas deverão apresentar um diâmetro superior a 10 nm, de forma a não serem filtradas pelo sistema renal⁶⁷.

Para os casos de administração oral das nanopartículas, a chegada destas ao seu local de ação ainda é mais complexa, já que, antes de entrarem na circulação têm de superar as condições adversas encontradas no trato gastrointestinal. Após ingestão, as formulações deparam-se de imediato com um pH baixo no estômago, para além da ação de todas as enzimas digestivas que podem degradar os agentes terapêuticos não protegidos. Na chegada ao intestino, apesar da subida do pH, permanece a ação de diversas enzimas digestivas. O transporte através das células epiteliais do intestino é um processo complexo, que envolve diferentes barreiras físicas e químicas, como o caso das *tight junctions* e da presença de uma rede glicoproteica a encapsular as células do epitélio intestinal⁶⁵.

A atividade biológica de polímeros pode ser modulada, o que levou a que, nos anos mais recentes, tenham surgido vários estudos com este tipo de nanossistemas para transporte e entrega de material genético. Essa modulação pode ser conseguida através de duas estratégias principais: a associação de ligandos, aumentando a especificidade das formulações para determinadas células-alvo; e a conjugação com moléculas, como o polietilenoglicol (PEG), que modificam o comportamento das nanopartículas *in vitro* e *in vivo*.

Existem inúmeros polímeros utilizados para fins de terapia génica, no entanto, os mais estudados são a polietilenimina (PEI), a poli (L-lisina), os polimetacrilatos (como o PDMAEMA), o quitosano e os poli (β -amino ésteres), cujas estruturas estão ilustradas na Figura 8.

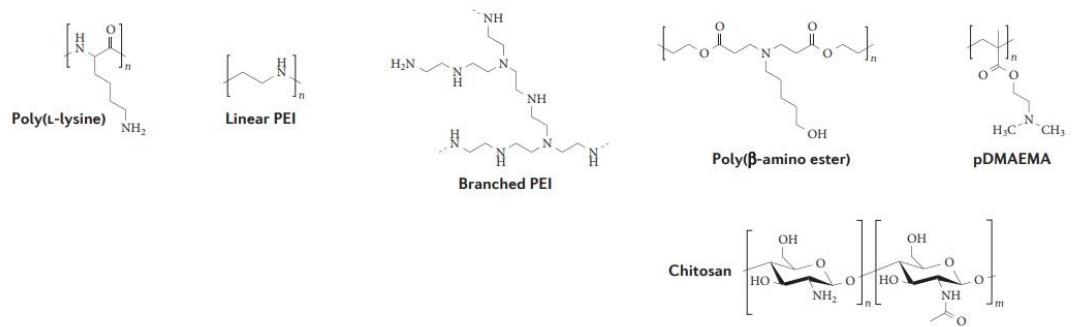


Figura 8- Estruturas químicas dos polímeros catiónicos mais utilizados em terapia génica (Adaptado de *Non-viral vectors for gene-based therapy. Nat Publ Gr. 2014;15(8):541-555*).

A polietilenimina (PEI) é o polímero catiónico mais utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* para transporte de material genético⁶⁸. A polietilenimina pode ter uma estrutura linear ou ramificada. A PEI altamente ramificada forma complexos polímero/DNA mais pequenos^{69,70,71}. Polímeros deste tipo protegem de forma muito competente o material genético, evitando a sua degradação enzimática. Para além desta propriedade, a eficácia na transfeção e a citotoxicidade apresentada pelos políplexos compostos por polietileniminas é influenciada por características como o peso molecular, o grau de ramificação, o potencial zeta e o tamanho das nanopartículas^{72, 73}. Com um aumento do peso molecular, a eficácia da transfeção da PEI aumenta, no entanto, é potenciada a citotoxicidade dos complexos⁷⁴, o que se deve a um aumento da interação entre as cargas positivas dos políplexos e a membrana plasmática, promovendo a destabilização desta última. Existem duas teorias explicativas para o facto dos políplexos de base PEI serem dos vetores não-virais mais eficientes, levando até à denominação de gold standard no que a vetores poliméricos diz respeito. Em primeiro lugar, o efeito “esponja de protões”⁷⁵, sendo crucial para a fuga da via endolisossomal, que será explicado detalhadamente na subsecção *1.3.3 Escape endolisossomal e transporte citoplasmático* desta introdução. Outra teoria reporta evidências de uma barreira física promovida pela estrutura ramificada e tamanho do polímero, impedindo a degradação enzimática do material genético⁷⁴.

As polilisinas (PLL) são polipeptídeos com o aminoácido lisina a constituir a unidade de repetição, conforme sugere o nome. A polilisina é um polímero biodegradável, o que se considera uma grande vantagem para aplicações *in vivo*⁷⁶. Para além disso, esta classe de polímeros permite modificações controláveis a nível do seu

tamanho molecular, forma e a possibilidade de ser modificada quimicamente⁷⁷. Contudo, os poliplexos preparados com este polímero apresentam uma fraca eficiência na transfeção, o que se deve a um baixo escape da via endolisossomal⁷⁸. Para além da baixa eficiência na transfeção, a polilisina apresenta níveis consideráveis de imunogenicidade e toxicidade, devido à constituição da cadeia principal com aminoácidos⁷⁹.

Dentro da classe de polímeros conhecida como polimetacrilatos, destaca-se o poli (metacrilato de etilo-2-dimetilamino) (PDMAEMA), que oferece resultados bastante promissores no âmbito do transporte e entrega de material genético. O PDMAEMA é um polímero duo-responsivo (temperatura e pH)⁸⁰ que tem sido estudado de forma bastante intensiva. De todos os fatores estudados, chegou-se à conclusão que o peso molecular desempenha um papel ativo na atividade biológica desta formulação, já que PDMAEMAs de maiores pesos moleculares levam à formação de nanopartículas mais pequenas que, apesar de serem mais citotóxicas que as geradas por PDMAEMAs de pesos moleculares mais baixos⁸¹, promovem níveis mais altos de expressão do gene repórter. Este polímero é constituído por aminas de estrutura terciária e atinge níveis de eficiência de transfeção muito próximos dos exibidos pelo *gold standard* PEI, ainda assim, apresenta algumas desvantagens, como a sua citotoxicidade⁸¹.

O quitosano é um polímero natural que deriva da desacetilação alcalina da quitina, sendo um dos vetores não-virais mais utilizados devido à sua baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade⁸². Existem alguns fatores determinantes na eficiência de transfeção conduzida pelo quitosano, destacando-se entre eles o grau de desacetilação e o peso molecular, bem como algumas condições a que o processo ocorre, como o pH⁸³. Ainda assim, existem resultados contraditórios no que toca ao peso molecular ideal para se atingir uma boa atividade biológica com este polímero. A sua eficiência de transfeção está bastante abaixo do ideal, o que levou à procura de outras formulações derivadas do quitosano, como o quitosano carboximetilado⁸⁴ e os copolímeros de arginina-quitosano⁸⁵ ou o PEG-trimetil quitosano⁸⁶, sendo estes apenas alguns exemplos.

Os poli (β - amino ésteres) (P β AEs) são polímeros sintéticos que se destacam pela sua biodegradabilidade e biocompatibilidade⁸⁷. A síntese desta classe de polímeros é bastante simples, residindo numa reação de adição de Michael entre uma amina

primária ou bis (amina secundária) e um diacrilato⁸⁸. Existe uma grande diversidade de aminas e diacrilatos, o que torna possível a criação de bibliotecas de polímeros, de modo a que se possam ajustar as suas características físico-químicas, como a densidade de carga, solubilidade na água, cristalinidade e perfil de degradação, conforme a aplicação desejada⁸⁹. Uma das características mais apelativas dos PβAEs é o facto de serem degradados em condições fisiológicas por hidrólise das ligações éster presentes na cadeia principal do polímero, dando origem a partículas biologicamente inertes (β-aminoácidos)^{87,90,91}, o que confere uma baixa toxicidade às formulações, sendo que, no entanto, essa toxicidade aumenta com o número de carbonos presentes nas cadeias principais e laterais do polímero⁹². Existem diversos fatores que influenciam a ação dos PβAEs, destacando-se o papel que as terminações desempenham tanto na citotoxicidade exibida como na eficácia de transfeção destes polímeros, podendo as mesmas ser constituídas por grupos amina ou acrilato, entre outros⁸⁸.

O trabalho desenvolvido neste projeto assenta na utilização do polímero poli (2-aminoetil metacrilato), cuja estrutura se encontra ilustrada na Figura 9, bem como da sua conjugação com o polímero hidrofílico PEG. O poli (2-aminoetil metacrilato) resulta de uma polimerização do monómero metacrílico 2-aminoetil metacrilato, possuindo este aminas primárias na sua constituição⁹³. Apesar de não fazerem parte do lote de polímeros mais utilizados em técnicas de terapia génica, os polímeros baseados em aminas primárias foram já empregues no transporte de material genético^{75,94}, já que estes permitem a condensação eficiente de compostos carregados negativamente, como o pDNA⁹⁵, ajustam a capacidade de tampão do polímero e melhoram a estabilidade dos complexos⁹⁶. O tamanho das cadeias poliméricas influencia o comportamento destes polímeros quando aplicados como vetores de material genético, reportando-se um aumento da eficiência de transfeção *in vivo* e *in vitro* com o aumento das cadeias poliméricas, já que as nanopartículas formadas são mais pequenas e estáveis face a destabilizações eletrostáticas, juntando o facto de haver um aumento do *uptake* celular e nuclear de pDNA⁹⁵. Por outro lado, cadeias poliméricas mais pequenas mostraram favorecer a libertação de material genético a nível intracelular e intranuclear⁹⁵.

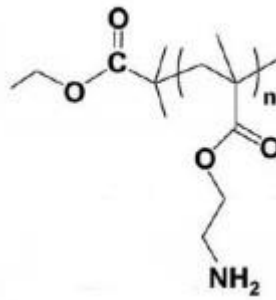


Figura 9- Estrutura do polímero poli (2-aminoetil metacrilato) (Adaptado de Poly (2-aminoethyl methacrylate) with well-defined chain length for DNA vaccine delivery to dendritic cells. *Biomacromolecules*. 2011;12(12):4373-4385).

1.3.1 Conjugação do PEG com polímeros catiónicos

Como se sabe, os polímeros exibem uma grande versatilidade, já que é possível manipular a sua estrutura química tendo em conta a aplicação pretendida. De forma geral, essas manipulações dão-se de duas maneiras distintas: acoplando ligandos ao polímero ou conjugando diferentes polímeros, formando copolímeros. A primeira estratégia visa aumentar a especificidade das formulações em questão, já que os ligandos exibem afinidade para determinadas linhas celulares. Por outro lado, a formação de copolímeros tem como objetivo modificar o comportamento das formulações, permitindo uma adaptabilidade das nanopartículas face à aplicação pretendida. Esta secção aprofunda um pouco a síntese de copolímeros com polietilenoglicol (PEG), cuja estrutura química se encontra representada na Figura 10, a forma mais comum de revestir nanopartículas poliméricas. Esse revestimento pode ser feito de três formas: ligação covalente, adsorção ou aprisionamento de cadeias de polietilenoglicol⁹⁷.

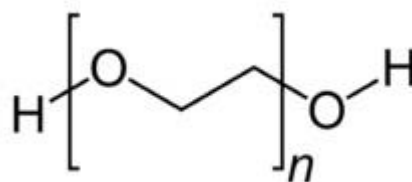


Figura 10- Estrutura química do polietilenoglicol (PEG).

O PEG é um polímero neutro, hidrofílico, flexível a nível molecular e não imunogénico, tendo já demonstrado sucesso na diminuição da adsorção de proteínas à superfície de nanopartículas⁹⁸. Para além disso, a presença de PEG evita a agregação das nanopartículas e aumenta a estabilidade das mesmas⁹⁹, o que é fulcral para o aumento do tempo de circulação das mesmas. Existem algumas possíveis explicações para os mecanismos de ação do PEG, nomeadamente no que toca à diminuição de interações não específicas com algumas proteínas do meio: a redução da carga superficial¹⁰⁰ e da hidrofobicidade^{101,102}; a mobilidade das cadeias mais longas de PEG¹⁰³; a criação de uma camada de hidratação em torno da nanopartícula graças às propriedades do PEG^{104,105}. Este polímero pode também ser responsável pela diminuição da energia livre de interface, o que diminui a necessidade de ligação entre as nanopartículas e proteínas (de forma a diminuir a energia de interface)⁹⁸. No entanto, esta teoria não se mantém em todas as situações¹⁰⁶. A explicação aceite em maior escala refere que, aquando das tentativas de ligação entre as proteínas e a nanopartícula, é realizada uma força de compressão nas cadeias do PEG, mudando para uma conformação de maior energia, o que cria uma força repulsiva que inibe a ligação entre as duas partes^{97,107}. Alternativamente, existe uma explicação que justifica a ação do PEG com o facto de, em vez de inibir por completo a ligação entre as proteínas do meio e a superfície das nanopartículas, permitir a ligação de apenas certos tipos de proteínas, existindo estudos que corroboram a existência de opsoninas com uma ação inibitória do *uptake* fagocítico^{108,109} e de componentes do soro que inibem o *uptake* por parte de células do fígado^{110,111}. Os diferentes mecanismos de ação do PEG encontram-se esquematizados na Figura 11.

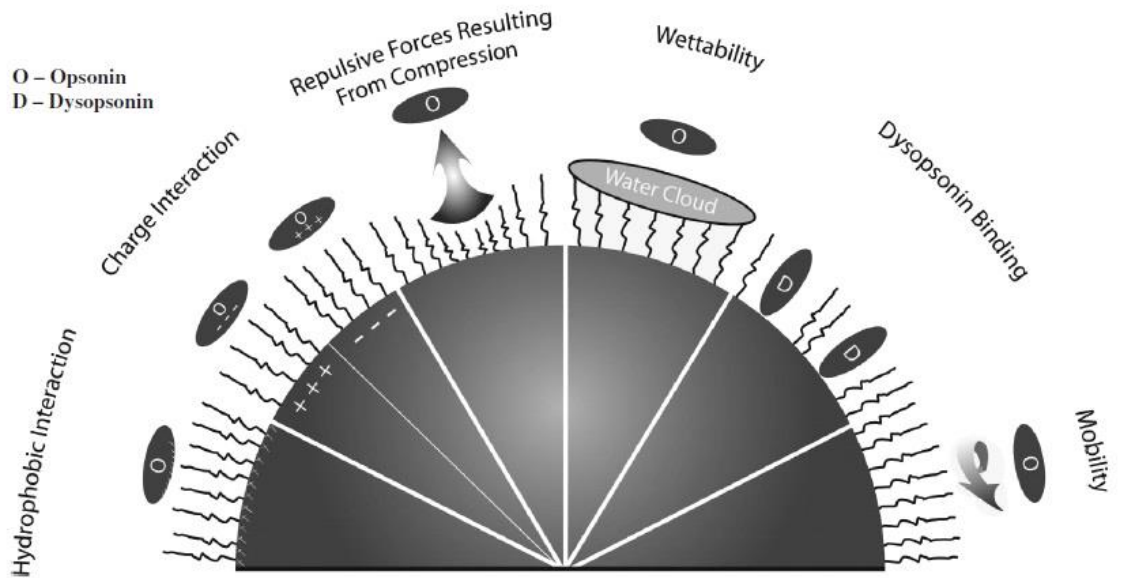


Figura 11- Mecanismos segundo os quais se crê que o PEG aja aquando conjugado com nanopartículas (Retirado de PEGylation of nanocarrier drug delivery systems: State of the art. J Biomed Nanotechnol. 2008;4(2):133-148).

Apesar de haver uma promoção da biocompatibilidade através da síntese de copolímeros com PEG, alguns autores defendem que existem também as desvantagens da inibição tanto do *uptake* celular de certas nanopartículas, como do desempacotamento dos poliplexos a nível intracelular, o que pode causar uma diminuição na atividade biológica das formulações¹¹².

1.3.2 Targeting e uptake das nanopartículas

De uma forma geral, os polímeros por si só não exibem especificidade para um determinado tipo de células, no entanto, são quimicamente manipuláveis, o que permite a conjugação com ligandos, induzindo um aumento do *uptake* e da especificidade celulares¹¹³, o que se verifica nos casos de *targeting* activo seletivo e não-seletivo. Em ambos os casos podem ser utilizados anticorpos, aptâmeros, proteínas, peptídeos ou pequenas moléculas, sendo que nestes casos se tem como alvo geralmente apenas uma proteína membrana presente nas células⁵⁶. No entanto, no caso de *targeting* ativo não-seletivo procuram-se maioritariamente dois recetores: relativo ao folato e à transferrina. Apesar de estes recetores estarem expressos em praticamente todas as linhas celulares, estão sobre expressos em células tumorais.

Existe ainda o caso de *targeting* passivo, no qual nanopartículas em circulação sistêmica se acumulam na vasculatura tumoral devido a uma drenagem linfática deficiente e à porosidade dos capilares que se encontram à volta do tumor, sendo este processo denominado de efeito de permeabilidade e retenção melhorada (EPR)¹¹⁴. Para se beneficiar do efeito supracitado é necessário que o tamanho das nanopartículas esteja à volta dos 100 nm¹¹⁵.

De seguida, terá que ocorrer a internalização celular das nanopartículas, acontecendo esta, na maior parte dos casos, através de mecanismos de endocitose. Vários estudos sugerem que o tamanho das partículas e a carga superficial das mesmas afetam os mecanismos e a eficiência de internalização celular dos nanossistemas^{116,117}. A estrutura e composição do polímero¹¹⁸ ou até a linha celular em questão¹¹⁹ também são fatores relevantes para as diferentes vias de internalização dos poliplexos. A endocitose é uma forma de transporte no qual a célula importa moléculas através da encapsulação em vesículas formadas a partir da membrana citoplasmática. Os mecanismos endocíticos dependentes de energia ocorrem via fagocitose, pinocitose, endocitose dependente de caveolinas ou mediada por clatrininas^{120,121}, existem, também, mecanismos independentes de clatrininas¹²² e caveolinas¹²³.

Poliplexos de tamanhos até aproximadamente 200 nm podem ser internalizados por endocitose mediada por clatrininas, ao passo que agregados de, por exemplo, 500 nm são internalizados por endocitose independente destas^{124,125}, havendo estudos comprovativos da internalização de poliplexos por macropinocitose¹²⁶ e endocitose mediada por caveolinas⁴⁷. No caso de endocitose mediada por clatrininas, as nanopartículas encaminham-se para a via endolisossomal¹²⁷, tornando-se necessário o escape da mesma de forma a prevenir a degradação do material genético.

1.3.3 Escape endolisossomal e transporte citoplasmático

Os poliplexos, sendo internalizados por endocitose mediada por clatrininas, acabarão por ser conduzidos até aos lisossomas, vesículas ácidas contendo enzimas que hidrolisam o material genético contido nos poliplexos¹²⁷. Assim sendo, as nanopartículas têm que, a certo ponto, escapar à via endocítica, de modo a que se consiga transportar o transgene até ao núcleo celular.

O fraco escape endolisossomal é apontado como uma das principais limitações dos vetores não-virais⁴⁷. A explicação mais comum para justificar o escape endolisossomal assenta no denominado “efeito esponja”. Existem polímeros que possuem grupos amina não protonados a pH neutro⁴⁷ com valores de pKa situados entre o pH neutro e o lisossomal. A acidificação dos endossomas ocorre por via da ação de uma ATPase que faz um transporte ativo de prótons vindos do citosol¹¹³, que, por sua vez, irão protonar os grupos amina dos polímeros, não permitindo uma redução do pH no interior do endossoma. Desta forma, a ATPase promove uma contínua entrada de prótons na vesícula, havendo uma acumulação dos mesmos, o que desencadeia um fluxo de íões carregados negativamente para o interior do endossoma¹¹³, criando uma pressão osmótica que causa a rotura da vesícula, libertando os polímeros para o citosol¹²⁸.

Estudos já demonstraram que o citoesqueleto desempenha um papel vital no transporte dos polímeros ao longo do citoplasma até ao núcleo, nomeadamente os microtúbulos aniónicos, já que os polímeros podem interagir de forma não específica com estes ou com proteínas motor, podendo, ainda assim, haver um transporte natural dos endolisossomas ao longo dos microtúbulos¹²⁹.

A determinada altura, durante o transporte dos polímeros até ao núcleo terá que ocorrer a dissociação destas estruturas, de modo a libertar o material genético nelas contido para que possa, posteriormente, ser transcrito a nível nuclear. Desta forma, a principal estratégia para tal é a diminuição da força de ligação entre o polímero e o material genético, o que pode ser conseguido, por exemplo, pela redução de cargas positivas¹³⁰; pela conjugação do polímero com PEG¹³¹; ou pela diminuição da massa molecular polimérica¹³². Ainda existe muito a melhorar na conceção de formulações poliméricas como vetores, sendo um dos aspetos cruciais a correta libertação de material genético, podendo criar-se nanopartículas responsivas a determinados parâmetros fisiológicos.

1.3.4 Importação do material genético para o núcleo celular

A entrada de material genético no núcleo celular é um processo extremamente ineficiente, estimando-se que apenas 0,1 % do DNA injetado no citosol

seja transcrito⁴⁷. O núcleo celular encontra-se protegido por uma dupla membrana porosa que apenas permite a entrada de determinadas moléculas. A forma mais fácil de internalização do material genético no núcleo celular é durante a divisão celular, já que aí ocorre a rotura da membrana nuclear e o DNA exógeno consegue penetrar no núcleo antes da sua reconstituição.

No entanto, existe também a possibilidade de transfetar células que não sofram divisão, o que ocorre através de transporte ativo mediado por proteínas como as importinas¹¹³ e as transportinas⁴⁷. Contudo, o transporte mediado por estas proteínas ocorre apenas na presença de sinais de localização nuclear (NLS) – cadeias catiónicas de peptídeos reconhecidas pelas importinas¹¹³. Salientam-se dois principais mecanismos de entrada de pDNA no invólucro nuclear, diferindo no caso da presença ou ausência de uma sequência NLS específica que se liga aos fatores de transcrição. No primeiro caso, a entrada do material genético é feita através da interação entre a importina β 1 e a sequência NLS¹³³ específica, ao passo que, na ausência da dita sequência, a transportina desempenha um papel importante, ligando-se a uma sequência NLS rica em glicina que medeia a importação de pDNA com a ajuda de histonas¹³⁴.

No entanto, a entrada de polímeros complexados com material genético no núcleo celular levanta ainda muitas questões, nomeadamente na diferença de tamanhos entre os poros do núcleo e os poliplexos.

