

Ana Patrícia Cardoso Loureiro

Vetores não virais com aplicação na terapia génica: Os poliplexos

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Patrícia Cardoso Loureiro

Vetores não virais com aplicação na terapia génica: Os políplexos

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Patrícia Cardoso Loureiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011167548, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de setembro de 2016.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
INTRODUÇÃO	1
1. Vetores com aplicação na terapia génica	3
1.1. Vetores virais	3
1.2. Vetores não virais	3
2. Poliplexos	5
2.1. Estrutura	5
2.2. Formação	6
2.3. Mecanismo de ação	8
2.3.1. Captação celular	8
2.3.2. Libertação do endossoma	9
2.3.3. Entrega no citoplasma	11
2.3.4. Entrega nuclear	11
2.3.5. Descompactação do vetor	12
3. Polímeros catiónicos mais utilizados na preparação de poliplexos	13
3.1. Quitosano	13
3.2. Polietilenimina	14
3.3. Ácido poli (lático-co-glicólico)	15
3.4. Poli (L-lisina)	15
4. Aplicações terapêuticas dos poliplexos	16
4.1. Nanopartículas – base da terapia génica alvo para o cancro do pulmão	16
4.1.1. Nanopartículas de PLGA para a co-entrega de paclitaxel e Stat3 siRNA como forma de superar a resistência celular em células do cancro do pulmão	17
4.1.2. Terapia combinada com VEGFR2 e EGFR siRNA para o aumento do efeito anti-tumoral da cisplatina em xenoinxertos do cancro do pulmão de não-pequenas células	17
4.2. Poliplexos de oligoquitosano como vetores de entrega de genes na retina	18
5. Conclusão e perspectivas futuras	20
BIBLIOGRAFIA	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégias utilizadas na produção de vetores poliméricos	5
Figura 2 - Representação esquemática da hipótese da esponja de protões.....	10
Figura 3 - Representação esquemática do processo de entrega de genes dos poliplexos	12

ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da imunodeficiência humana adquirida, do inglês *Acquired immune deficiency syndrome*

DD - Grau de desacetilação, do inglês *Degree of desacetylation*

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

EGFP - Proteína verde fluorescente melhorada, do inglês *Enhanced green fluorescent protein*

EGFR - Recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês *Epidermal growth factor receptor*

FDA - Food and Drug Administration

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *Messenger ribonucleic acid*

NPC - Complexo de poros nucleares, do inglês *Nuclear pore complex*