Tendo em conta o quão limitante é a eficiência da entrada de material genético no núcleo para o processo de transfeção, é importante desenvolver estratégias que aumentem o rendimento do processo, como por exemplo, a conjugação de sequências NLS a vetores químicos ou à cadeia de DNA¹³⁵, a utilização de snRNA m3G-CAP (m3G pirofosfato ligado a 2'-O-metiloligorribonucleótidos 5'-fosforilados), ou a possível utilização de seis novas classes de peptídeos NLS descobertas recentemente¹³⁶. Por fim, existem estudos comprovativos do aumento da internalização nuclear de material genético através da inserção de determinadas sequências no material genético¹³⁷.

1.4 Objetivos

O potencial do uso de técnicas de terapia génica para prevenir, tratar ou curar diversas doenças é inegável. No entanto, existem diversos riscos associados, já que aquando da realização deste tipo de procedimentos se manipula a genética do próprio ser humano.

Por outro lado, a sua aplicação envolve sistemas de transporte e entrega de material genético. Neste contexto, surgiu a possibilidade de utilizar polímeros como nanossistemas transportadores de material genético. Estes nanossistemas apresentam algumas vantagens quando comparados com nanossistemas virais, como a sua versatilidade, a sua baixa imunogenicidade e a capacidade de transportarem sequências de tamanhos maiores. Ainda assim, existem aspetos a corrigir, de forma a otimizar a função dos nanossistemas poliméricos, sendo o parâmetro principal a eficácia da transfeção, que está distante da apresentada pelos vetores virais.

Assim sendo, este trabalho visa testar as alterações que a peguilação do polímero poli (metacrilato de 2-aminoetil), bem como o seu peso molecular e razão de carga dos poliplexos em si baseados, induzem a nível da sua atividade de transfeção e citotoxicidade. Pretende-se também compreender as alterações a nível físico-químico que a copolimerização com PEG promove, podendo estas ajudar a explicar o comportamento dos nanossistemas estudados. De forma a realizar um estudo mais detalhado das formulações, as mesmas foram testadas em duas linhas celulares, de forma a compreender se a peguilação dos polímeros é eficaz em mais do que um tipo de células-alvo e se as alterações nos perfis de atividade biológica e citotoxicidade induzidas pelos diferentes tamanhos e razões de carga dos poliplexos se mantêm em mais do que uma linha celular.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os diferentes polímeros utilizados neste trabalho foram sintetizados através da técnica de polimerização radicalar por transferência atômica (ATRP) pelo grupo de síntese e caracterização de polímeros no departamento de Engenharia Química. Chegou-se ao peso molecular médio (M_n) dos polímeros (com exceção do copolímero PAMA₂₆₉₀₀) através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Esta é uma técnica bidimensional de ressonância magnética nuclear que fornece informação acerca das orientações relativas e distâncias internucleares de moléculas vizinhas em sólidos poli-cristalinos e não-cristalinos¹³⁸, fazendo parte do lote de técnicas mais utilizadas em investigação relacionada com polímeros, já que permite simplificar o comportamento que este tipo de moléculas assume.

2.2 Métodos

2.2.1 Cultura de células

Os ensaios realizados ao longo deste projeto foram conduzidos em nas linhas celulares COS-7 e HepG2. A linha COS-7 deriva de tecido renal do Macaco Verde Africano, *Cercopithecus aethiops*. Estas células apresentam um crescimento bastante semelhante ao dos fibroblastos e são frequentemente indicadas para avaliação de novos vetores não virais. A linha celular HepG2 deriva de tecido hepático de um adolescente de 15 anos com hepatocarcinoma.

Ambas as linhas celulares foram mantidas em cultura a 37 °C num ambiente com uma saturação de CO₂ de 5% em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's médium-high glucose* (DMEM-HG) (Sigma-Aldrich, MO, USA), suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Sigma-Aldrich, MO, USA), penicilina (100 U.mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg.mL⁻¹). As células foram passadas duas vezes por semana quando atingiam uma confluência de cerca de 80 %, de modo a manterem-se

na fase exponencial de crescimento. Este procedimento inicia-se com a remoção do meio de cultura, procedendo-se imediatamente a uma lavagem com PBS. Após remoção do PBS, as células foram incubadas com 3 mL de tripsina a 0,05 % (Sigma, St. Louis, MO) até se observar o seu destacamento, sendo imediatamente adicionados 7 mL de meio de cultura para inativar a ação da tripsina. As células foram passadas para frascos novos com diluições de 1:10 e de 1:4 para as células COS 7 e HepG 2, respetivamente.

2.2.2 Preparação dos poliplexos

As soluções poliméricas foram preparadas em água Milli-Q a pH 3 e a uma concentração de 3 mg/ ml. Os poliplexos foram obtidos através da mistura destas soluções poliméricas com uma solução de plasmídeo de ADN (pDNA), de modo a se obter 1 µg de pCMV.Luc em 50 µL de poliplexos. Foram testados vários rácios de carga polímero/ADN (N/P, +/-). Os poliplexos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente e usados imediatamente a seguir.

2.2.3 Capacidade de Transfecção – Ensaio de Luminescência

De forma a avaliar a capacidade de transfecção dos (co)polímeros, estes foram complexados com um pADN que contém o gene que codifica a luciferase (pCMV.Luc). Na presença de ATP, a luciferase converte a luciferina em oxiluciferina, havendo uma consequente libertação de luz, conforme ilustrado na Figura 12. Através da avaliação da luz libertada, é possível estabelecer-se uma relação entre este parâmetro e a quantidade de luciferase presente na amostra, inferindo-se, desta forma, a capacidade de transfecção dos diferentes polímeros.

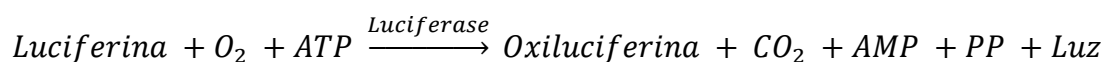


Figura 12- Equação representativa do processo de bioluminescência.

Para estes ensaios de transfecção, as células foram plaqueadas quando atingiam uma confluência entre os 70 e 80 % (fase ótima de crescimento). 24 horas antes

dos ensaios foram plaqueadas $3,5 \times 10^4$ e $8,0 \times 10^4$ células por poço de células COS 7 e HepG 2, respetivamente.

Após as 24 horas, as células apresentavam uma confluência entre 50 e 70%. Prepararam-se os poliplexos conforme descrito na subsecção 2.2.2. *Preparação dos poliplexos* e removeu-se o meio de cultura, substituindo-o por 300 μL de meio de cultura completo por poço da placa. Posteriormente, adicionaram-se 50 μL de poliplexos a cada poço (de acordo com as diferentes razões de carga N/P), de forma a garantir que cada condição continha 1 μg de pCMV-Luc. Finalizado este procedimento, incubaram-se as células durante 4 horas a 37 °C numa atmosfera com uma saturação de CO_2 de 5 %. Após a incubação removeu-se o meio de cultura e transferiu-se 1 mL de meio DMEM-HG completo para cada poço da placa, incubando-se as células durante 48 horas de acordo com as condições descritas anteriormente.

Após as 48 horas de incubação procedeu-se à avaliação da citotoxicidade (procedimento experimental descrito na subsecção 2.2.4. *Ensaio de Viabilidade Celular*) e à leitura da bioluminescência das formulações. Para se proceder à leitura da bioluminescência, as células foram lavadas duas vezes com PBS e introduziram-se 150 μL de tampão de lise [1 mM ditioneitol; 1 mM EDTA; 25 mM tris-fosfato (a pH 7,8); 8 mM MgCl_2 ; 15 % (v/v) glicerol; 1 % (v/v) Triton X-100] em cada poço, de forma a lisar as células colocando-se seguidamente as placas a -80 °C durante, pelo menos, 15 minutos. De seguida, transferiu-se cada condição para *ependorfs* devidamente etiquetados e procedeu-se a uma centrifugação a 10.000 rpm e a 4 °C durante 5 minutos. Mantiveram-se os *ependorfs* em gelo enquanto se transferiam 50 μL de cada condição para uma placa de 96 poços branca. A medição da produção de luz mediada pela luciferase foi realizada no luminómetro Lmax II 384 (Molecular Devices, USA). A leitura foi realizada a 37 °C logo após a injeção de 100 μL de solução de luciferina a 167 μM (Sigma-Aldrich, USA) seguida de 100 μL de uma solução de tampão de leitura (1 mM DTT; 1 mM EDTA; 25 mM tris-fosfato (a pH 7,8); 8 mM MgCl_2 ; 15 % (v/v) glicerol] contendo 2 mM de ATP a 2 mM.

A quantificação da quantidade de proteína presente em cada condição foi realizada através do kit *DC Protein Assay* (Biorad, CA, USA), utilizando a albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) como padrão e segundo o protocolo

recomendado pelo fabricante. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz emitida por miligrama de proteína total ((RLU)/mg de proteína total).

2.2.4 Ensaio de Viabilidade Celular

A citotoxicidade das formulações foi avaliada através do ensaio de Alamar Blue modificado. Este é um ensaio colorimétrico que avalia o metabolismo celular, no qual se utiliza resazurina (corante de tonalidade azul escura) que, quando reduzido a resorufina, adquire uma tonalidade cor de rosa. Assim, as células metabolicamente ativas (e conseqüentemente viáveis) têm potencial redutor, reduzindo a resazurina a resorufina, o que fará com que o meio adquira uma tonalidade cor de rosa altamente fluorescente. Estabelece-se, depois, uma correlação entre a absorvância do meio e a viabilidade celular.

O procedimento consiste na remoção do meio de cultura, substituindo-se por 300 µL por poço de uma solução de meio com 1% (v/v) de resazurina (Sigma-Aldrich, MO, USA) Os controlos positivos (C⁺) e negativos (C⁻) consistem em poços com células não tratadas e poços sem células, respetivamente. Incubam-se as células a 37 °C numa atmosfera com uma saturação de 5 % de CO₂ durante cerca de 1 hora, até se assistir a uma coloração rosa nos poços relativos ao controlo positivo (células não tratadas). Após esse período são transferiram-se 180 µL de cada condição para uma placa transparente de 96 poços e mediu-se a absorvância do meio a 570 e 600 nm num espectrofotómetro SPECTRA-max PLUS 384 (Molecular Devices, USA). A viabilidade celular foi calculada com recurso ao seguinte modelo matemático:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{(A_{570} - A_{600}) - (C_{570}^- - C_{600}^-)}{(C_{570}^+ - C_{600}^+) - (C_{570}^- - C_{600}^-)} \times 100$$

2.2.5 Caracterização Físico-Química das formulações

As formulações foram caracterizadas físico quimicamente avaliando-se três parâmetros: a carga superficial, o tamanho das partículas e a capacidade de proteção/condensação do DNA pelos polímeros. Estes ensaios foram realizados para

complementar a informação recolhida nos ensaios de viabilidade celular e da atividade biológica.

2.2.5.1 Análise da difusão dinâmica da luz e Potencial Zeta

De forma a determinar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, recorreu-se à técnica de difusão dinâmica da luz (DLS), que, tal como o nome indica, se baseia na dispersão da luz pelas nanopartículas em suspensão. A análise do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas é feita através de uma distribuição de tamanhos que é baseada no número de partículas constituintes de cada população presente na solução, no volume das mesmas ou na intensidade da luz dispersa por estas. No presente trabalho a distribuição de tamanhos foi feita com base na intensidade da luz dispersa pelas nanopartículas em suspensão. O cálculo do tamanho das formulações e do Pdl (índice de polidispersão) é feito com o estabelecimento de uma função de autocorrelação que mede as diferenças na intensidade de luz dispersa temporalmente. A correlação é calculada até a semelhança ser igual a 0, estabelecendo-se uma função do tipo exponencial. Essa função contém o coeficiente de correlação que é necessário para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico através da equação de Stokes-Einstein.

Para o efeito, prepararam-se os poliplexos conforme descrito na subsecção *2.2.2. Preparação dos poliplexos*, adicionou-se 1 mL de água destilada e procedeu-se à leitura no equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK) a 25 °C e com um ângulo de dispersão oposto de 173°. Realizaram-se dois ensaios independentes e as leituras foram feitas em triplicado.

A análise do potencial zeta permite saber a carga superficial das nanopartículas em solução, utilizando-se, para o efeito, uma célula com dois elétrodos. Aplica-se um campo elétrico às partículas e mede-se a mudança de fase na luz dispersa pelas nanopartículas em movimento devido ao campo elétrico aplicado, fenómeno conhecido como eletroforese. A mudança de fase é proporcional à mobilidade eletroforética das partículas, parâmetro a partir do qual se calcula o potencial zeta. As medições do potencial zeta foram realizadas sequencialmente às do tamanho, utilizando-se para o efeito o mesmo equipamento Zetasizer Nano-ZS (Malvern

Instruments, UK) acoplado a um *laser* de eletroforese *doppler* utilizando o modelo de *Smoluchovski*.

Os resultados obtidos para o tamanho e para o potencial zeta foram analisados com recurso ao *software* Zetasizer 7.02.

2.2.5.2 *Ensaio de intercalação do Brometo de Etídio*

O ensaio de intercalação com a sonda brometo de etídio (EtBr) visa avaliar a capacidade de proteção/condensação do DNA dos poliplexos. Para tal, avalia-se o acesso que a sonda tem ao material genético, estabelecendo-se um valor percentual para o mesmo.

O brometo de etídio é um agente intercalante do DNA, que produz um elevado aumento de fluorescência quando ligado a ácidos nucleicos, permitindo a quantificação de fluorescência inferir sobre a capacidade de condensação do material genético conferida pelo poliplexo em estudo.

Para o ensaio, prepararam-se os poliplexos de acordo com a subsecção 2.2.2. *Preparação dos poliplexos* e, após os 15 minutos de incubação, transferiram-se 50 μ L de cada condição para uma placa preta de 96 poços (Costar, CA, USA). Pipetaram-se 50 μ L de EtBr em cada condição, de modo a atingir uma concentração final de 400 nM. As condições controlo foram água Milli-Q (fluorescência residual) e 1 μ g de DNA (fluorescência máxima emitida). Incubaram-se as amostras durante 10 minutos, período após o qual se procedeu à leitura da fluorescência num fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, USA) com comprimentos de onda de excitação e emissão de 518 nm e 605 nm, respetivamente. Para se calcular o acesso da sonda ao material genético subtraiu-se a fluorescência residual a cada valor obtido para as amostras e exprimiu-se o resultado como percentagem do controlo positivo.

2.2.5.3 Ensaio de eletroforese em gel de agarose

O ensaio de eletroforese em gel de agarose visa complementar a informação recolhida no ensaio de intercalação do EtBr acerca da capacidade de condensação/proteção dos polímeros em estudo.

Para o efeito, prepararam-se os poliplexos conforme descrito na subsecção 2.2.2. *Preparação dos poliplexos*, sendo que após os 15 minutos de incubação se adicionaram 20 μL de cada amostra a 5 μL de *loading buffer* [15% (v/v) Ficoll 400; 0,05% (m/v) azul de bromofenol; 1% (m/v) SDS; 0,1 M EDTA (a pH 7,8)]. Posteriormente, transferiram-se 20 μL de cada uma das condições (já em solução com o *loading buffer*) para o gel de agarose a 1% previamente preparado em solução de TBE [89 mM de Tris-base (a pH 8,6); 89 mM de ácido bórico; 2,5 mM de EDTA] e com uma concentração de 1 μg de EtBr por mL de gel. Após a introdução das amostras nos poços o gel foi colocado a uma diferença de potencial de 80 mV durante 45 minutos. Mediu-se depois a intensidade da fluorescência das bandas relativas a cada condição experimental no sistema GelDoc (Bio-Rad, USA), utilizando o *software* QuantityOne.

3 Resultados e Discussão

Com este trabalho, pretendeu-se desenvolver um nanossistema de base polimérica, para transporte e entrega de material genético, que aliasse uma boa capacidade de transfeção a uma reduzida citotoxicidade, de modo a constituir um vetor não viral adequado para potencial aplicação em terapia génica. Como tal, testaram-se diversas formulações poliméricas preparadas com vários polímeros poli (metacrilato de 2-aminoetil) (PAMA) e copolímeros polietilenoglicol-poli (metacrilato de 2-aminoetil) (PEG- β -PAMA), de estruturas químicas ilustradas na Figura 13. Os polímeros foram sintetizados de acordo com o descrito na subsecção 2.1 *Materiais* da secção 2 *Materiais e Métodos*.

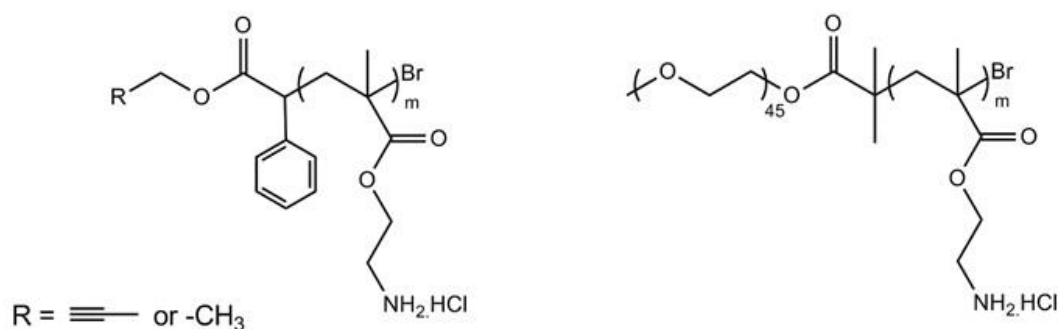


Figura 13- Estruturas químicas do homopolímero PAMA (à esquerda) e do copolímero em bloco PEG-b-PAMA (à direita).

As diversas formulações de nanossistemas foram primeiramente avaliadas na linha celular COS 7, determinando-se a atividade de transfeção e respetiva citotoxicidade de acordo com os diferentes pesos moleculares dos polímeros, e as diferentes razões de carga dos poliplexos. Visou-se também avaliar as diferenças entre os polímeros catiónicos e os copolímeros, de forma a determinar o efeito da incorporação do PEG nos polímeros catiónicos e a selecionar as formulações com os melhores comportamentos *in vitro*. Após seleção, testaram-se as melhores formulações na linha celular HepG2 – células humanas de carcinoma hepatocelular.

Estudaram-se também as propriedades físico-químicas das formulações que se destacaram, de modo a tentar perceber o potencial comportamento das mesmas em aplicações *in vivo*.

Tabela 2- Propriedades dos diferentes polímeros utilizados.

Polímero	Grau de Polimerização do monómero aminoetil metacrilato	M_n (g/ mol)
PAMA₃₆	36	6300
PAMA₅₁	51	8600
PAMA₁₀₅	105	17600
PAMA₁₆₁	161	26900
PEG-β-PAMA₄₀	40	8600
PEG-β-PAMA₆₃	63	12400
PEG-β-PAMA₁₁₁	111	20400
PEG-β-PAMA₁₆₈	168	29900

Na Tabela 2 encontram-se esquematizadas as diferentes propriedades dos polímeros estudados ao longo deste trabalho. Chegou-se ao peso molecular médio (M_n) de cada um dos polímeros através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, com exceção do PAMA₂₆₉₀₀, para o qual se mostra um valor teórico.

3.1 Capacidade de transfeção das nanopartículas em COS 7 – Ensaio de Luminescência

Avaliou-se a capacidade de transfeção das diferentes formulações desenvolvidas utilizando primeiramente a linha celular COS 7. Produziram-se nanopartículas com os polímeros presentes na tabela 2, tendo sido os políplexos preparados em três diferentes razões de carga (+/-) polímero/ DNA (10/1, 25/1 e 50/1) com um plasmídeo contendo o gene que codifica a luciferase - gene repórter utilizado nos ensaios de luminescência. De forma a avaliar o potencial dos polímeros e copolímeros em estudo como sistemas de transporte e entrega de material genético, utilizou-se o polímero polietilenimina (PEI) como controlo, já que este é considerado o *gold standard* no que toca a vetores de base polimérica devido à sua elevada eficiência de transfeção. A PEI utilizada possui estrutura ramificada e um peso molecular de 25 000 g/ mol, tendo sido os respetivos complexos preparados na razão de carga (+/-) 25/1.

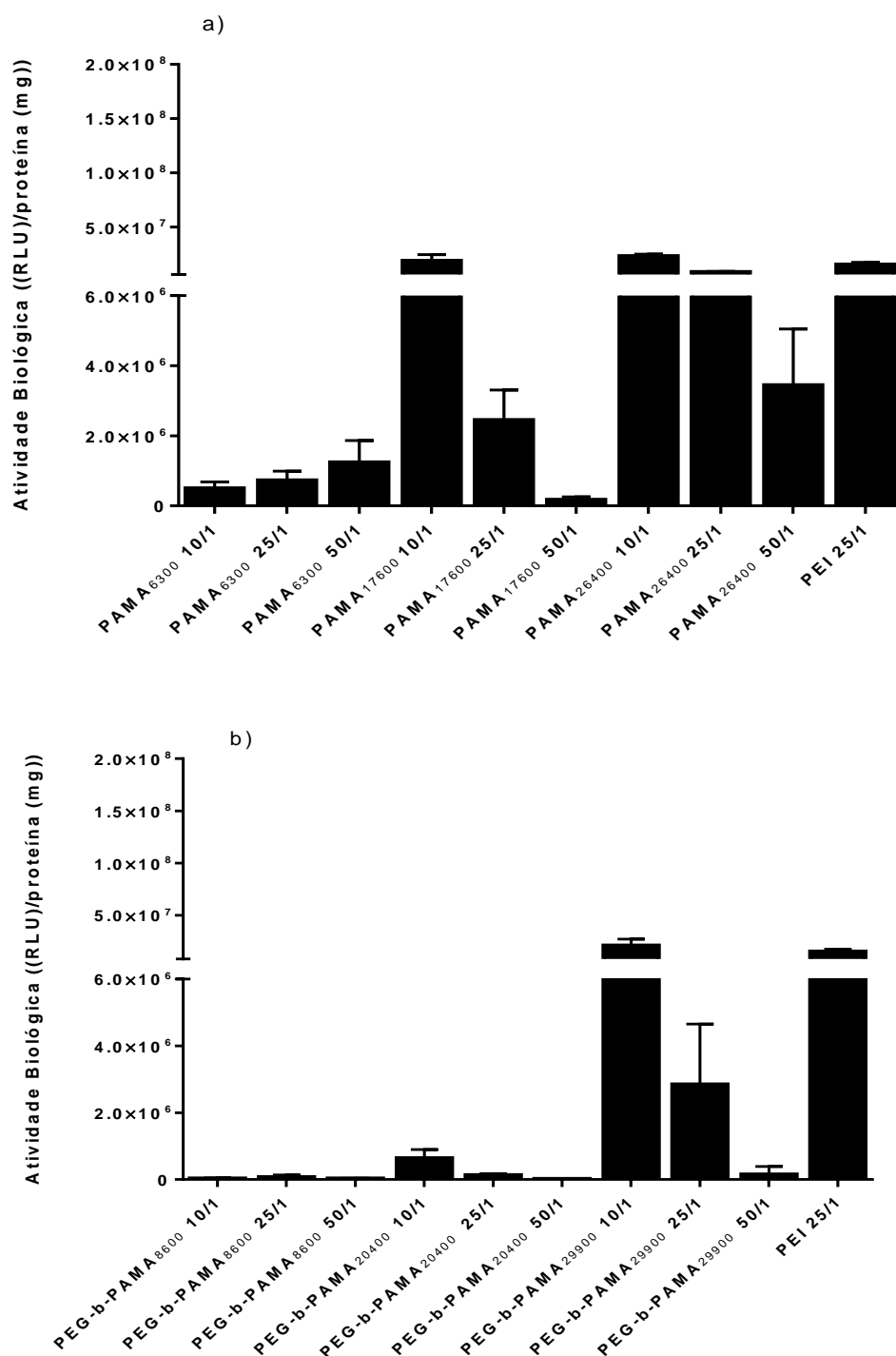


Figura 14- Efeito da composição e da razão de carga N/P (polímero/ material genético) dos políplexos na sua atividade de transfeção em células COS-7 na ausência de soro. Os diferentes polímeros PAMA (a) e copolímeros PEG- β -PAMA (b) foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/ P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Analisou-se, em primeiro lugar, a capacidade de transfeção das diferentes nanoformulações na ausência de soro, cujos resultados são apresentados na Figura 14. Os resultados obtidos mostram que nem todos os políplexos conseguem transfetar esta linha celular na ausência de soro, destacando-se uma clara influência do peso molecular dos polímeros e da razão de carga dos políplexos na expressão do transgene. Na ausência de soro, a capacidade de transfeção dos políplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀, na razão de carga 10/1, e PAMA₂₆₄₀₀, nas razões de carga 10/1 e 25/1, é superior ou igual à dos políplexos preparados a partir do polímero *gold standard*. No caso das nanopartículas preparadas a partir dos copolímeros, destacam-se os valores da expressão do transgene obtidos com os políplexos preparados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, na razão de carga 10/1, sendo estes semelhantes aos resultados obtidos com a PEI. A diminuição da atividade biológica com o aumento da razão de carga pode ser justificada com o incremento das cadeias livres de polímero, existindo estudos que sugerem uma influencia negativa destas no *uptake* celular, através da competição direta com os políplexos para se associar aos recetores membranares e ser conseqüentemente internalizadas¹³⁹.

Constata-se uma relação inversa entre a razão de carga (+/-) e a capacidade de transfeção das nanopartículas na ausência de soro, já que, no caso dos complexos com capacidade de transfeção considerável, um aumento da razão de carga conduz a uma diminuição da atividade biológica. Este aumento da quantidade de polímero leva a uma maior interação com o material genético, carregado negativamente, induzindo uma condensação superior deste último. Se, por um lado, é importante que o polímero proteja eficazmente o DNA, é também crucial que se dê uma descomplexação efetiva entre estes dois componentes, de modo a que o material genético possa ser transcrito. Ora, com o aumento da densidade de cargas positivas (como acontece com o aumento da razão de carga (+/-)), essa descomplexação pode não ocorrer de forma suficientemente eficaz para que ocorra uma expressão significativa do transgene, sendo esta uma explicação plausível para a diminuição da capacidade de transfeção com o aumento da razão polímero/ material genético. A diminuição da capacidade de transfeção com o aumento da razão de carga pode também estar relacionada com um incremento da citotoxicidade das nanopartículas preparadas nas maiores razões de

carga, conforme se poderá confirmar na secção 3.2 *Citotoxicidade dos poliplexos na linha celular COS 7- Ensaio de viabilidade celular*.

De uma forma geral, regista-se uma maior atividade biológica para os poliplexos preparados a partir do homopolímero de maior peso molecular (PAMA₂₆₄₀₀), o que poderá estar relacionado com a formação de complexos mais estáveis, por via de uma maior interação entre o polímero e o material genético, resultando em poliplexos com uma estrutura mais favorável a uma maior interação com a membrana celular e consequente *uptake*.

A Figura 14b mostra que apenas os poliplexos formados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ possuem capacidade de transfeção significativa, com ênfase para os poliplexos preparados na razão de carga (+/-) 10/1, reportando-se valores idênticos aos obtidos com os poliplexos formados a partir do polímero *gold standard*. Existem evidências de que a conjugação com o polietilenoglicol leva a uma diminuição do *uptake* das nanopartículas (devido à diminuição da carga superficial), bem como a uma inibição do efeito de esponja e da descomplexação do polímero a nível intracelular¹¹², fatores que podem estar na origem da menor capacidade de transfeção destes poliplexos face aos obtidos a partir do homopolímero de peso molecular mais próximo.

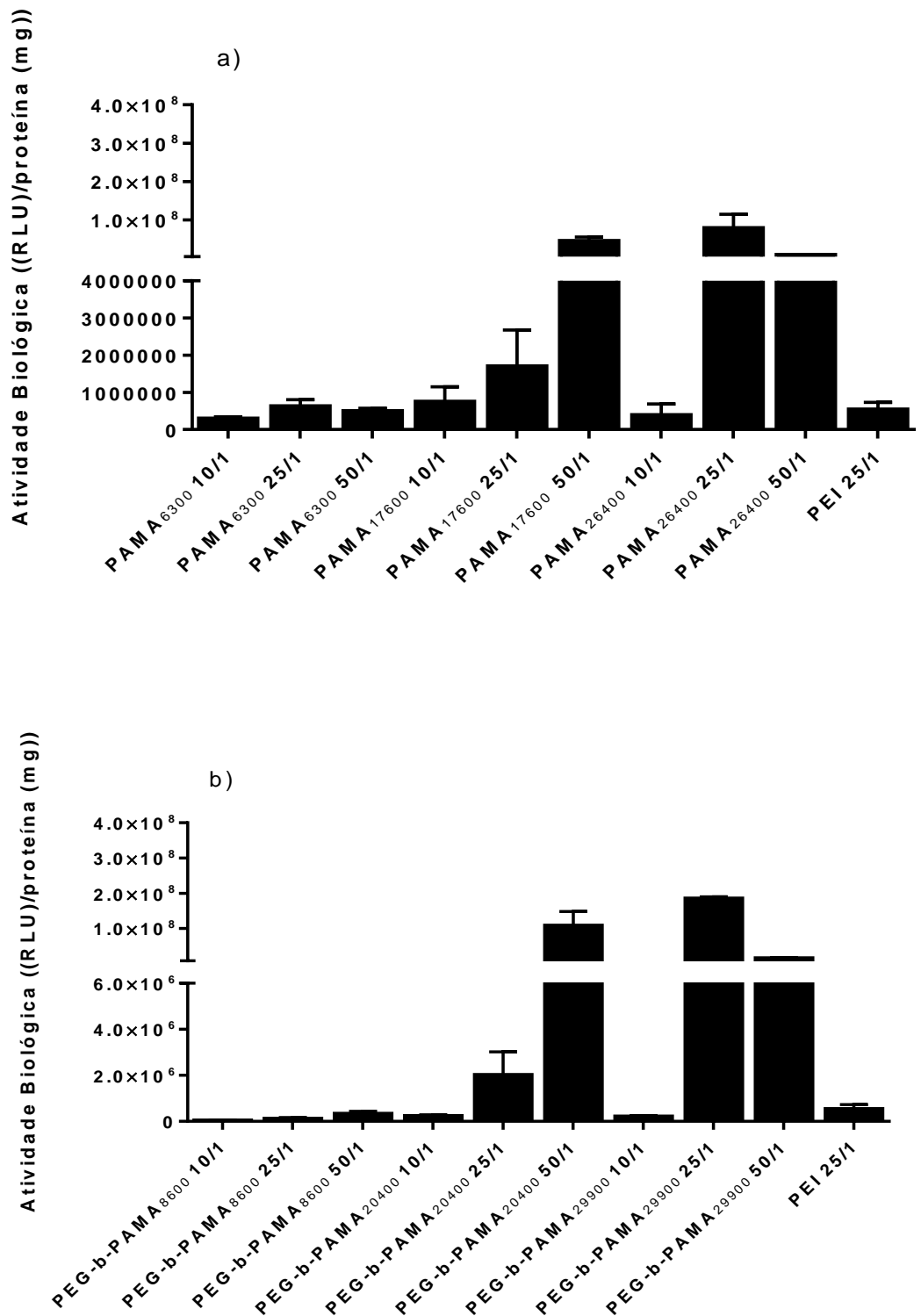


Figura 15- Efeito da presença de soro na atividade de transfeção de poliplexos preparados a partir do homopolímero PAMA (a) e do copolímero PEG- β -PAMA (b) na linha celular COS 7. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na subsecção Métodos na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Com este trabalho, visa-se desenvolver um nanossistema de base polimérica capaz de levar a cabo uma entrega competente e segura de material genético, tendo em vista a sua potencial aplicação *in vivo*. Consequentemente, e de forma a mimetizar as características das aplicações *in vivo*, os ensaios cujos resultados estão representados na Figura 15 foram executados na presença de soro. Apesar de se esperar que a presença deste fator condicione a atividade de transfeção, leva também ao estabelecimento de previsões mais exatas quanto ao comportamento destes nanossistemas *in vivo*.

Verificou-se um claro efeito da presença de soro na capacidade de transfeção dos polímeros em estudo, não havendo, no entanto, um padrão perfeitamente explícito. Na presença deste componente, atingiram-se níveis de expressão do transgene mais elevados que os obtidos na sua ausência, o que ocorreu em particular para os homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀ nas razões de carga de 50/1 em ambos os casos e também de 25/1 no caso do homopolímero de maior peso molecular. Observou-se, ainda assim, uma capacidade de transfeção considerável para todos os poliplexos, havendo uma clara influência do peso molecular dos polímeros. Para além deste fator, a razão de carga N/ P também desempenha um papel essencial, conforme se pode aferir pelos resultados apresentados na Figura 15.

No caso dos homopolímeros, constata-se que, para pesos moleculares mais baixos, como o das formulações preparadas a partir do polímero PAMA₆₃₀₀, a atividade de transfeção é equiparada à da PEI, sendo, ainda assim, largamente inferior à das nanopartículas em destaque neste ensaio. Este facto pode dever-se precisamente ao peso molecular dos polímeros utilizados, já que, para pesos moleculares mais baixos, a condensação do DNA pode não ser feita de forma eficaz, devido à falta de interações eletrostáticas suficientemente fortes entre o polímero catiónico e o material genético, podendo levar a uma dissociação precoce dos complexos (antes de se dar a internalização celular) e à libertação do DNA. Não havendo a formação de poliplexos suficientemente estáveis, a dissociação do material genético pode ocorrer demasiado cedo, levando a uma entrega pouco eficaz do mesmo. Como se sabe, a entrada dos poliplexos na célula, quando não é mediada por recetores membranares específicos, é feita por via de interações eletrostáticas entre os poliplexos e a membrana celular¹⁴⁰.

No caso de não haver uma dissociação precoce dos políplexos, para um peso molecular mais baixo, a sua carga superficial pode não ser suficientemente positiva, influenciando negativamente o *uptake* das nanopartículas, servindo este argumento para os políplexos resultantes do homopolímero PAMA₆₃₀₀.

No caso das nanopartículas preparadas a partir dos homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀, destacaram-se as formulações preparadas nas razões de carga (+/-) 50/1 e 25/1 para os polímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀, respetivamente. Face à ausência de soro, a capacidade de transfeção dos políplexos formados a partir do homopolímero PAMA₁₇₆₀₀ sofreu alterações, principalmente no que toca ao efeito da razão de carga, verificando-se também um aumento dos níveis mais altos de expressão do transgene. No caso das nanopartículas preparadas a partir do homopolímero PAMA₂₆₄₀₀, a presença de soro também trouxe uma influência positiva, já que se atingiram valores superiores de atividade biológica, com exceção dos políplexos preparados na razão de carga (+/-) 10/1. Apesar das alterações observadas na presença de soro, os níveis máximos de expressão do transgene obtidos com os políplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀ são semelhantes.

No caso do PAMA₁₇₆₀₀, observa-se um aumento da capacidade de transfeção na presença de soro com a razão de carga. Ora, com o aumento da razão de carga, as interações eletrostáticas estabelecidas tornam-se mais fortes devido a uma maior quantidade de polímero catiónico presente, estando este fator implicado na diminuição da capacidade de transfeção dos políplexos formados na razão de carga (+/-) 10/1 relativamente aos formados em razões de carga (+/-) superiores, já que, com uma condensação menos eficiente do material genético, é permitido às proteínas do soro (carregadas negativamente) desestabilizar os políplexos e influenciar negativamente os níveis de expressão do transgene, conforme alguma literatura sugere²¹. No entanto, e conforme já foi referido, reportou-se um aumento dos níveis de expressão do transgene com a razão de carga na presença de soro, sendo esta tendência inversa ao obtido na ausência de soro. Este facto, aponta para uma possível contribuição positiva das proteínas constituintes do soro nos políplexos preparados a partir do polímero PAMA₁₇₆₀₀ nas razões de carga (N/P) 25/1 e 50/1. Ora, com o aumento da razão de carga, aumenta-se conseqüentemente a quantidade de polímero catiónico presente, o que vai permitir o estabelecimento de interações eletrostáticas com as proteínas do soro

carregadas negativamente, o que pode aumentar a capacidade de transfeção dos poliplexos preparados a partir do polímero PAMA₁₇₆₀₀ nas razões de carga (N/P) 25/1 e 50/1. A carga superficial dos poliplexos preparados na razão de carga 10/1 é mais baixa do que para os derivados nas razões de carga de 25/1 e 50/1, o que pode estar na origem da diminuição da capacidade de transfeção aquando da utilização das formulações elaboradas nestas características (razão de carga 10/1), por via de não se estabelecerem suficientes interações eletrostáticas entre a superfície dos poliplexos e a membrana celular, influenciando negativamente a sua internalização. Ainda assim, existem outras possíveis razões para o aumento da capacidade de transfeção destas nanopartículas com a razão de carga que valem a pena analisar. Veja-se, com o aumento das cargas positivas, é promovido um aumento do polímero catiónico, existindo evidências de que cadeias poliméricas livres aumentam a entrega de genes a nível intracelular, já que estas potenciam o efeito de esponja de protões¹⁴¹ levando, por conseguinte, à libertação do material genético, sendo, no entanto, este argumento descartado por via dos resultados obtidos na ausência de soro, onde um aumento de cadeias poliméricas livres não conduziu a um aumento dos níveis de expressão do transgene, antes pelo contrário, o que indica que, muito provavelmente, o fator primordial para o aumento da atividade biológica das formulações com a razão de carga, é a presença de soro e consequente interação dos poliplexos com as proteínas que o constituem, já que o excesso de cadeias livres de polímero catiónico leva a uma interação com as proteínas do soro carregadas negativamente.

As nanopartículas preparadas a partir do homopolímero PAMA₂₆₄₀₀ apresentam um perfil de atividade biológica dentro do esperado, já que este parâmetro atinge o seu máximo nas formulações de razão de carga 25/1. Ora, sendo este o polímero de maior peso molecular, é de esperar o estabelecimento de interações eletrostáticas suficientemente fortes entre o mesmo e o material genético, o que se espera que leve a uma maior proteção do material genético. No entanto, e como já foi abordado na subsecção 1.3. *Nanopartículas Poliméricas*, existem diversos obstáculos a uma entrega eficaz de material genético com vetores não-virais. Um deles é a descomplexação das nanopartículas, levando à libertação do material genético. Com o aumento da condensação do material genético, torna-se mais difícil a libertação do mesmo, de forma a levar à sua transcrição no núcleo celular, o que diminuirá a

expressão do gene repórter. Atendendo aos resultados do ensaio de exclusão do brometo de etídio, esta é uma hipótese bastante plausível. Ainda assim, depois de analisados os resultados da viabilidade celular, constatou-se que as nanopartículas preparadas na razão de carga 50/1 possuem uma citotoxicidade elevadíssima, o que compromete a transfeção levada a cabo por estas formulações. No entanto, estes resultados vão de encontro ao esperado, já que é reportada uma clara influência do peso molecular e tamanho das cadeias poliméricas no *uptake* celular, bem como no escape endossomal, desempacotamento do DNA e internalização nuclear¹¹⁸. Apesar da influência do peso molecular na conseqüente formação de poliplexos mais estáveis, crê-se que mais importante ainda para uma boa transfeção é a descomplexação dos poliplexos com conseqüente libertação do material genético¹⁴², o que, a juntar à citotoxicidade exibida, pode estar relacionado com a diminuição da capacidade de transfeção na razão de carga de 50/1 dos poliplexos formados a partir do polímero PAMA₂₆₄₀₀. Uma boa capacidade de ligação entre o polímero e o material genético leva a uma boa estabilidade no meio extracelular, ao passo que uma ligação mais fraca entre estes dois componentes conduz a uma mais fácil libertação do material genético a nível intracelular, havendo a necessidade de encontrar um equilíbrio entre estes dois parâmetros para uma entrega adequada de material genético.

Geralmente, a presença de soro afeta negativamente a transfeção com nanopartículas poliméricas²¹, fator esse que se deve à interação entre os polímeros catiónicos e alguns constituintes do soro, como é o caso de algumas proteínas carregadas negativamente. Assim, surge a necessidade de estudar estratégias que permitam contornar os obstáculos impostos pela presença de soro, sendo uma das mais promissoras a conjugação de polímeros catiónicos com o polímero hidrofílico PEG. Copolímeros deste tipo possuem uma maior estabilidade coloidal, potencialmente aumentando o tempo de circulação *in vivo*, já que é combatida a agregação de nanopartículas¹¹² e conseqüente excreção da corrente sanguínea por parte do sistema reticuloendotelial.

Assim sendo, propôs-se estudar o comportamento de copolímeros com polietilenoglicol possuindo, para o efeito, pesos moleculares e graus de polimerização próximos dos evidenciados pelos homopolímeros PAMA, conforme ilustrado na tabela 2, visto que se pretendeu estudar o efeito da conjugação do polímero hidrofílico PEG

com o homopolímero PAMA. Avaliou-se a atividade biológica das diferentes formulações de forma análoga ao descrito anteriormente e os resultados obtidos encontram-se representados na figura 15b.

Na presença de soro, os poliplexos formados a partir dos diferentes copolímeros demonstram claras melhorias na expressão do transgene face ao observado na ausência de soro, sendo a exceção o polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ complexado com material genético na razão de carga (+/-) 10/1. Podemos inferir, então, que a presença do PEG contribui positivamente para o comportamento dos poliplexos na presença de soro, não tomando em consideração os poliplexos preparados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₈₆₀₀, já que estes induzem níveis de expressão do transgene reduzidos. A peguilação dos complexos está descrita como sendo um promotor do aumento da estabilidade coloidal, o que se deve em grande parte à inibição de interações não específicas com constituintes do meio de cultura^{143,144}.

De uma forma geral, a atividade biológica exibida pelas formulações derivadas do polímero PEG-b-PAMA₈₆₀₀ é reduzida quando comparada com outros poliplexos derivados dos diferentes copolímeros. Sendo o peso molecular do polímero relativamente baixo, perspectiva-se que os resultados obtidos possam ter origem na influência do PEG na densidade de carga do polímero, pois, apesar do potencial zeta ser positivo, a presença do PEG altera a densidade de cargas positivas, o que poderá interferir negativamente com o *uptake* celular das nanopartículas. Por outro lado, a peguilação de poliplexos pode resultar em perturbações no efeito esponja, o que diminui o escape endossomal dos mesmos, e no aumento da estabilidade coloidal, podendo este fator dificultar a descomplexação entre o polímero e o material genético¹¹² e, conseqüentemente, a sua libertação no interior da célula.

No caso do copolímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, a capacidade de transfeção aumenta com a razão de carga N/P, exibindo os poliplexos preparados na razão de carga (N/P) 50/1 uma atividade biológica superior à demonstrada pelos poliplexos preparados com o homopolímero análogo PAMA₁₇₆₀₀, realçando o efeito positivo que a peguilação induziu também neste caso, conforme descrito para outros vetores poliméricos conjugados com este composto tanto *in vitro*¹⁴⁵ como *in vivo*¹⁴⁶.

Para as nanopartículas formadas a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, crê-se existir um bom compromisso entre o peso molecular do polímero catiónico e a ação

do PEG, ou seja, o aumento do peso molecular e do grau de polimerização das cadeias pode ser suficiente para assegurar a densidade de carga necessária para complexar o material genético, garantindo, simultaneamente, que o PEG promova, possivelmente, um aumento da estabilidade coloidal. Demonstra-se, então, que para o copolímero de peso molecular intermédio, PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, a ação dos poliplexos é influenciada pela presença de soro e pela quantidade de cargas positivas, já que, com o aumento da razão de carga, se verifica um aumento da quantidade de cadeias poliméricas livres que, analogamente ao caso do homopolímero PAMA₁₇₆₀₀, se pode traduzir num aumento da interação com as proteínas do soro carregadas negativamente e conseqüente aumento dos níveis de expressão do transgene. A presença de soro aparenta ser um fator primordial neste caso, já que os poliplexos preparados a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ nas três razões de carga não possuem atividade biológica digna de registo na ausência de soro, ao contrário do que acontece na presença deste constituinte. Estes resultados sugerem, no entanto, que o PEG não consegue inibir totalmente as interações entre o polímero catiónico e as proteínas do soro, talvez por via do segmento catiónico ter um peso bastante superior ao do polietilenoglicol.

Os poliplexos resultantes do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ apresentam um comportamento diferente do observado para as nanopartículas formadas com os polímeros e copolímeros de pesos moleculares intermédios. No caso do copolímero em questão, o máximo da atividade biológica na presença de soro é manifestado na razão de carga (+/-) 25/1, conforme o sucedido para o homopolímero de peso molecular semelhante. Ainda assim, a capacidade de transfeção destas nanopartículas superioriza-se à dos poliplexos derivados do homopolímero com peso molecular mais próximo, para além de ser aproximadamente 340 vezes superior à atividade biológica do controlo utilizado- poliplexos preparado com a PEI. Neste caso, é ainda esperado que, nas razões de carga mais elevadas, o aumento do peso molecular promova um excesso de condensação do material genético, o que pode induzir a diminuição da atividade biológica na razão de carga (+/-) 50/1 por via de uma descomplexação menos eficaz entre o polímero e o material genético e, logo, menor libertação do DNA. Outra possível razão para a diminuição da atividade biológica dos poliplexos preparados com este copolímero na razão de carga (+/-) 50/1 é a citotoxicidade exibida, conforme será

discutido no capítulo 3.2. *Citotoxicidade dos poliplexos na linha celular COS 7- Ensaio de viabilidade celular.*

Após o *screening* inicial da atividade biológica protagonizada por polímeros e copolímeros de diferentes pesos moleculares e graus de polimerização, selecionaram-se as formulações com uma maior capacidade de transfeção. De forma a prosseguir os estudos comparativos, agruparam-se as formulações em pares consoante o seu peso molecular. Dentro do par, visa-se analisar a influência que o PEG tem no comportamento das nanopartículas. Destacaram-se as formulações derivadas dos polímeros PAMA₁₇₆₀₀, PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, PAMA₂₆₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀.

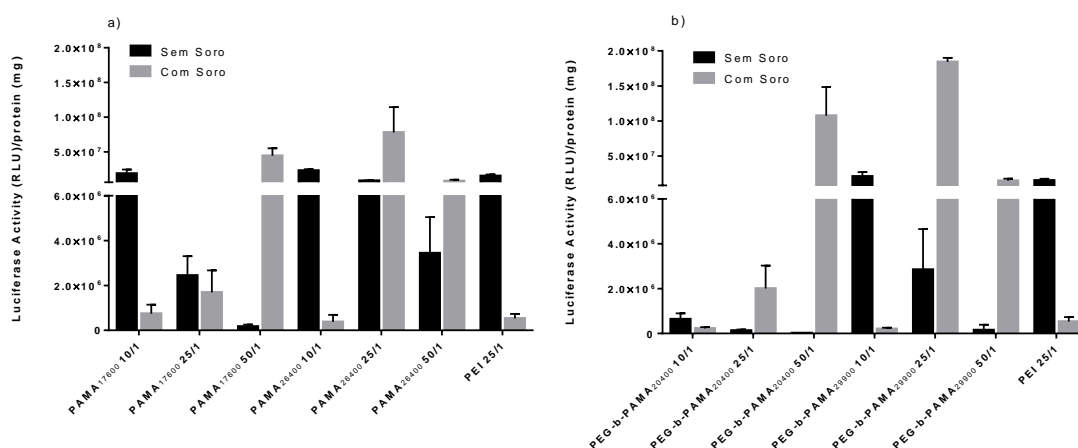


Figura 16- Efeito da razão de carga e da presença do PEG na atividade biológica dos poliplexos preparados a partir do par PAMA₁₇₆₀₀/ PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀/ PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na presença e ausência de soro em células COS 7. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em unidades RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média ± desvio padrão, obtida de triplicados).

Na figura 16, é possível analisar de forma mais detalhada o comportamento dos pares polímero/copolímero que se destacaram no *screening* inicial tanto na presença como na ausência de soro. Conforme referido anteriormente, o par PAMA₁₇₆₀₀/PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ apresenta uma crescente atividade de transfeção com a razão de carga, superiorizando-se os poliplexos preparados a partir do copolímero na razão de carga (+/-) 50/1, o que, para além dos argumentos já referidos, poderá estar relacionado com o perfil de citotoxicidade das nanopartículas, já que este parâmetro assume valores reduzidos mesmo nas maiores razões de carga, conforme será discutido

na subsecção seguinte 3.2 *Citotoxicidade dos poliplexos na linha celular COS 7- Ensaio de viabilidade celular.*

No caso dos poliplexos preparados a partir do par PAMA₂₆₄₀₀/ PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, o máximo da atividade de transfeção ocorre na razão de carga (+/-) polímero/ material genético de 25/1, o que se pode dever a um excesso de condensação do DNA e a uma elevada citotoxicidade dos poliplexos preparados na razão de carga (+/-) 50/1, causando uma diminuição dos níveis de expressão do transgene. No entanto, existem outros fatores a ter em conta na análise da capacidade de transfeção destas formulações, como a estabilidade coloidal dos poliplexos, já que estes, apesar de conjugados com o PEG, podem sofrer alterações a nível estrutural por via da interação com as proteínas constituintes do soro, o que poderá prejudicar a internalização e o tráfego intracelular das nanopartículas. Essa análise será feita com maior detalhe na subsecção 3.6.1 *Tamanho e potencial zeta dos poliplexos.*

Na maior parte dos casos, a presença do polietilenoglicol influencia negativamente a atividade biológica das formulações, seja através da redução da interação das nanopartículas com a membrana celular (como se reporta para alguns polímeros¹¹²) ou de uma inibição do efeito de esponja de protões¹²⁸ e da descomplexação dos poliplexos por via da estabilidade das nanopartículas conjugadas com o PEG¹¹². No entanto, para o par de maior peso molecular, observa-se que os poliplexos preparados a partir do copolímero e do homopolímero exibem, na presença de soro, uma atividade biológica superior na razão de carga N/P 25/1, o que permite inferir que, face ao aumento do peso molecular, a maior atividade biológica foi obtida para uma razão de carga (+/-) inferior ao observado com o copolímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀. Discutiram-se diversas razões para as diferenças evidenciadas pelas várias formulações no que diz respeito à sua capacidade de transfeção, advindo parte deste lote das características físico químicas dos poliplexos ou de mudanças na sua estrutura, ambos casos indutivos de mudanças comportamentais dos nanossistemas de transporte e entrega de material genético quando testados *in vitro* e, principalmente, *in vivo*. Ainda assim, existem diferentes razões a considerar para o aumento da atividade biológica, na presença de soro, com a razão de carga polímero/material genético e com o efeito do peso molecular. Uma dessas possíveis razões é a interação das nanopartículas com as proteínas do soro, como é o caso da albumina, podendo haver uma influência positiva

na atividade de transfeção desencadeada pela presença desta proteína que, como se sabe, é carregada negativamente, o que permite a ocorrência de interações eletrostáticas com o polímero catiónico. Ainda assim, o mecanismo ao certo pelo qual a interação com esta proteína aumenta a atividade biológica de nanopartículas ainda não é totalmente evidente¹⁴⁷. A composição dos complexos pode desempenhar um papel importante, os complexos conjugados com a albumina podem ligar-se de forma não específica a recetores da membrana celular capazes de mediar a internalização celular¹⁴⁷, para além do facto da protonação parcial desta proteína a pH endossomal e do facto da albumina poder interagir com a membrana do endossoma poder resultar na desestabilização do mesmo, libertando o material genético¹⁴⁸. Existem estudos que relatam um aumento do tempo de circulação *in vivo* de complexos com polietilenoglicol graças à ligação com a albumina, seja por via da alteração da conformação das moléculas de PEG para uma estrutura impeditiva de interações entre os complexos e as proteínas do soro, ocupação dos locais de ligação entre os complexos e as proteínas do soro ou por um aumento da hidrofiliabilidade do PEG promovido pela albumina¹⁴⁹. Para além da existência de resultados que demonstram o aumento da capacidade de transfeção de poliplexos aos quais se adicionou albumina, o que se poderá dever ao aumento da internalização dos poliplexos por endocitose mediada por recetores¹⁵⁰.

3.2 Citotoxicidade dos poliplexos na linha celular COS 7 – Ensaio de viabilidade celular

A procura de um nanossistema de transporte e entrega de material genético ideal envolve considerar a segurança da aplicação do mesmo. Por via da citotoxicidade apresentada por alguns polímeros²³, era de grande importância analisar a viabilidade celular após tratamento com as formulações em estudo. Como tal, realizaram-se ensaios de viabilidade celular cujo procedimento seguiu o descrito na secção 2 *Materiais e Métodos*. Procedeu-se a um *screening* inicial, onde se avaliou a viabilidade celular após transfeção na ausência de soro com os mesmos poliplexos para os quais se avaliou a atividade biológica.

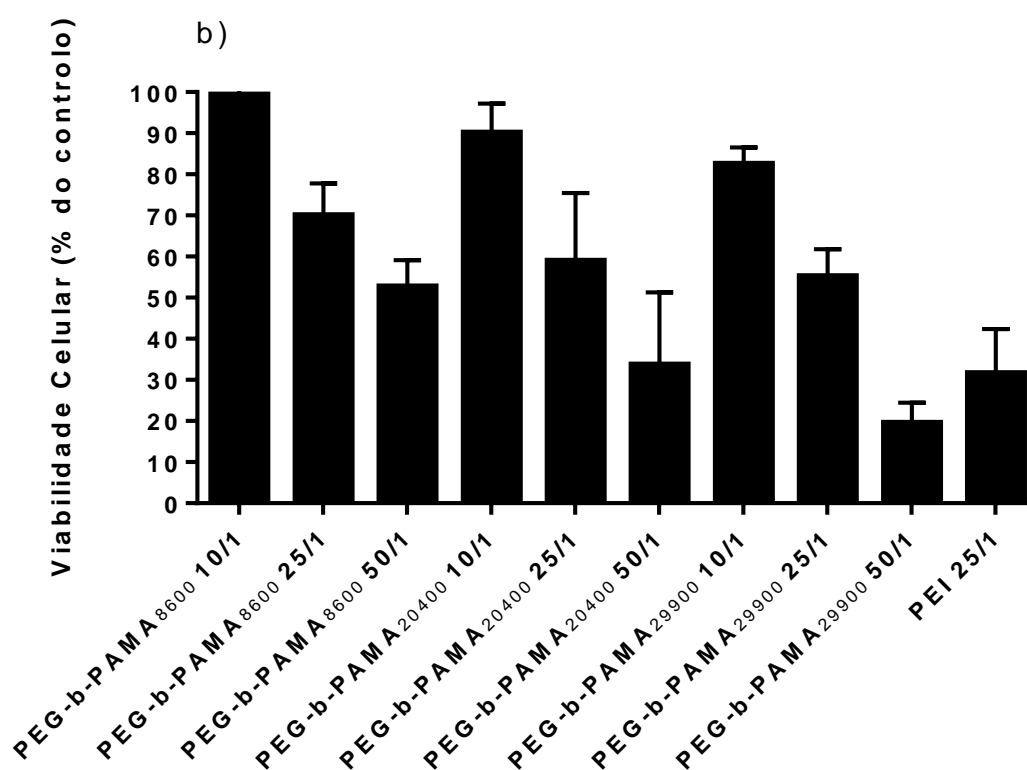
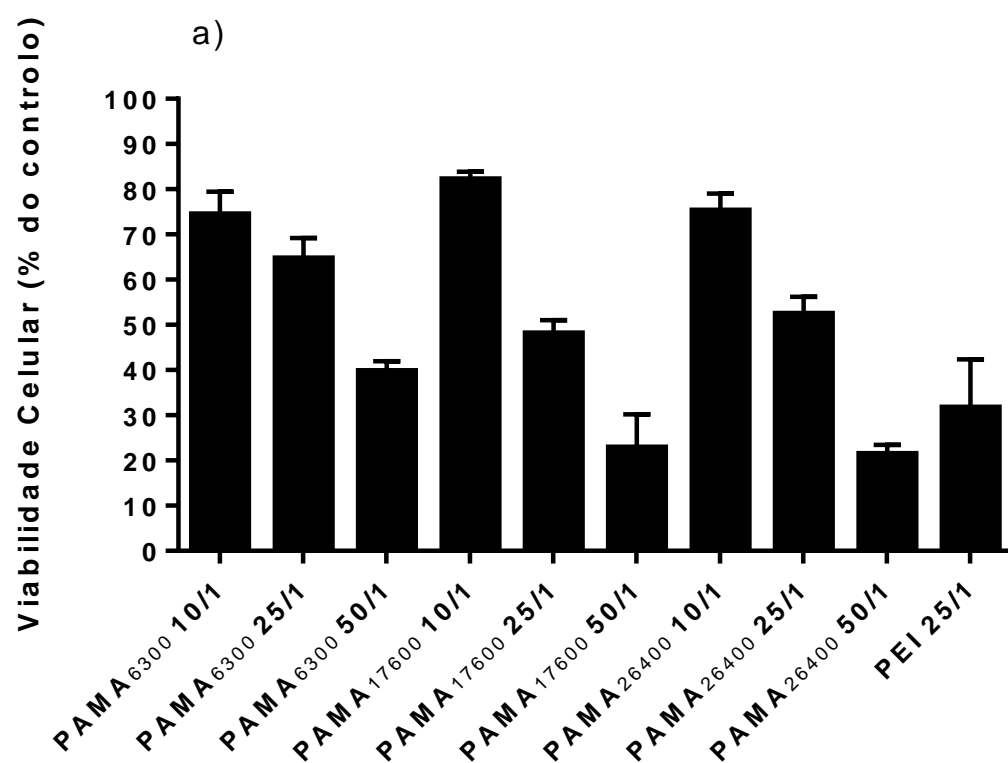


Figura 17- Efeito do peso molecular dos polímeros e da razão de carga (N/P) dos políplexos na viabilidade células COS 7. Os políplexos foram preparados a partir do homopolímero PAMA (a) e do copolímero PEG- β -PAMA (b). Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/ P

indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos . Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Existem diversos fatores associados à citotoxicidade demonstrada por polímeros catiónicos, destacando-se entre eles o peso molecular, estrutura e a densidade de resíduos catiónicos¹⁵¹. Através da análise dos resultados apresentados na Figura 17, reporta-se uma clara influência da composição dos polímeros e da razão de carga dos poliplexos na sua citotoxicidade na ausência de soro. Ainda assim, o perfil de citotoxicidade é igual tanto para as nanopartículas resultantes dos homopolímeros como dos copolímeros, demonstrando-se um incremento da citotoxicidade com o aumento da razão de carga, sendo este um resultado esperado, já que o aumento da razão de carga leva a uma maior quantidade de resíduos catiónicos a interagir com a membrana celular, conduzindo à sua desestabilização. Os danos induzidos pela carga positiva da superfície dos poliplexos têm também um impacto importante a nível intracelular, já que os complexos carregados positivamente têm a capacidade de permeabilizar a membrana das mitocôndrias, levando à libertação do citocromo c e consequente indução de mecanismos apoptóticos^{152, 153}.

Não se observou um efeito pronunciado do peso molecular na citotoxicidade dos poliplexos preparados a partir dos homopolímeros, ainda que as nanopartículas resultantes do polímero PAMA₆₃₀₀ nas razões de carga 25/1 e 50/1 apresentem uma citotoxicidade inferior às preparadas nas mesmas razões de carga com homopolímeros de maior peso molecular.

O perfil de citotoxicidade dos poliplexos preparados com o copolímero PEG-b-PAMA nos diferentes pesos moleculares é igual ao observado para as nanopartículas preparadas a partir dos homopolímeros, havendo um aumento da citotoxicidade com a razão de carga. Era esperado que a conjugação com o polímero PEG alterasse este parâmetro, por via de uma redução na carga superficial das nanopartículas, o que foi manifestamente visível apenas para as preparações de menor peso molecular, conforme se constata analisando a viabilidade celular após tratamento com os poliplexos preparados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₈₆₀₀. Para as restantes formulações, a presença do polietilenoglicol não produziu diferenças significativas, o que reforça a ideia já exposta anteriormente de que, para pesos moleculares elevados,

o PEG não consegue inibir as cargas positivas, acabando estas por induzir uma desestabilização membranar. Ainda assim, dar-se-á maior ênfase a estes dados na discussão acerca das propriedades físico-químicas dos diferentes políplexos.

De uma forma geral, na ausência de soro, a citotoxicidade dos políplexos em estudo é inferior ao observado com o polímero *gold standard*, sendo estas diferenças particularmente evidentes para as nanopartículas preparados nas razões de carga (+/-) inferiores. Tendo em conta que a análise da capacidade de transfeção e da viabilidade celular não devem ser feitas de forma independente, há que destacar que os políplexos com maior capacidade de transfeção apresentam também uma citotoxicidade largamente inferior à apresentada pelas nanopartículas controlo.

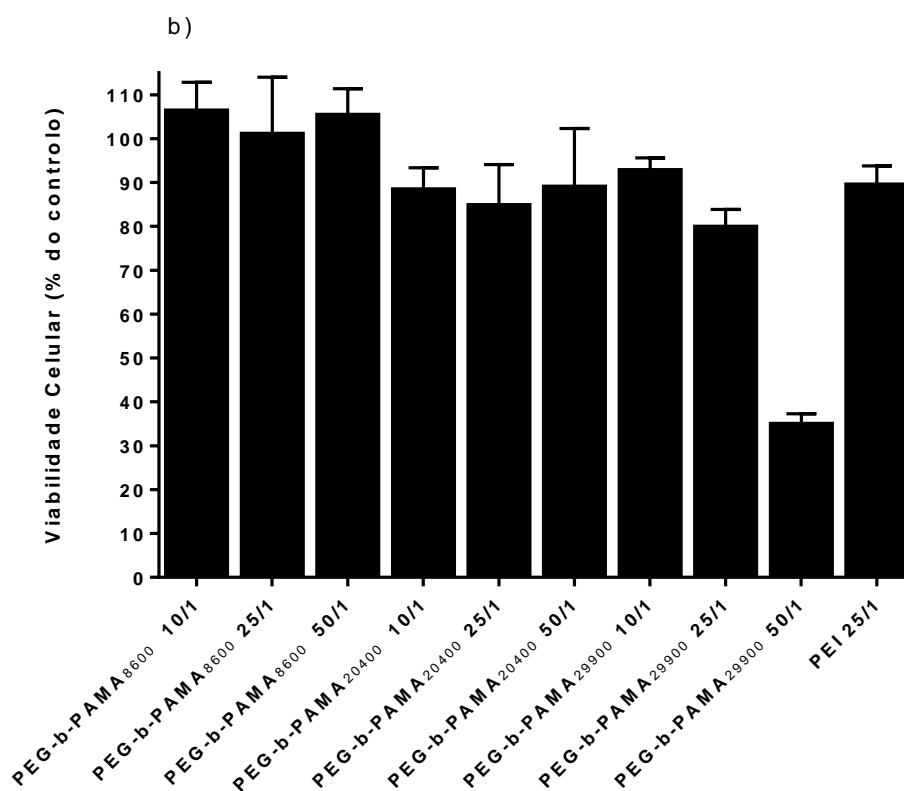
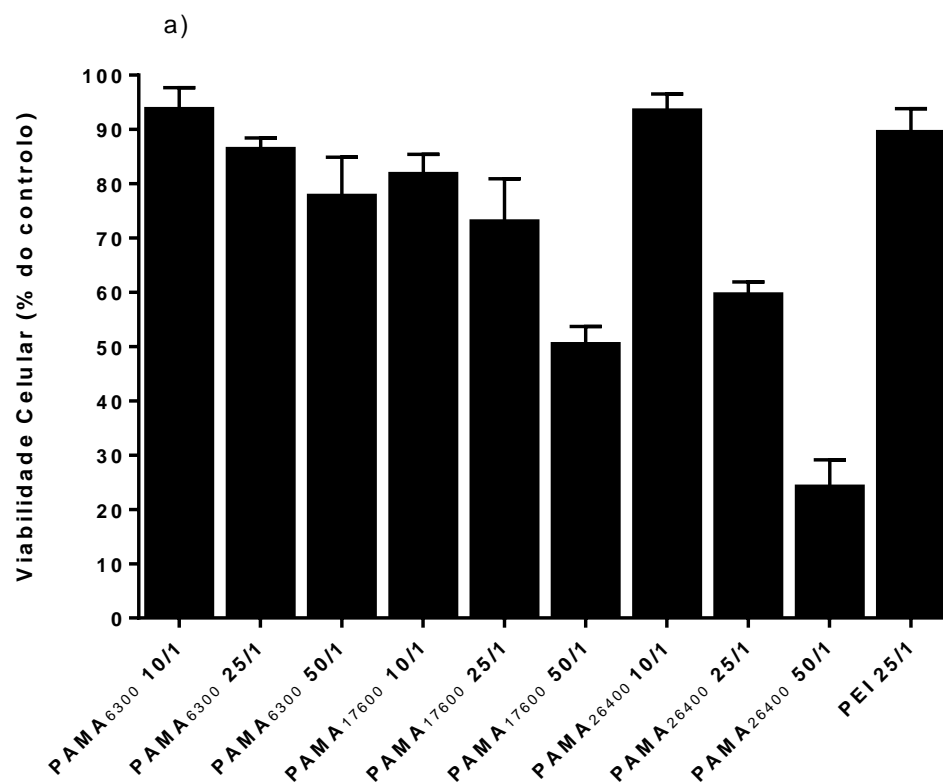


Figura 18-Efeito da presença de soro na viabilidade celular após o tratamento com diversos políplexos preparados a partir do homopolímero PAMA (a) e do copolímero PEG- β -PAMA (b) na linha celular COS 7. Os diferentes

polímeros e copolímeros foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc nos rácios N/ P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média ± desvio padrão obtidas de triplicados).

Os resultados ilustrados na Figura 18 mostram uma influência positiva do soro na viabilidade das células, que é normalmente promovida através do fornecimento de nutrientes ou do revestimento das células¹⁵⁴. Ainda assim, este não é o único fator justificativo da diferença de citotoxicidade dos poliplexos formados a partir dos homopolímeros e dos copolímeros na presença de soro. Conforme se conclui pela análise das Figuras 17 e 18, todas as formulações com PEG apresentam uma citotoxicidade igual ou inferior às derivadas dos homopolímeros, mostrando o envolvimento do polietilenoglicol na redução dos mecanismos citotóxicos dos poliplexos.

A análise da citotoxicidade das nanopartículas preparadas a partir do homopolímero PAMA mostrou ser dependente tanto do peso molecular como da razão de carga (+/-) polímero/material genético, conforme seria de esperar. Registou-se uma diminuição da viabilidade celular após tratamento com nanopartículas preparadas em razões de carga superiores e com pesos moleculares maiores, registando-se esse perfil para os poliplexos formados a partir de todos os homopolímeros. Desta forma, observou-se uma citotoxicidade adequada para os poliplexos preparados a partir do homopolímero PAMA₆₃₀₀, já que se considera como adequado um valor abaixo dos 20%. Para as formulações preparadas a partir dos polímeros de maior peso molecular, é de destacar a considerável citotoxicidade dos poliplexos preparados na razão de carga (+/-) 50/1, sendo que, no caso do polímero PAMA₂₆₄₀₀, até no rácio polímero/material genético de 25/1 a viabilidade celular após tratamento com as nanopartículas é substancialmente reduzida. É aceite que as interações eletrostáticas entre os poliplexos carregados positivamente e a membrana celular carregada negativamente induzem danos nesta¹⁵⁵, levando, eventualmente, à morte celular, o que, à partida, poderá ser um dos principais fatores responsáveis pela citotoxicidade das formulações em estudo, indo ao encontro das evidências de uma relação direta entre o aumento dos resíduos catiónicos e a sua citotoxicidade¹⁵⁶.

Outro dos fatores nocivos para a célula aquando do tratamento com polímeros catiónicos é o tamanho das cadeias poliméricas. Ora, conforme ilustrado na Tabela 2, existe um aumento progressivo do grau de polimerização das cadeias com o peso molecular, o que também pode estar envolvido na maior citotoxicidade apresentada pelos poliplexos formados a partir dos polímeros de maior peso molecular¹⁵⁶.

Em comparação com o *gold standard*, alguns dos poliplexos formados a partir do homopolímero destacaram-se pela negativa, já que a viabilidade celular após tratamento com os poliplexos controlo é apenas igualada/superada pelas nanopartículas formadas a partir dos polímeros PAMA₆₃₀₀ nas razões de carga polímero/material genético de 10/1 e 25/1, e PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀, ainda que apenas na razão de carga N/P de 10/1.

Com a conjugação entre os homopolímeros PAMA e o polímero PEG, seria de prever uma alteração no perfil de citotoxicidade das formulações em estudo por via de mecanismos já abordados na introdução, esperando-se que, após tratamento com nanopartículas peguiladas, haja um aumento da viabilidade celular. Através da análise dos resultados apresentados na Figura 18, constata-se uma visível redução da citotoxicidade dos poliplexos formados a partir do copolímero face às formulações baseadas nos homopolímeros, o que pode ser devido a uma redução da densidade de carga superficial dos poliplexos e conseqüente redução da interação com a membrana celular, acontecimentos atribuídos à presença do PEG. No caso dos poliplexos formados a partir do polímero PEG-b-PAMA₈₆₀₀, é visível uma ausência da citotoxicidade para as diferentes razões de carga, o que poderá advir do facto de o polímero hidrofílico mascarar a carga positiva induzida pelo segmento catiónico, minimizando as interações eletrostáticas entre o polímero e a membrana celular. Crê-se que o PEG promove uma rede hidrofílica em torno do poliplexos, o que poderá criar uma barreira física entre os poliplexos e a superfície celular, minimizando a desestabilização e conseqüente permeabilização da membrana celular^{104,105}. De notar que, no caso de complexos formados com os polímeros de maior peso molecular, a presença do PEG também resulta num aumento da viabilidade celular, o que revela ser bastante promissor, principalmente quando conjugado com a atividade de transfeção destas formulações. Para o polímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, a viabilidade celular mantém-se sempre acima dos

80%, tendo-se estabelecido esse valor como o mínimo aceitável, o que não sucedeu no caso dos poliplexos formados a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, sendo que, aqui, se assistiu a um aumento da citotoxicidade com a razão de carga (+/-) polímero/material genético, contudo, a citotoxicidade observada até à razão de carga (+/-) 25/1 é muito reduzida (inferior a 20%). Para além de se reportar um claro efeito benéfico da conjugação dos polímeros com PEG, a comparação com o *gold standard* também mostrou ser interessante, já que a maioria das formulações em estudo apresentaram uma citotoxicidade igual ou inferior à apresentada pelos poliplexos formados a partir da PEI, destacando-se negativamente apenas os complexos formados a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na razão de carga polímero/material genético de 50/1.

De forma análoga ao elaborado para a atividade biológica, o *screening* inicial da citotoxicidade das formulações tinha por objetivo destacar os pares polímero/copolímero com um comportamento que se aproximasse do pretendido. Ora, depois da análise inicial da viabilidade celular após tratamento com os poliplexos formados a partir dos diferentes polímeros, destacaram-se os pares constituídos pelos polímeros de maior peso molecular.

Daqui conclui-se que, neste caso, a presença do PEG não está a produzir os efeitos esperados e observados para outras nanopartículas, o que se poderá dever ao peso molecular do polímero utilizado e às razões de carga dos poliplexos. Provavelmente, o PEG não consegue estabelecer a proteção necessária à minimização de interações entre a parte catiónica e a membrana celular, já que a densidade de cargas positivas é tao grande que a carga superficial dos poliplexos formados a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ não se altera com a presença do polietilenoglicol, conforme se poderá verificar na secção da 3.6 *Caracterização Físico-Química dos poliplexos*, onde não se observam discrepâncias relevantes entre a carga superficial dos poliplexos formados com o homopolímero e o respetivo par formado a partir do copolímero.

Existem evidências que suportam o peso das interações eletrostáticas entre os poliplexos e a membrana celular na citotoxicidade exibida pelos mesmos, no entanto, esta é uma temática que ainda não foi totalmente esclarecida, existindo a possibilidade de, posteriormente ao *uptake* celular, serem ativadas vias intracelulares de transdução de sinal que podem acabar por desempenhar o seu papel na citotoxicidade das nanopartículas poliméricas⁶⁴.

3.3 Citotoxicidade dos polímeros

Com o objetivo de complementar e esclarecer os resultados de citotoxicidade obtidos com os poliplexos, avaliou-se a toxicidade dos polímeros por si só, ou seja, sem a presença de material genético. O procedimento segue o descrito na secção 2. *Materiais e Métodos* e a avaliação baseia-se exatamente nos mesmos princípios que para os poliplexos.

De forma a definir as concentrações utilizadas nestes ensaios, calculou-se a concentração de polímero, existente em cada poço, para cada razão de carga aquando da realização dos ensaios de luminescência e de viabilidade celular, estabelecendo-se um espetro de concentrações do polímero. Através da análise e conjugação dos resultados obtidos tanto nos ensaios de luminescência como de viabilidade celular, consideraram-se os dois pares de homopolímeros e copolímeros de maior peso molecular como as escolhas de maior interesse para utilização como nanossistemas de transporte e entrega de material genético. Desta forma, o ensaio de citotoxicidade dos polímeros incidiu apenas nestas estruturas.

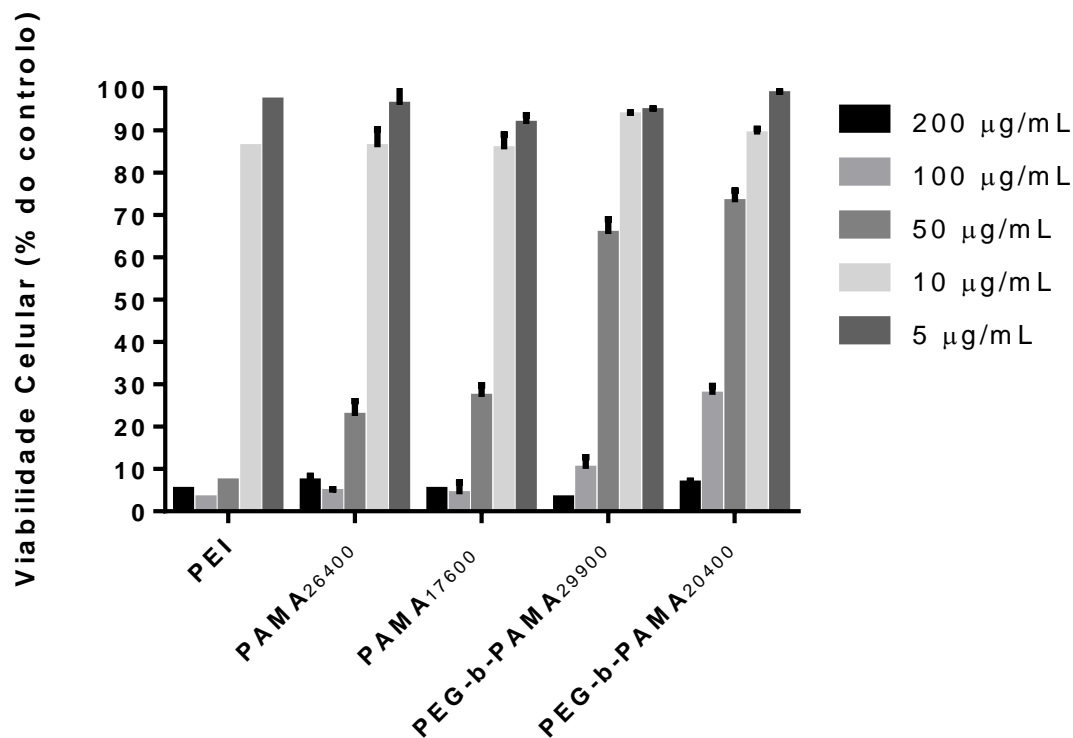


Figura 19- Efeito da concentração dos diferentes polímeros e copolímeros na viabilidade de células COS 7 na presença de soro. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Através da observação do gráfico ilustrado na Figura 19, concluiu-se que o perfil de citotoxicidade dos polímeros aproxima-se do observado para os políplexos, assistindo-se a uma progressiva diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de polímero catiónico, conforme seria de esperar. Até à concentração de 10 µg/mL, todos os polímeros apresentam uma citotoxicidade reduzida (inferior a 20%). A partir desta concentração, o comportamento dos homopolímeros e dos copolímeros difere, já que a citotoxicidade dos primeiros aumenta de forma muito mais acentuada, com a exceção da concentração de polímero de 200 µg/mL, para a qual a morte celular é praticamente total, independentemente do polímero utilizado. Esperar-se-ia que o polímero PAMA₂₆₄₀₀ possuísse uma citotoxicidade superior ao homopolímero de menor peso, PAMA₁₇₆₀₀, possivelmente justificada pelo aumento da quantidade de cargas positivas a interagir com os glicosaminoglicanos celulares¹⁵⁷, levando a uma

consequente desestabilização da membrana e morte celular, não se verificando, no entanto, essa tendência para o espectro de concentrações estudado.

O perfil de citotoxicidade dos copolímeros é diferente do apresentado pelos homopolímeros, o que deverá estar relacionado com a presença do PEG e o efeito que este elemento poderá ter nas interações eletrostáticas entre o polímero catiónico e a membrana celular. Excetuando-se a concentração máxima de copolímero de 200 µg/mL, a citotoxicidade dos copolímeros PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ tem um máximo para o copolímero de maior peso molecular, rondando os 90 % para a concentração de 100 µg/mL. Ainda assim, a presença do polietilenoglicol não mascara por completo o efeito do peso molecular, já que o copolímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ apresenta uma citotoxicidade inferior à do seu homólogo de maior peso molecular. É importante referir que a realização de ensaios de viabilidade celular a seguir a tratamento apenas com polímeros são importantes, de forma a criar o pior cenário possível, já que, de forma geral, a citotoxicidade das formulações diminui aquando da formação de complexos com material genético¹⁵⁸. Os resultados obtidos confirmam esta tendência, já que a concentração de polímero no poço corresponde a aproximadamente 40 µg/mL e 80 µg/mL para os poliplexos formados nas razões de carga de 25/1 e 50/1, respetivamente. Verifica-se, por exemplo, que a citotoxicidade diminui aquando da formação de poliplexos com o homopolímero PAMA₂₆₄₀₀, já que a complexação deste com material genético na razão de carga 50/1 leva a uma concentração de polímero no poço de 80 µg/mL, causando, no entanto, uma morte celular semelhante à obtida após tratamento com o polímero (não complexado) a uma concentração de 50 µg/mL.

Os mecanismos exatos através dos quais os polímeros induzem morte celular não são ainda certos, havendo, no entanto, alguns possíveis indícios. Conforme já foi referido, a biocompatibilidade pode ser afetada por vários fatores, como o peso molecular, a densidade de cargas, estrutura e flexibilidade conformacional^{151,154}, sendo o peso molecular o fator de maior influência dentro de polímeros de igual estrutura, como se verifica neste projeto. O tipo de aminas existentes também pode desempenhar um papel importante na citotoxicidade dos polímeros, estando este parâmetro intimamente ligado ao arranjo tridimensional dos segmentos catiónicos. Apesar de haver a indução de vários mecanismos pro apoptóticos por parte dos poliplexos, existem

estudos indicativos de uma morte necrótica induzida tanto por polímeros catiónicos como por polímeros complexados com material genético¹⁵⁹.

3.4 Capacidade de transfeção das nanopartículas em HepG 2 – Ensaio de Luminescência

Após seleção das formulações mais promissoras com base na conjugação dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e de atividade biológica, complementaram-se os estudos feitos até então com uma análise do comportamento das nanopartículas noutra linha celular. Procederam-se a estudos na linha celular HepG 2 que, como se sabe, está altamente envolvida nos estudos de terapia génica para combate a condições tumorais hepáticas, como o hepatocarcinoma celular (HCC), a segunda maior causa de morte por cancro no mundo¹⁶⁰.

Avaliou-se, então, a capacidade de transfeção e a citotoxicidade das nanopartículas seguindo os mesmos protocolos feitos para a linha celular COS 7, diferindo apenas no facto de não ter sido feito um *screening* inicial, aproveitando-se, ao invés, a informação proveniente dos resultados obtidos anteriormente. Desta forma, testaram-se os políplexos formados a partir dos polímeros e copolímeros de maior peso molecular, agrupando-se os mesmos em pares polímero/copolímero, já que estas foram as formulações com resultados mais promissores na linha celular COS-7.

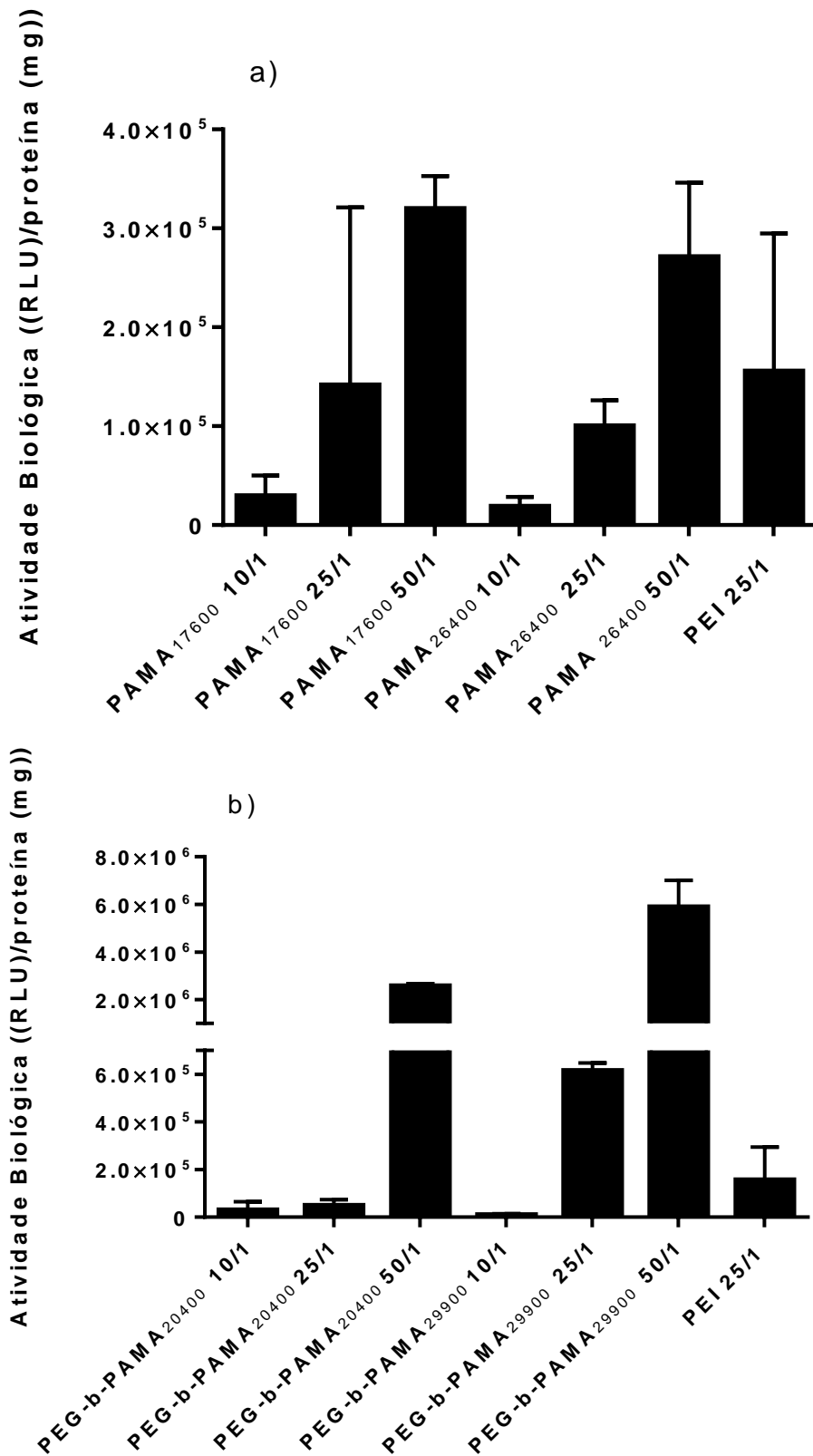


Figura 20- Efeito da razão de carga e da presença do polímero PEG na atividade biológica dos políplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA (a) e dos copolímeros PEG- β -PAMA (b) na linha celular HepG 2 na presença de soro. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são

representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em RLU de luciferase por mg de proteína celular total (média ± desvio padrão, obtida de triplicados).

Pela observação da Figura 20, conclui-se que, de uma forma geral, as nanopartículas em estudo não transfetam a linha celular HepG2 de igual forma à linha celular COS 7, apresentando níveis de atividade biológica inferiores. No caso dos poliplexos formados a partir do homopolímero, reporta-se uma diminuta influência do peso molecular na capacidade de transfeção, não havendo diferenças entre os níveis de atividade biológica das nanopartículas formadas pelos polímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀. No caso destas nanopartículas, sublinha-se ainda uma fraca influência da razão de carga nos níveis de expressão do transgene, não sendo, por isso, considerável.

As nanopartículas formadas a partir dos copolímeros exibem também uma baixa capacidade de transfeção, considerando apenas as razões de carga (+/-) polímero/material genético mais baixas (10/1 e 25/1), ainda assim, os níveis de expressão do transgene aumentam significativamente para os poliplexos formados na razão de carga de 50/1, verificando-se esta característica para as nanopartículas formadas a partir tanto do copolímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ como do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀. Este aumento da expressão do transgene com a razão de carga e, consequentemente, com a quantidade de polímero presente, seria expectável, já que, conforme referido nos ensaios realizados na linha celular COS 7, o aumento da razão de carga promove um aumento da densidade de cargas positivas, o que se pode verificar como um fator indutivo da internalização dos poliplexos. A acentuada presença de cadeias poliméricas livres, como acontece com o aumento da razão de carga (+/-) polímero/material genético, tem efeitos a nível intracelular, conforme já foi referido, já que estas desempenham um papel importante no efeito de esponja de protões responsável pelo escape endossomal do material genético. Para além do efeito induzido pela maior quantidade de polímero catiónico, destaca-se a presença do polímero PEG nas formulações com maior capacidade de transfeção, o que leva à conclusão de que a conjugação com este polímero hidrofílico leva a um aumento da expressão do transgene, o que pode acontecer por via da proteção que este confere face a interações não específicas com proteínas do meio de cultura e à estabilização estérea conferida pelo mesmo^{161,162}.

Fazendo uma análise comparativa entre a atividade biológica das formulações em estudo nas linhas celulares COS 7 e HepG 2, observa-se que, no caso dos poliplexos formados a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, o máximo da expressão do transgene mantém-se na razão de carga (+/-) polímero/material genético 50/1, ao passo que, no caso das nanopartículas originadas a partir do polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, assiste-se a um *shift* do máximo da expressão do gene repórter para a razão de carga (+/-) 50/1. Comparando o comportamento das nanoformulações em cada uma das linhas celulares, chega-se à conclusão que esta movimentação do pico de atividade biológica poder-se-á relacionar com a citotoxicidade dos poliplexos, mostrando esta ser bastante baixa mesmo para as razões de carga mais altas, conforme poderá ser verificado na subsecção seguinte.

De forma a melhor avaliar o comportamento dos nanossistemas nesta linha celular, comparam-se os níveis de expressão do transgene levados a cabo pelos poliplexos em estudo com a atividade biológica das nanopartículas controlo, tendo estas a sua origem no polímero PEI, considerado o *gold standard* dos nanossistemas de transporte e entrega de material genético. Os poliplexos formados a partir dos polímeros PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, apresentam uma capacidade de transfeção que se destaca claramente dos níveis atingidos pelos poliplexos formados a partir do polímero *gold standard*, havendo uma diferença de 16 vezes no primeiro dos casos e de 40 vezes no último.

3.5 Citotoxicidade dos poliplexos na linha celular HepG 2 – Ensaio de viabilidade celular

De forma a selecionar um nanossistema de transporte e entrega de material genético adequado, não se deve apenas dar ênfase à atividade biológica das nanopartículas, mas sim identificar um compromisso entre a eficiência e a sua citotoxicidade, aliando estas às características físico-químicas das nanoformulações, que decidirão o tipo de aplicação mais adequado. Por conseguinte, procedeu-se a uma

avaliação da viabilidade celular da linha HepG 2 na presença de soro após tratamento com os políplexos selecionados, conforme foi feito nos ensaios de luminescência levados a cabo nesta mesma linha celular.

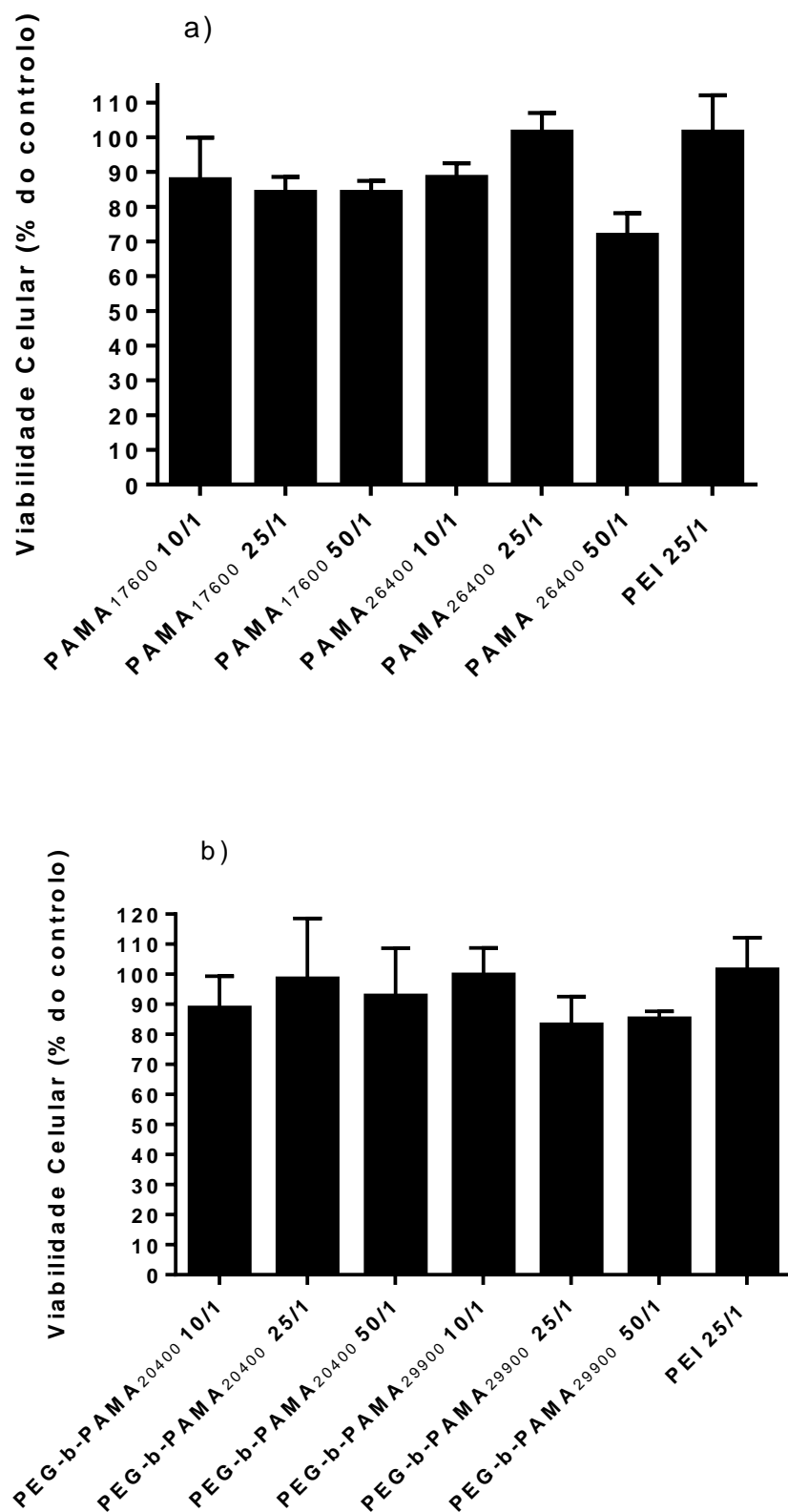


Figura 21- Efeito da presença de soro na viabilidade celular após o tratamento com diversos políplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA (a) e dos copolímeros PEG- β -PAMA (b) na linha celular HepG 2. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácios N/P indicados. O

procedimento experimental segue o descrito na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos na forma de percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células não tratadas) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Como se sabe, a citotoxicidade dos políplexos depende de vários fatores, como por exemplo o peso molecular, a densidade de carga positiva e a estrutura dos polímeros^{151,154}, verificando-se uma maior influência do peso molecular entre polímeros estruturalmente iguais.

Tendo em conta os fatores que pesam para as características citotóxicas dos políplexos, seria de esperar que o aumento do peso molecular ou da razão de carga produzissem efeitos visíveis na viabilidade celular após tratamento com as nanopartículas, já que haveria um aumento das interações eletrostáticas entre o polímero e a membrana celular, fator que se pensa ser indutivo da citotoxicidade dos políplexos¹⁵¹. No entanto, e de uma forma geral, as formulações derivadas dos homopolímeros apresentam uma citotoxicidade reduzida, inferior a 20 %, conforme se pode observar na Figura 21. Ainda assim, os políplexos preparados a partir do polímero PAMA₂₆₄₀₀ na razão de carga (+/-) 50/1 causam uma morte celular de, aproximadamente, 30 %, sendo este o valor mais alto para as formulações preparadas a partir dos homopolímeros. Estes valores poderão advir da influência do maior peso molecular e de uma elevada razão de carga, o que motiva um aumento das interações eletrostáticas entre os polímeros catiónicos e a membrana celular face às restantes nanopartículas derivadas dos homopolímeros.

No que concerna os políplexos formados a partir dos copolímeros, observa-se uma citotoxicidade não superior a 20 % para praticamente todas as nanoformulações, não havendo uma grande variação nos valores dos políplexos formados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀. No caso das nanoformulações originadas a partir do copolímero de maior peso molecular, assiste-se a um ligeiro efeito da razão de carga na viabilidade celular, já que se registou um menor valor de citotoxicidade para os políplexos formados na razão de carga (+/-) de 10/1. Apesar da presença do polietilenoglicol, crê-se que o tamanho do segmento catiónico e a sua quantidade influenciem a viabilidade celular através do nível de desestabilização da membrana celular induzido. No entanto, e ainda que de uma forma bastante ligeira, as formulações derivadas dos copolímeros induzem uma citotoxicidade inferior à dos políplexos

formados a partir dos homopolímeros, conforme seria de esperar pela presença do PEG, já que se espera que este componente mascare parcialmente as cargas positivas das cadeias poliméricas, para além de minimizar interações não específicas com proteínas do soro⁶⁹.

3.6 Caracterização Físico-Química dos poliplexos

Os polímeros catiónicos constituem um dos tipos de vetores não virais mais utilizados na entrega de genes. Uma das principais características destes nanossistemas é a sua versatilidade, já que podem ser adaptados face às aplicações pretendidas. Por vezes, as alterações levadas a cabo nestas estruturas visam a manipulação de determinadas propriedades físico-químicas, de forma a modificar o comportamento destes nanossistemas *in vitro* e *in vivo*. Foram avaliadas algumas características físico-químicas das nanopartículas em estudo ao longo deste projeto, como por exemplo o tamanho dos poliplexos, a sua capacidade de proteção do material genético e a carga superficial, afirmando-se estes como fatores fulcrais para a eficácia dos poliplexos quer *in vitro* quer *in vivo*⁵⁶.

3.6.1 Tamanho e potencial zeta dos poliplexos

O tamanho das nanopartículas analisou-se segundo a técnica de *Dynamic Light Scattering*, conforme elucidado na subsecção *Dynamic Light Scattering e Potencial Zeta* correspondente ao capítulo *Materiais e Métodos*, seguindo-se o protocolo conforme descrito. O diâmetro hidrodinâmico dos poliplexos é uma característica com bastante influência na definição dos mecanismos de *uptake* celular¹⁶³. Além disso, o tamanho das nanopartículas é um fator altamente influenciador do comportamento que os nanossistemas apresentarão *in vivo*, definindo se os poliplexos sairão da circulação ou serão excretados pelo sistema renal¹⁶⁴, bem como o perfil de acumulação das nanopartículas em órgãos como o fígado, baço e medula¹⁶⁵.

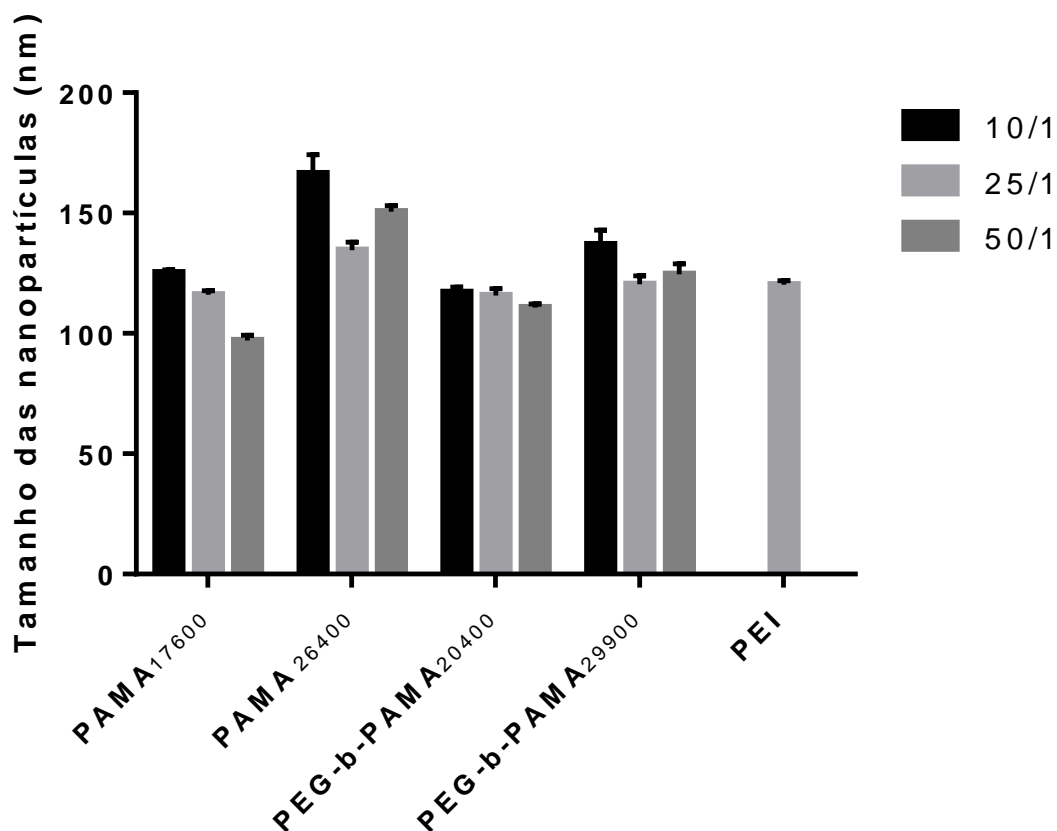


Figura 22- Efeito da razão de carga e da composição dos poliplexos no seu diâmetro médio. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em nanómetros (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Na Figura 22 encontram-se os resultados das medições do DLS, tendo sido analisados os dois pares polímero/copolímero que se tinham destacado nos ensaios anteriores, bem como o tamanho dos poliplexos formados a partir do *gold standard*. Através da análise dos resultados apresentados no gráfico, conclui-se que a razão de carga pode influenciar o tamanho das nanopartículas, verificando-se, na maior parte das formulações, uma ligeira diminuição do diâmetro hidrodinâmico com o aumento da mesma. Esta característica poderá ser explicada pelo aumento das interações eletrostáticas entre o polímero e o material genético, levando, possivelmente, a uma melhor condensação e compactação do mesmo. A influência do PEG nesta característica das nanopartículas é pouco acentuada, já que, dentro de cada par polímero/copolímero, não se assiste a grandes diferenças no tamanho das nanopartículas. Os poliplexos que

se destacaram ao longo deste estudo apresentam tamanhos compreendidos entre os 100 e os 134 nm, o que, face ao tamanho dos complexos formados a partir da PEI na sua razão de carga mais eficaz (120 nm), nos permite concluir que este não será um dos fatores primordiais na justificação das diferenças encontradas não só na capacidade de transfeção dos diferentes nanossistemas, mas também na citotoxicidade.

Para uma aplicação *in vivo*, na corrente sanguínea, pretende-se que os poliplexos permaneçam em circulação durante algum tempo, característica essa que depende também do tamanho dos complexos. Registou-se um tamanho para as nanopartículas selecionadas de entre 100 e 134 nm, característica que, segundo a literatura, oferece melhores garantias para uma circulação prolongada, pois complexos desta ordem de tamanhos já mostraram a capacidade de beneficiar do efeito de permeabilidade e retenção melhorada, bem como de escapar à filtração por parte do fígado e baço¹⁶⁶.

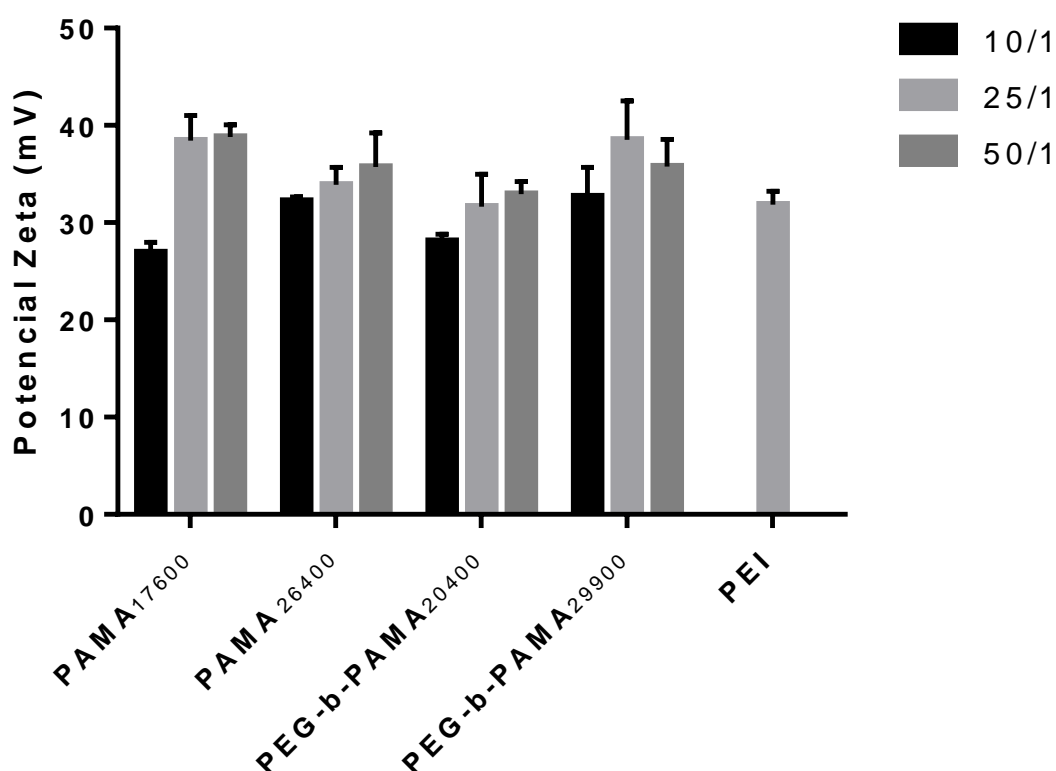


Figura 23- Efeito da razão de carga e da composição dos poliplexos na sua carga superficial. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em miliVolt (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Na Figura 23 encontram-se ilustrados os resultados obtidos para a carga superficial dos poliplexos preparados a partir das formulações poliméricas em destaque, os homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀, os copolímeros PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, e, por fim, o polímero *gold standard*, que serviu de controlo ao longo de todo o projeto.

Os valores obtidos para a carga superficial das formulações encontram-se numa gama de valores entre os 25 e os 40 mV. Com estes resultados, verificou-se que a razão de carga tem uma certa influência nos valores de potencial zeta, assumindo estas duas grandezas uma relação direta, conforme seria de esperar pelo aumento da presença de cadeias poliméricas carregadas positivamente. Ainda assim, este efeito da razão de carga é mais pronunciado na passagem da razão de carga (+/-) polímero/material genético de 10/1 para 25/1, estabilizando, de forma geral, quando se passa para a razão de carga superior (50/1).

Os resultados não mostram grandes diferenças nos valores obtidos entre as formulações que se destacaram nos ensaios de atividade biológica e citotoxicidade, oscilando os potenciais zeta dos nanossistemas que se destacaram ao longo deste projeto entre os 31 e os 38 mV, correspondendo o valor da carga superficial dos poliplexos controlo também a 31 mV. As pequenas diferenças entre estes valores não são justificativas das diferenças obtidas tanto para a capacidade de transfeção como para a citotoxicidade dos diferentes poliplexos.

Através da análise da carga superficial das nanopartículas, seria de esperar que se encontrassem diferenças entre os poliplexos preparados a partir dos copolímeros e dos homopolímeros, já que a presença do PEG poderia de certa forma mascarar as cargas positivas dos segmentos catiónicos. No entanto, não se observou tal efeito, não havendo diferenças significativas entre o potencial zeta dos poliplexos obtidos com os homopolímeros e com os copolímeros. Estes resultados ajudam a esclarecer algumas conclusões obtidas anteriormente, nomeadamente acerca da capacidade de transfeção das nanopartículas com PEG, podendo-se justificar os elevados níveis de expressão do transgene obtidos com essas nanoformulações através da carga superficial das mesmas. Os valores obtidos para o potencial zeta das nanopartículas formadas a partir dos copolímeros vêm sublinhar a ideia já existente de que, face ao peso molecular dos

polímeros em estudo nesta fase, o segmento catiónico prevalece claramente sobre o PEG, algo que já se poderia prever após análise dos resultados da capacidade de transfeção, já que os poliplexos com maior atividade biológica derivam todos de copolímeros e, como se sabe, o PEG pode ter um efeito inibidor da capacidade de transfeção¹¹².

Em termos comparativos, as formulações em estudo apresentam cargas superficiais bastante semelhantes às dos poliplexos preparados a partir do polímero de controlo, o que, mais uma vez, ajuda a concluir que as diferenças na atividade de transfeção e citotoxicidade não dependem apenas das características físico-químicas dos poliplexos.

Conforme já foi referido, a carga superficial positiva dos poliplexos é uma característica altamente relevante para o comportamento destes, já que as interações entre os polímeros e a membrana celular ocorrem por princípios eletrostáticos, ainda para mais, esta característica dos poliplexos provoca uma desestabilização da membrana do endossoma, induzindo eventos de *flip-flop* na membrana deste, processo que também é relevante na libertação do material genético¹⁶⁷.

De forma a complementar os resultados obtidos na caracterização físico-química, avaliou-se também a variação temporal do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas na presença de soro, sendo este um fator que poderá ser bastante limitante no que toca ao *uptake* e estabilidade coloidal das mesmas. Procedeu-se a esta avaliação pois, como se sabe, este projeto visa propor um nanossistema de base polimérica que promova uma entrega eficaz de material genético e que apresente um comportamento adequado *in vivo*, sendo o soro um componente que mimetiza semelhantes condições.

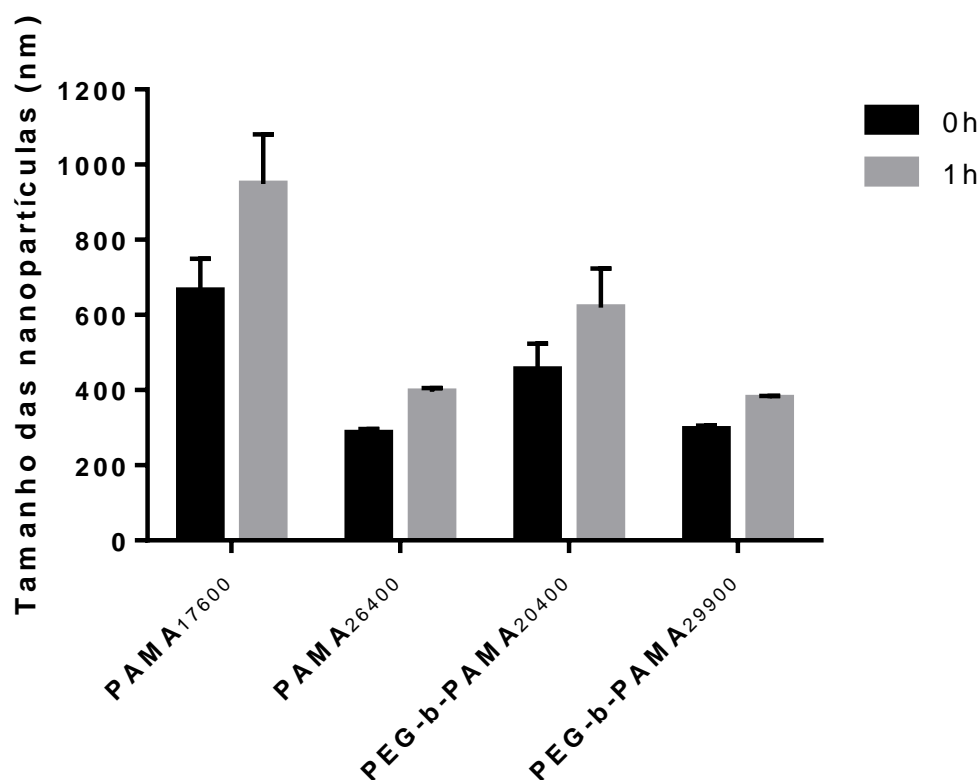


Figura 24- Efeito do tempo no tamanho dos poliplexos preparados a partir do homopolímero PAMA e do copolímero PEG- β -PAMA incubados em soro. Os diferentes polímeros e copolímeros foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção Materiais e Métodos. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em nanómetros (média \pm desvio padrão obtida de triplicados).

Para esta análise escolheram-se apenas as formulações em destaque nas razões de carga para as quais apresentaram melhores resultados, estando os poliplexos formados a partir do par PAMA₁₇₆₀₀ e PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ preparados na razão de carga (N/P) 50/1 e os resultantes do par PAMA₂₆₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na razão de carga (N/P) 25/1.

Através da análise dos resultados apresentados na Figura 24, constata-se um aumento do tamanho das nanopartículas na presença de soro. Como se sabe, as proteínas presentes no soro são carregadas negativamente¹⁶⁸, o que permite o estabelecimento de interações eletrostáticas entre estas e os poliplexos com carga superficial positiva, podendo promover um aumento gradual do tamanho das nanopartículas à medida que vão interagindo com os componentes do soro.

Não se reconhecem grandes diferenças entre o perfil de alteração dos tamanhos das nanopartículas formadas a partir dos homopolímeros e dos copolímeros,

o que se pode justificar com a proximidade dos valores de carga superficial entre os poliplexos em estudo. Ainda assim, os nanossistemas formados a partir do par de menor peso molecular atingem diâmetros hidrodinâmicos bastante superiores em relação ao par de maior peso, o que se pode dever a uma condensação mais pobre do material genético, permitindo maiores alterações dimensionais. No entanto, os resultados exibidos na próxima subsecção ilustram que o polímero PAMA₁₇₆₀₀ protege o DNA de uma forma mais competente que o seu par PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, o que sugere que a acentuada alteração do diâmetro hidrodinâmico dos poliplexos preparados com o homopolímero PAMA₁₇₆₀₀ se possa dever também à ausência do PEG, e logo, provavelmente, maior interação com as proteínas do soro.

É possível estabelecer uma relação entre a estabilidade das nanopartículas na presença de soro e a sua capacidade de transfeção. Dos poliplexos para os quais se analisaram os tamanhos em função do tempo, na presença de soro reconhece-se uma menor capacidade de transfeção para as nanopartículas formadas a partir do polímero PAMA₁₇₆₀₀, o que poderá advir da sua menor estabilidade na presença de soro, já que, com o passar do tempo, o volume destes poliplexos atinge valores que poderão ser impeditivos de um *uptake* celular via endocitose¹⁶⁹. Para além disso, a sua menor estabilidade na presença de soro poderá resultar na descomplexação e libertação prematuras do DNA.

3.6.2 Proteção e condensação do material genético

A formação de complexos entre os polímeros catiónicos e o material genético ocorre por via de interações eletrostáticas estabelecidas entre os grupos amina presentes nos polímeros e os grupos fosfato constituintes do DNA. A formação de poliplexos permite, potencialmente, estabelecer proteção face à degradação do material genético por ação enzimática e induzir a libertação do DNA nos locais corretos¹⁷⁰. A avaliação da capacidade de proteção do DNA dos polímeros em estudo foi feita de forma a não só completar o estudo das características físico-químicas das nanopartículas, mas também para permitir aprimorar as conclusões retiradas acerca do possível comportamento dos poliplexos *in vitro* e *in vivo*. Para este estudo, recorreram-se a dois ensaios: ensaio de intercalação do brometo de etídio e ensaio de eletroforese

em gel de agarose, seguindo os dois o procedimento descrito na secção dos *2 Materiais e Métodos*.

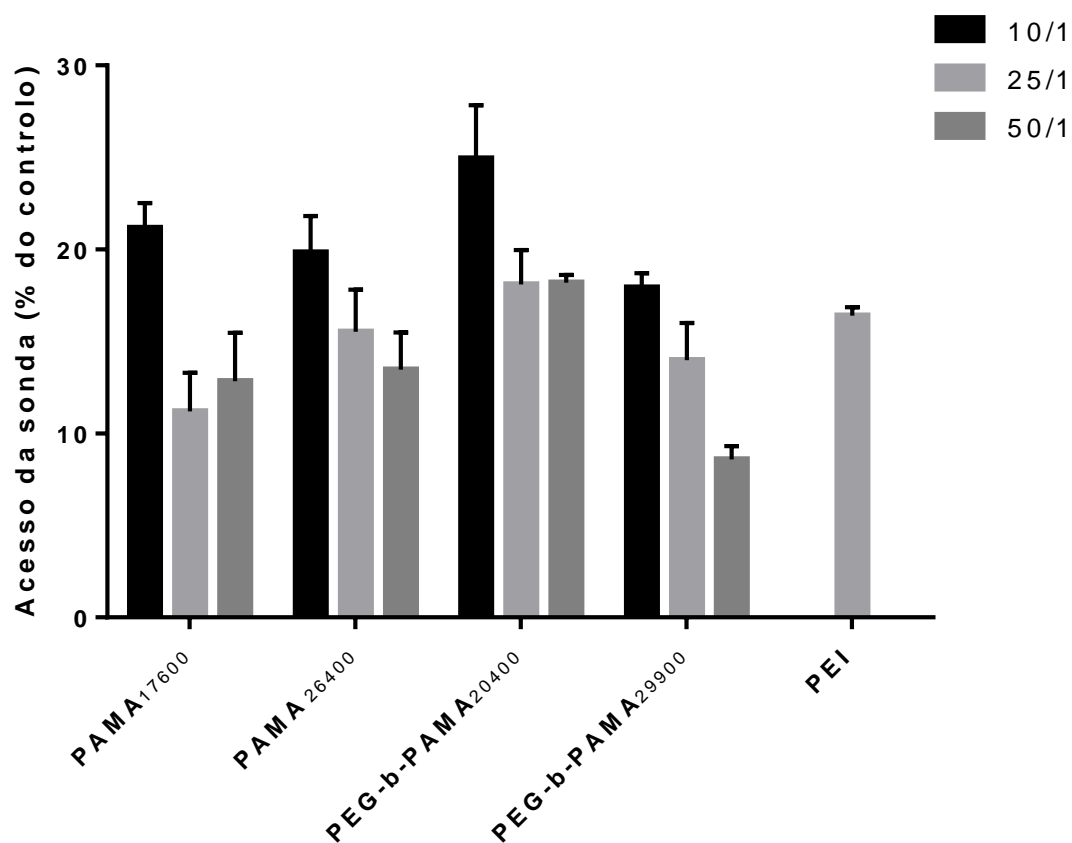


Figura 25-Acesso do brometo de etídio ao material genético das nanopartículas preparadas a partir dos homopolímeros PAMA e dos copolímeros PEG- β -PAMA em diferentes razões de carga polímero/material genético. Os diferentes polímeros foram complexados com $1\mu\text{g}$ de pCMV.Luc nos três rácios N/P indicados. O procedimento experimental segue o descrito na secção *Materiais e Métodos*. Os resultados são representativos de pelo menos 3 ensaios independentes. Os dados encontram-se expressos em percentagem relativamente a um controlo positivo (correspondente ao acesso da sonda a material genético não protegido) (média \pm desvio padrão, obtida de triplicados).

Na Figura 25 encontram-se ilustrados os resultados obtidos no ensaio de intercalação do brometo de etídio. Avaliou-se a capacidade de condensação de DNA dos poliplexos formados a partir dos homopolímeros e copolímeros em três razões de carga, sendo os resultados comparados com os obtidos para os poliplexos controlo, derivados do polímero PEI. A capacidade de proteção de um polímero está intimamente relacionada com a sua estrutura devido, por exemplo, à influência que os resíduos catiónicos têm na formação dos poliplexos¹¹³.

De uma forma geral, não se registam diferenças de grande relevo na proteção conferida pelos polímeros ao material genético, estando o acesso da sonda confinado, aproximadamente, entre os 10 e os 20 %, sendo estes valores adequados, já que se pretende um compromisso entre uma proteção competente e uma libertação eficaz do material genético. Destaca-se uma natural influência da razão de carga nos resultados obtidos, já que com o seu incremento, aumenta-se o número dos resíduos catiónicos presentes, levando, na maior parte das formulações, a uma melhor proteção do material genético, conforme se pode averiguar pela observação da Figura 25.

Nos ensaios anteriores de atividade biológica e citotoxicidade, destacaram-se os pares polímero/copolímero PAMA₁₇₆₀₀/PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀/PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ nas razões de carga (+/-) 50/1 e 25/1, respetivamente, estando os valores de proteção conferida por estes polímeros numa gama muito próxima, situando-se acima dos 80 %. Comparando com os resultados obtidos para os poliplexos preparados a partir do polímero *gold standard*, não se registam grandes diferenças, principalmente olhando para a razão de carga (+/-) 25/1 – estabelecida como a razão de carga com maior eficácia de transfeção. Através desta proximidade de valores entre os nanossistemas que se destacaram, é possível inferir que as diferenças nos seus comportamentos *in vitro* não poderão ser explicadas recorrendo maioritariamente a argumentos de proteção do material genético. É importante salientar ainda que a presença do polietilenoglicol não revelou uma influência crucial nos resultados obtidos, não havendo, na maior parte dos casos, diferenças significativas entre a condensação de DNA conferida pelos poliplexos derivados dos homopolímeros e dos copolímeros.

Como complemento ao ensaio de intercalação do brometo de etídio, avaliou-se a condensação dos polímeros recorrendo a um ensaio de eletroforese em gel de agarose, encontrando-se os resultados obtidos ilustrados na Figura 26.

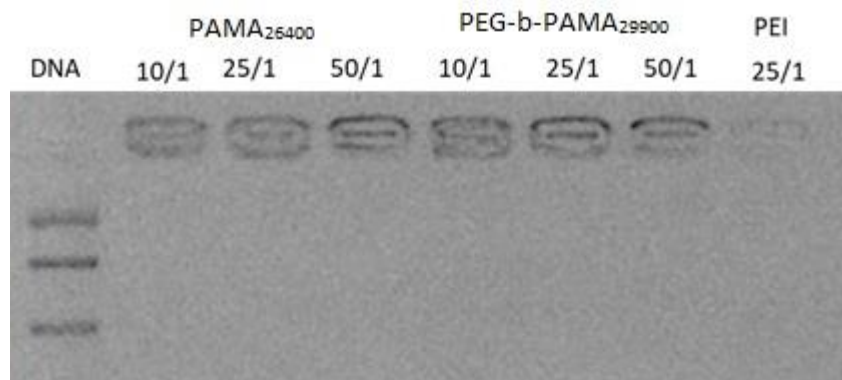


Figura 26-Resultados de ensaio de gel em agarose para as formulações selecionadas. O homopolímero PAMA₂₆₄₀₀ e o copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ foram ambos complexados com 1 µg de pCMV.Luc nas três razões de carga indicadas. Utilizou-se DNA livre e poliplexos preparados a partir do polímero PEI como controlo para este ensaio. O procedimento seguiu de acordo com o descrito na secção Materiais e Métodos.

A técnica da eletroforese em gel de agarose baseia-se na ação de um campo elétrico e consequente migração do material genético carregado negativamente para o pólo positivo. Consequentemente, se houver uma condensação eficaz do DNA por parte do polímero, haverá uma menor migração do material genético. Escolheu-se o par homopolímero/copolímero PAMA₂₆₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, correspondente à formulação mais promissora, para realizar este ensaio, e recorreu-se aos poliplexos controlo formados a partir do polímero *gold standard* para comparação.

Corroborando os resultados obtidos no ensaio de intercalação do brometo de etídio, o ensaio em gel de agarose mostrou uma complexação eficaz do material genético com o polímero, já que não se observa migração das bandas. Comparando a intensidade das bandas do DNA livre (controlo), conclui-se que esta é superior à das bandas referentes aos poliplexos, sendo este mais um indicador de uma boa condensação e consequente proteção do material genético por parte dos polímeros em estudo.

4 Conclusão e Perspetivas Futuras

4.1 Conclusão

As diferentes técnicas de terapia génica têm como objetivo o tratamento/cura de um grande leque de condições patológicas de origem genética, hereditárias e/ou adquiridas. O objetivo desta técnica é a expressão estável e segura de um gene de interesse num determinado tecido. É, então, de importância primordial, desenvolver sistemas capazes de transportar e entregar o material genético de uma forma eficaz e segura às células alvo.

Com o desenvolvimento das técnicas de síntese química e biotecnologia, iniciou-se a utilização de polímeros como vetores de transporte e entrega de material genético. Estes sistemas possuem algumas características vantajosas, como por exemplo a versatilidade, já que permitem a manipulação da sua estrutura físico-química consoante a aplicação desejada; a grande capacidade de condensação/transporte de material genético; e a biocompatibilidade. Juntando estas características a uma fácil produção, estes vetores assumem um potencial enorme no contexto de transporte e entrega de material genético, não obstante o facto de ainda apresentarem algumas limitações.

Com o trabalho desenvolvido neste projeto, pretendeu-se avaliar a influência das propriedades físico-químicas de uma família de polímeros, bem como de modificações na sua estrutura, através da conjugação com o polímero hidrofílico polietilenoglicol, na sua capacidade de transfeção. Com este propósito, os diferentes ensaios foram executados na ausência e presença de soro, sendo este um constituinte capaz de mimetizar parcialmente as condições que os nanossistemas encontram quando administrados *in vivo*.

Os resultados obtidos demonstraram que, tanto na ausência como na presença de soro, a atividade biológica dos polímeros PAMA e copolímeros PEG-b-PAMA depende do seu peso molecular e da razão de carga na qual são formados os poliplexos.

Na ausência de soro, destacou-se a expressão do transgene levada a cabo com os poliplexos preparados a partir dos homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀ nas

razões de carga de (+/-) 10/1, para o primeiro, e (+/-) 10/1 e (+/-) 25/1, para o último, superiorizando-se estes valores aos obtidos com os poliplexos controlo. Para as mesmas condições, e de forma geral, os poliplexos preparados a partir dos copolímeros mostraram uma capacidade de transfeção inferior aos anteriores, destacando-se apenas o polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ complexado com material genético na razão de carga (+/-) 10/1.

Os ensaios realizados na presença de soro mostraram uma alteração no perfil da capacidade de transfeção dos diferentes poliplexos, aumentando, de forma geral, este parâmetro com a razão de carga dos poliplexos, ao contrário do sucedido na ausência de soro. Na presença de soro, verificaram-se maiores níveis de expressão do transgene para poliplexos formados a partir de polímeros e copolímeros de maior peso molecular. No caso dos poliplexos formados a partir dos homopolímeros, a presença de soro levou à obtenção de níveis superiores de transfeção para algumas formulações, tendo-se destacado os polímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀ complexados com material genético nas razões de carga (+/-) 50/1, no primeiro caso, e (+/-) 25/1 e (+/-) 50/1, no último, exibindo estas nanopartículas uma atividade biológica muito superior à dos poliplexos controlo, formados a partir do polímero *gold standard*.

No caso das nanopartículas formadas a partir dos copolímeros, a presença de soro também promoveu melhorias significativas na sua atividade biológica, aumentando a expressão do transgene para todos os poliplexos com capacidade de transfeção na ausência de soro, excetuando-se as nanopartículas preparadas a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na razão de carga de 10/1, para as quais a atividade biológica na ausência de soro é superior. Destacaram-se as nanopartículas formadas a partir dos copolímeros PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ nas razões de carga de 50/1 e 25/1, respetivamente, tendo estas apresentado níveis de expressão do transgene 204 e 349 vezes superiores, respetivamente, ao dos poliplexos formados a partir da PEI.

A análise da citotoxicidade dos poliplexos foi também levada a cabo tanto na ausência como na presença de soro, de forma a complementar os resultados obtidos para a atividade biológica das nanopartículas. Na ausência de soro, verificou-se uma grande influência da razão de carga na citotoxicidade dos poliplexos formados a partir dos diferentes homopolímeros e copolímeros. No caso dos homopolímeros, observou-se alguma influência do peso molecular, notando-se apenas claras diferenças entre os

poliPLEXOS preparados nas razões de carga mais altas com o polímero PAMA₆₃₀₀ e os restantes polímeros, registando-se um aumento da citotoxicidade para os polímeros de maior peso molecular. Entre os homopolímeros PAMA₁₇₆₀₀ e PAMA₂₆₄₀₀ não há diferenças significativas, mantendo-se o aumento da citotoxicidade com a razão de carga para os dois casos. A presença de soro induziu uma diminuição substancial da citotoxicidade dos poliPLEXOS preparados a partir dos homopolímeros. No entanto, de uma maneira geral, registou-se um aumento da citotoxicidade com o peso molecular dos polímeros, sendo a única exceção os poliPLEXOS preparados a partir do homopolímero PAMA₂₆₄₀₀ na razão de carga (+/-) de 10/1.

A citotoxicidade dos poliPLEXOS preparados a partir dos copolímeros, para além de influenciada pela razão de carga dos nanossistemas, mostrou também aumentar com o peso molecular dos copolímeros utilizados na transfeção na ausência de soro. Analogamente aos homopolímeros, a presença de soro resultou num aumento significativo da viabilidade celular após tratamento com os diferentes poliPLEXOS formados a partir dos copolímeros. Além disso, a presença do PEG mascarou o efeito da razão de carga dos nanossistemas preparados a partir dos copolímeros PEG-b-PAMA₈₆₀₀ e PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀, prevalecendo apenas o efeito do peso molecular na citotoxicidade dos poliPLEXOS. No caso das nanoformulações copoliméricas de maior peso molecular, o PEG não mascarou o efeito da razão de carga, registando-se um aumento da citotoxicidade das nanopartículas com a mesma. À exceção dos poliPLEXOS preparados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na razão de carga 50/1, todas as restantes formulações apresentaram uma citotoxicidade semelhante ou inferior à dos nanossistemas controlo preparados a partir do polímero PEI.

A análise da citotoxicidade dos polímeros sem a formação de complexos com material genético trouxe resultados concordantes com a análise da citotoxicidade dos poliPLEXOS, já que um aumento da concentração de polímero resultou num aumento da citotoxicidade, verificando-se esta condição para todos os casos. Ainda assim, existe alguma disparidade entre os valores obtidos para os homopolímeros e os copolímeros, mostrando-se os copolímeros muito menos citotóxicos. Considerando os homopolímeros, um aumento do peso molecular potencia a citotoxicidade dos mesmos, conduzindo o polímero PAMA₂₆₄₀₀ a níveis de aproximadamente 100 % de morte celular no máximo de concentração estudado. No caso dos copolímeros, a presença do PEG

resulta numa diminuição da citotoxicidade dos mesmos, excetuando-se a concentração de 200 µg/ mL, para a qual a morte celular é total, havendo, no entanto, um aumento da citotoxicidade com a concentração de polímero e com o peso molecular do mesmo, conforme esperado.

As formulações selecionadas após o *screening* inicial foram depois estudadas numa linha celular humana, recorrendo-se, para o efeito, à linha celular HepG 2. O estudo da atividade biológica nesta linha celular foi feito na presença de soro, revelando que algumas das formulações em estudo são capazes de induzir níveis bastante altos de expressão do transgene. Registou-se, em primeiro lugar, uma grande diferença entre os resultados obtidos para os poliplexos formados a partir dos homopolímeros e dos copolímeros, registando-se uma reduzida capacidade de transfeção para os primeiros. Verificou-se, ainda assim, uma ligeira influência da razão de carga na atividade biológica dos poliplexos preparados com os homopolímeros.

As nanopartículas formadas a partir dos copolímeros induziram níveis de expressão do transgene bastante elevados nas células HepG 2, ainda que ligeiramente inferiores aos obtidos na linha celular COS 7. Constatou-se um aumento da capacidade de transfeção com o aumento do peso molecular, sendo estes dados particularmente visíveis nas razões de carga 25/1 e 50/1, para as quais a capacidade de transfeção dos complexos formados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ é bastante superior à dos complexos formados a partir do copolímero PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀. Os poliplexos referidos destacaram-se claramente em relação à formulação controlo, levando a níveis de expressão do transgene 40 vezes superiores, no caso dos poliplexos preparados com o polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ na razão de carga (+/-) 50/1.

A citotoxicidade dos poliplexos nesta linha celular não mostrou dependência do peso molecular dos polímeros ou da razão de carga dos poliplexos tanto para os homopolímeros como para os copolímeros. Globalmente, os níveis de citotoxicidade obtidos foram bastante reduzidos, principalmente tendo em conta as formulações que levaram aos maiores níveis de expressão do transgene, registando-se, para estas, uma citotoxicidade inferior a 20 %. O facto das nanopartículas apresentarem uma citotoxicidade bastante reduzida nesta linha celular pode justificar parcialmente o *shift* que se verificou no máximo de transfeção do copolímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ para a razão de carga (+/-) 50/1.

A caracterização físico-química das nanopartículas não mostrou grandes diferenças entre as várias formulações. A nível de tamanho, os nanossistemas apresentaram resultados muito próximos, situando-se entre os 97 e os 166 nm, sendo estes valores adequados para aplicações *in vivo*. O potencial zeta assumiu os valores positivos esperados, encontrando-se estes entre os 30 e os 40 mV para as nanopartículas com melhores resultados de atividade biológica. Aquando da avaliação da variação do tamanho das nanopartículas com o tempo, na presença de soro, observou-se que os poliplexos formados a partir do polímero PAMA₁₇₆₀₀ sofrem as maiores alterações para esta grandeza, o que pode justificar o facto de não levarem a níveis de expressão do transgene tão bons como as restantes nanopartículas em destaque.

Os ensaios de exclusão de brometo de etídio indicaram que os polímeros têm uma capacidade de proteção do material genético bastante boa, estando o acesso da sonda compreendido entre os 8 e os 18 % para as formulações com elevada capacidade de transfeção e citotoxicidade reduzida, correspondendo o valor mais baixo ao polímero PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀, não existindo grandes diferenças entre a presença e a ausência de PEG.

Com o objetivo de complementar os resultados obtidos nos ensaios de exclusão do brometo de etídio, os ensaios de gel em agarose revelaram uma condensação eficiente do material genético por parte das nanoformulações em destaque, não se evidenciando diferenças de relevo através da conjugação com polietilenoglicol.

Os resultados obtidos ao longo deste projeto permitiram identificar alguns fatores que influenciam a capacidade de transporte e entrega de material genético dos poliplexos, bem como o seu comportamento a nível de citotoxicidade. O peso molecular dos polímeros mostrou ser relevante, destacando-se, também, a razão de carga de complexação dos mesmos com o material genético. A modificação estrutural do polímero, através da conjugação com o polietilenoglicol, trouxe melhorias a nível da capacidade de transfeção e de viabilidade celular após tratamento com as nanopartículas, na presença de soro, podendo estas melhorias estar relacionadas com fatores estruturais/conformacionais das nanopartículas, visto que a sua caracterização físico-química não mostrou grandes diferenças a nível de carga superficial, tamanho e

capacidade de proteção do material genético. Em concordância com alguma literatura, existe também a possibilidade de melhorias na capacidade de transfeção de algumas nanopartículas através da interação com constituintes do soro, seja através de mudanças conformacionais, redução da carga superficial, ou até interação com recetores celulares específicos. As nanopartículas conjugadas com PEG apresentaram claras melhorias nos níveis de capacidade de transfeção na presença de soro.

Por fim, e apesar da necessidade de aprofundar estes estudos, as nanopartículas aqui avaliadas mostram claras capacidades para superar os diferentes obstáculos aquando do transporte e entrega de material genético *in vitro*, mostrando, inclusive, níveis bastante bons de biocompatibilidade, demonstrando o seu potencial para aplicação *in vivo*.

4.2 Perspetivas Futuras

Através do trabalho desenvolvido ao longo deste projeto, destacaram-se as nanopartículas preparadas com os copolímeros PEG-b-PAMA₂₀₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₉₉₀₀ nas razões de carga (+/-) de 50/1 e 25/1, respetivamente. Assim sendo, as propostas de trabalho futuro compreendem apenas a utilização destes nanossistemas:

- Estudo dos mecanismos de endocitose, podendo estes esclarecer o comportamento das nanopartículas e identificar possíveis barreiras à sua utilização como vetores de transporte e entrega de material genético;
- Conjugação com o PEG de forma não covalente (por adsorção, por exemplo), para permitir verificar se existirão diferenças a nível físico-químico e consequentes melhorias na capacidade de transfeção e níveis de citotoxicidade dos políplexos, ultrapassando o fator peso do polímero catiónico;
- Análise aprofundada da influência dos componentes do soro *in vitro*, permitindo inferir em que medida estes influenciam a transfeção, através de, por exemplo, realização de transfeções com diferentes teores de albumina;
- Garantir a especificidade das nanopartículas através da conjugação com ligandos à superfície dos políplexos;

- Estudar a entrega de material genético promovida por estas nanopartículas em modelos animais de cancro, sendo a administração feita por via intravenosa ou injeção intratumoral. Caso os resultados sejam positivos, poder-se-á, então, avaliar estas nanopartículas num enquadramento de terapia génica com fins anti tumorais, também *in vivo*.

5 Referências

1. Moss JA. Gene therapy review. *Radiol Technol.* 2014;86(2):155-80-4. doi:10.1038/nrmicro2882.
2. Ibraheem D, Elaissari A, Fessi H. Gene therapy and DNA delivery systems. *Int J Pharm.* 2014;459(1-2):70-83. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.041.
3. Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene.* 2013;525(2):162-169. doi:10.1016/j.gene.2013.03.137.
4. Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science (80-).* 1972;175(4025):949-955.
5. Press J, Klinman N. Brief Definitive Reports. *J Exp Med.* 1973;138:300-305. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2190499/>.
6. Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, Rogers S. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Zeitschrift f??r Kinderheilkd.* 1975;119(1):1-3. doi:10.1007/BF00464689.
7. Mercola KE, Bar-Eli M, Stang HD, Slamon DJ, Cline MJ. Insertion of new genetic information into bone marrow cells of mice: comparison of two selectable genes. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;397(1):272-280.
8. Beutler E. the Cline Affair. *Mol Ther.* 2001;4(5):396-397. doi:10.1006/mthe.2001.0486.
9. Mercola KE, Stang HD, Browne J, Salser W, Cline MJ. Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science.* 1980;208(4447):1033-1035. doi:10.1126/science.6246577.
10. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA Δ - Δ SCID : Initial Trial Results After 4 Years Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2889066> JSTOR is a not-for-profit service that helps s. 2016.
11. Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, et al. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients. *Science.* 1995;270(5235):470-475. doi:10.1126/science.270.5235.470.

12. Stolberg SG. The biotech death of Jesse Gelsinger. *N Y Times Mag.* 1999:136-140, 149-150.
13. Maguire AM, High KA, Auricchio A, et al. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 2009;374(9701):1597-1605. doi:10.1016/S0140-6736(09)61836-5.
14. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human [bgr]-thalassaemia. *Nature.* 2010;467(7313):318-322.
15. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID). *Circulation.* 2011:CIRCULATIONAHA-111.
16. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2010;363(4):355-364.
17. Peng Z. Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Hum Gene Ther.* 2005;16(9):1016-1027. doi:10.1089/hum.2005.16.1016.
18. Wilson JM. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther.* 2005;16(9):1014-1015. doi:10.1089/hum.2005.16.1014.
19. Wirth T, Samaranyake H, Pikkarainen J, Määttä AM, Ylä-Herttua S. Clinical trials for glioblastoma multiforme using adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11(5):485-492.
20. Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs.* 2000;60(2):249-271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983732>.
21. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(1):46-60. doi:10.2174/1389201011314010008.
22. Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet.* 2000;1(2):91-99.
23. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Publ Gr.* 2014;15(8):541-555. doi:10.1038/nrg3763.
24. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral

- vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-358. doi:10.1038/nrg1066.
25. Munier S, Messai I, Delair T, Verrier B, Ataman-Önal Y. Cationic PLA nanoparticles for DNA delivery: comparison of three surface polycations for DNA binding, protection and transfection properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2005;43(3):163-173.
 26. Templeton NS. Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo. *Biosci Rep.* 2002;22(2):283-295.
 27. Nagasaki T, Shinkai S. The concept of molecular machinery is useful for design of stimuli-responsive gene delivery systems in the mammalian cell. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2007;58(3-4):205-219.
 28. Lundstrom K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* 2003;21(3):117-122. doi:10.1016/S0167-7799(02)00042-2.
 29. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol.* 2011;29(2):121-129.
 30. Huang S, Kamihira M. Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):208-223.
 31. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 2001;7(1):33-40. doi:10.1038/83324.
 32. Hospital G, Street T, Gard T, Hoge EA, Kerr C. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. 2015;6(2):356-372. doi:10.1007/s12671-013-0269-8.Moving.
 33. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacol Ther.* 1998;80(1):35-47. doi:10.1016/S0163-7258(98)00020-5.
 34. Leen AM, Christin A, Khalil M, et al. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *J Virol.* 2008;82(1):546-554.
 35. Miao CH, Nakai H, Thompson AR, et al. Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol.* 2000;74(8):3793-3803.
 36. Lentz TB, Gray SJ, Samulski RJ. Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiol Dis.* 2012;48(2):179-188. doi:10.1016/j.nbd.2011.09.014.

37. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol.* 1990;10(8):4239-4242.
38. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-nelli L, Pistello M. Viral vectors : a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microb.* 2013;(May 2014):1-22.
39. Vigna E, Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med.* 2000;2(5):308-316.
40. Goodwin T, Huang L. Nonviral Vectors: We Have Come a Long Way. *Adv Genet.* 2014;88:1-12. doi:10.1016/B978-0-12-800148-6.00001-8.
41. Lam AP, Dean DA. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther.* 2010;17:439. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2010.31>.
42. Miller AM, Dean DA. Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(7):603-613.
43. Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, et al. Gene delivery to embryonic stem cells. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* 2005;75(1):10-18.
44. Mellott AJ, Forrest ML, Detamore MS. Physical non-viral gene delivery methods for tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2013;41(3):446-468. doi:10.1007/s10439-012-0678-1.
45. Song L, Chau L, Sakamoto Y, Nakashima J, Koide M, Tuan RS. Electric field-induced molecular vibration for noninvasive, high-efficiency DNA transfection. *Mol Ther.* 2004;9(4):607-616.
46. Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics.* 2014;4(3):240-255. doi:10.7150/thno.6914.
47. Pinchon C, Billiet L, Midoux P. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. 2010:640-645.
48. Cao X, Deng W, Wei Y, et al. Encapsulation of plasmid DNA in calcium phosphate nanoparticles: stem cell uptake and gene transfer efficiency. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:3335.
49. Hu J, Kovtun A, Tomaszewski A, et al. A new tool for the transfection of corneal

- endothelial cells: calcium phosphate nanoparticles. *Acta Biomater.* 2012;8(3):1156-1163.
50. Sokolova V V, Radtke I, Heumann R, Epple M. Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials.* 2006;27(16):3147-3153.
 51. Pedraza CE, Bassett DC, McKee MD, Nelea V, Gbureck U, Barralet JE. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials.* 2008;29(23):3384-3392.
 52. Chesnoy S, Huang L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000;29(1):27-47.
 53. Tang F, Hughes JA. Introduction of a disulfide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242(1):141-145.
 54. Liu F, Qi H, Huang L, Liu D. Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther.* 1997;4(6).
 55. Duarte S, Faneca H, Pedroso de Lima MC. Folate-associated lipoplexes mediate efficient gene delivery and potent antitumoral activity in vitro and in vivo. *Int J Pharm.* 2011;423:365-377.
 56. Petros RA, Desimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615-627. doi:10.1038/nrd2591.
 57. Pires P, Simões S, Nir S, Gaspar R, Düzgünes N, de Lima MCP. Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes.* 1999;1418(1):71-84.
 58. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem.* 1995;270(32):18997-19007.
 59. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release.* 2006;114(1):100-109.
 60. A. Cordeiro R, Santo D, Farinha D, Serra A, Faneca H, F. J. Coelho J. High transfection efficiency promoted by tailor-made cationic tri-block copolymer-based nanoparticles. *Acta Biomater.* 2016;47:113-123.

61. Dincer S, Türk M, Pişkin E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther.* 2005;12:S139-S145.
62. Cordeiro RA. Development of non-viral vectors based on poly(B-amino ester) segments for gene delivery. 2015.
63. Liu Z, Zhang Z, Zhou C, Jiao Y. Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Prog Polym Sci.* 2010;35(9):1144-1162.
64. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* 2003;24(7):1121-1131.
65. B. Liechty W, A. Peppas N. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;80:241-246.
66. Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res.* 2006;23(7):1417-1450.
67. Davis ME, Shin DM. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(9):771-782.
68. Benjaminsen R V., Matthebjerg MA, Henriksen JR, Moghimi SM, Andresen TL. The possible "proton sponge " effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Mol Ther.* 2013;21(1):149-157. doi:10.1038/mt.2012.185.
69. Patnaik S, Gupta KC. Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for in vivo gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(2):215-228. doi:10.1517/17425247.2013.744964.
70. Wightman L, Kircheis R, Rössler V, et al. Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo. *J Gene Med.* 2001;3(4):362-372.
71. Goula D, Remy JS, Erbacher P, et al. Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Ther.* 1998;5(5):712-717.
72. Campeau P, Chapdelaine P, Seigneurin-Venin S, Massie B, Tremblay JP. Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther.* 2001;8(18):1387.
73. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer H-P, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA

- delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res.* 1999;16(8):1273-1279.
74. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethyleneimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res.* 1999;45(3):268-275.
 75. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta M, Antoniet, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(16):7297-7301.
 76. Ward CM, Read ML, Seymour LW. Systemic circulation of poly (L-lysine)/DNA vectors is influenced by polycation molecular weight and type of DNA: differential circulation in mice and rats and the implications for human gene therapy. *Blood.* 2001;97(8):2221-2229.
 77. Guo J, Cheng WP, Gu J, et al. Systemic delivery of therapeutic small interfering RNA using a pH-triggered amphiphilic poly-L-lysine nanocarrier to suppress prostate cancer growth in mice. *Eur J Pharm Sci.* 2012;45(5):521-532.
 78. Merdan T, Kopeček J, Kissel T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(5):715-758.
 79. Akinc A, Langer R. Measuring the pH environment of DNA delivered using nonviral vectors: implications for lysosomal trafficking. *Biotechnol Bioeng.* 2002;78(5):503-508.
 80. Cordeiro RA, Farinha D, Rocha N, Serra AC, Faneca H, Coelho JFJ. Novel cationic triblock copolymer of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-block-poly(β -amino ester)-block-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]: A promising non-viral gene delivery system. *Macromol Biosci.* 2015;15(2):215-228. doi:10.1002/mabi.201400424.
 81. Agarwal S, Zhang Y, Maji S, Greiner A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater Today.* 2012;15(9):388-393. doi:10.1016/S1369-7021(12)70165-7.
 82. Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Devi MP, Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *Int J Biol Macromol.* 2011;48(2):234-238.
 83. Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes.* 2001;1514(1):51-64.

84. Chen X-G, Park H-J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydr Polym.* 2003;53(4):355-359.
85. Gao Y, Xu Z, Chen S, Gu W, Chen L, Li Y. Arginine-chitosan/DNA self-assemble nanoparticles for gene delivery: In vitro characteristics and transfection efficiency. *Int J Pharm.* 2008;359(1):241-246.
86. Germershaus O, Mao S, Sitterberg J, Bakowsky U, Kissel T. Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethylenglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: establishment of structure–activity relationships in vitro. *J Control Release.* 2008;125(2):145-154.
87. Lynn DM, Langer R. Degradable poly (β -amino esters): synthesis, characterization, and self-assembly with plasmid DNA. *J Am Chem Soc.* 2000;122(44):10761-10768.
88. Anderson DG, Akinc A, Hossain N, Langer R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly (β -amino esters). *Mol Ther.* 2005;11(3):426-434.
89. Devalapally H, Shenoy D, Little S, Langer R, Amiji M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59(4):477-484. doi:10.1007/s00280-006-0287-5.
90. Lynn DM, Amiji MM, Langer R. pH-responsive polymer microspheres: Rapid release of encapsulated material within the range of intracellular pH. *Angew Chemie Int Ed.* 2001;40(9):1707-1710.
91. Lynn DM, Anderson DG, Putnam D, Langer R. Accelerated discovery of synthetic transfection vectors: parallel synthesis and screening of a degradable polymer library. *J Am Chem Soc.* 2001;123(33):8155-8156.
92. Bishop CJ, Ketola T-M, Tzeng SY, et al. The effect and role of carbon atoms in poly (β -amino ester) s for DNA binding and gene delivery. *J Am Chem Soc.* 2013;135(18):6951-6957.
93. He L, Read ES, Armes SP, Adams DJ. Direct synthesis of controlled-structure primary amine-based methacrylic polymers by living radical polymerization. *Macromolecules.* 2007;40(13):4429-4438.
94. Sakaki S, Tsuchida M, Iwasaki Y, Ishihara K. A water-soluble phospholipid polymer

- as a new biocompatible synthetic DNA carrier. *Bull Chem Soc Jpn.* 2004;77(12):2283-2288.
95. Ji W, Panus D, Palumbo RN, Tang R, Wang C. Poly (2-aminoethyl methacrylate) with well-defined chain length for DNA vaccine delivery to dendritic cells. *Biomacromolecules.* 2011;12(12):4373-4385.
 96. Dufresne M-H, Elsabahy M, Leroux J-C. Characterization of polyion complex micelles designed to address the challenges of oligonucleotide delivery. *Pharm Res.* 2008;25(9):2083-2093.
 97. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;307(1):93-102.
 98. Howard MD, Jay M, Dziubla TD, Lu X. PEGylation of nanocarrier drug delivery systems: State of the art. *J Biomed Nanotechnol.* 2008;4(2):133-148. doi:10.1166/jbn.2008.021.
 99. Studart AR, Amstad E, Gauckler LJ. Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions. *Langmuir.* 2007;23(3):1081-1090.
 100. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials.* 2006;27(24):4356-4373.
 101. Ilium L, Hunneyball IM, Davis SS. The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles by the liver and by peritoneal macrophages. *Int J Pharm.* 1986;29(1):53-65.
 102. Llanos GR, Sefton M V. Review Does polyethylene oxide possess a low thrombogenicity? *J Biomater Sci Polym Ed.* 1993;4(4):381-400.
 103. Nagaoka S, Mori Y, Takiuchi H, Yokota K, Tanzawa H, Nishiumi S. Interaction between blood components and hydrogels with poly (oxyethylene) chains. In: *Polymers as Biomaterials.* Springer; 1984:361-374.
 104. Torchilin VP. Polymer-coated long-circulating microparticulate pharmaceuticals. *J Microencapsul.* 1998;15(1):1-19.
 105. Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, et al. Poly (ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes.* 1994;1195(1):11-20.
 106. Jansen B, Ellinghorst G. Modification of polyetherurethane for biomedical

- application by radiation induced grafting. II. Water sorption, surface properties, and protein adsorption of grafted films. *J Biomed Mater Res Part A*. 1984;18(6):655-669.
107. Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, De Gennes P. Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *J Colloid Interface Sci*. 1991;142(1):149-158.
 108. Moghimi SM, Patel HM. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system—the concept of tissue specificity. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(1):45-60.
 109. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res*. 2003;42(6):463-478.
 110. Moghimi SM, Muir IS, Illum L, Davis SS, Kolb-Bachofen V. Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res*. 1993;1179(2):157-165.
 111. Muir IS, Moghimi SM, Illum L, Davis SS, Davies MC. The effect of block co-polymers on the uptake of model polystyrene microspheres by Kupffer cells-in vitro and in vivo studies. 1991.
 112. Mishra S, Webster P, E. Davis M. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur J Cell Biol*. 2004;83:97-111.
 113. Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(7):581-593. doi:10.1038/nrd1775.
 114. Cheng CJ, Tietjen GT, Saucier-Sawyer JK, Saltzman WM. A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(4):239-247. doi:10.1038/nrd4503.
 115. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today*. 2006;11(17):812-818.
 116. Win KY, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005;26(15):2713-2722.

117. Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm.* 2005;298(2):315-322.
118. Aied A, Greiser U, Pandit A, Wang W. Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. *Drug Discov Today.* 2013;18(November 2013).
119. Von Gersdorff K, Sanders NN, Vandenbroucke R, De Smedt SC, Wagner E, Ogris M. The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Mol Ther.* 2006;14(5):745-753.
120. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater.* 2009;8(7):543-557.
121. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small.* 2010;6(1):12-21.
122. Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 2005;1745(3):273-286.
123. Kirkham M, Fujita A, Chadda R, et al. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol.* 2005;168(3):465-476.
124. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2004;377(1):159-169.
125. Grosse S, Aron Y, Thévenot G, François D, Monsigny M, Fajac I. Potocytosis and cellular exit of complexes as cellular pathways for gene delivery by polycations. *J Gene Med.* 2005;7(10):1275-1286.
126. Midoux P, Breuzard G, Gomez JP, Pichon C. Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Curr Gene Ther.* 2008;8(5):335-352.
127. Bareford LM, Swaan PW. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(8):748-758.
128. Sonawane ND, Szoka FC, Verkman AS. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44826-44831.
129. Suh J, Wirtz D, Hanes J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell

- nucleus. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(7):3878-3882.
130. Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes.* 1997;1324(1):27-36.
 131. BANASZCZYK MG, LOLLO CP, KWOH DY, et al. Poly-L-lysine-graft-PEG comb-type polycation copolymers for gene delivery. *J Macromol Sci Appl Chem.* 1999;36(7-8):1061-1084.
 132. Schaffer D V, Fidelman NA, Dan N, Lauffenburger DA. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67(5):598-606.
 133. Miller AM, Munkonge FM, Alton EFW, Dean DA. Identification of protein cofactors necessary for sequence-specific plasmid DNA nuclear import. *Mol Ther.* 2009;17(11):1897-1903.
 134. Lachish-Zalait A, Lau CK, Fichtman B, et al. Transportin mediates nuclear entry of DNA in vertebrate systems. *Traffic.* 2009;10(10):1414-1428.
 135. Wagstaff KM, Jans DA. Nucleocytoplasmic transport of DNA: enhancing non-viral gene transfer. *Biochem J.* 2007;406(2):185-202.
 136. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, et al. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *J Biol Chem.* 2009;284(1):478-485.
 137. Gonçalves C, Ardourel M, Decoville M, et al. An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med.* 2009;11(5):401-411.
 138. McBrierty VJ, Packer KJ. *Nuclear Magnetic Resonance in Solid Polymers.* Cambridge University Press; 2006.
 139. Boeckle S, von Gersdorff K, van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E, Ogris M. Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer. *J Gene Med.* 2004;6(10):1102-1111. doi:10.1002/jgm.598.
 140. Hühn D, Kantner K, Geidel C, et al. Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: focusing on the sign of the net charge. *ACS Nano.* 2013;7(4):3253-3263.

141. Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, Danos O. Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med.* 2001;3(2):135-144.
142. Ketola TM, Hanzlíková M, Urtti A, Lemmetyinen H, Yliperttula M, Vuorimaa E. Role of polyplex intermediate species on gene transfer efficiency: Polyethylenimine-DNA complexes and time-resolved fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B.* 2011;115(8):1895-1902. doi:10.1021/jp109984c.
143. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol Pharm.* 2008;5(4):505-515.
144. Bazile D, Prud'homme C, Bassoullet M, Marlard M, Spenlehauer G, Veillard M. Stealth Me. PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci.* 1995;84(4):493-498.
145. Lee H, Jeong JH, Park TG. PEG grafted polylysine with fusogenic peptide for gene delivery: high transfection efficiency with low cytotoxicity. *J Control Release.* 2002;79(1-3):283-291.
146. Kwok KY, Park Y, Yang Y, Mckenzie DL, Liu Y, Rice KG. In vivo gene transfer using sulfhydryl cross-linked PEG-peptide/glycopeptide DNA co-condensates. *J Pharm Sci.* 2003;92(6):1174-1185.
147. Simões S, Slepushkin V, Pires P, Gaspar R, de Lima MCP, Düzgüneş N. Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes.* 2000;1463(2):459-469.
148. Faneca H, Simoes S, Pedroso de Lima MC. Association of albumin or protamine to lipoplexes: enhancement of transfection and resistance to serum. *J Gene Med.* 2004;6(6):681-692.
149. Furumoto K, Yokoe J-I, Ogawara K, et al. Effect of coupling of albumin onto surface of PEG liposome on its in vivo disposition. *Int J Pharm.* 2007;329(1):110-116.
150. Carrabino S, Di Gioia S, Copreni E, Conese M. Serum albumin enhances polyethylenimine-mediated gene delivery to human respiratory epithelial cells. *J Gene Med.* 2005;7(12):1555-1564.
151. Choksakulnimitr S, Masuda S, Tokuda H, Takakura Y, Hashida M. In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *J Control Release.* 1995;34:233-241.

152. Moghimi SM, Symonds P, Murray JC, Hunter AC, Debska G, Szewczyk A. A two-stage poly (ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy. *Mol Ther*. 2005;11(6):990-995.
153. Parhamifar L, Larsen AK, Hunter AC, Andresen TL, Moghimi SM. Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. *Soft Matter*. 2010;6(17):4001-4009.
154. Sgouras D, Duncan R. Methods for the evaluation of biocompatibility of soluble synthetic polymers which have potential for biomedical use: 1—use of the tetrazolium-based colorimetric assay (MTT) as a preliminary screen for evaluation of in vitro cytotoxicity. *J Mater Sci Mater Med*. 1990;1(2):61-68.
155. Kunath K, von Harpe A, Fischer D, et al. Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine. *J Control Release*. 2003;89(1):113-125.
156. Cai J, Yue Y, Rui D, Zhang Y, Liu S, Wu C. Effect of chain length on cytotoxicity and endocytosis of cationic polymers. *Macromolecules*. 2011;44(7):2050-2057. doi:10.1021/ma102498g.
157. Ruponen M, Honkakoski P, Tammi M, Urtti A. Cell-surface glycosaminoglycans inhibit cation-mediated gene transfer. *J Gene Med*. 2004;6(4):405-414.
158. Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. Poly (ethylenimine) and its role in gene delivery. *J Control release*. 1999;60(2):149-160.
159. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*. 2003;24:1121-1131.
160. Stewart B, Wild CP. World cancer report 2014. *Health (Irvine Calif)*. 2017.
161. Avgoustakis K. Pegylated poly (lactide) and poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv*. 2004;1(4):321-333.
162. Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:246-255.
163. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(17):2873-2896.

164. Choi HS, Liu W, Misra P, et al. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007;25(10):1165-1170.
165. Ilium L, Davis SS, Wilson CG, Thomas NW, Frier M, Hardy JG. Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles. The effects of particle size, nature and shape. *Int J Pharm.* 1982;12(2-3):135-146.
166. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2015;33(9):941-951. doi:10.1038/nbt.3330.
167. Zelphati O, Szoka FC. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(21):11493-11498.
168. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy - An overview. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(1):GE01-GE06. doi:10.7860/JCDR/2015/10443.5394.
169. Cherng J-Y, Van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJA, Hennink WE. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino) ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res.* 1996;13(7):1038-1042.
170. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:1001-1018. doi:10.2147/IJN.S56932.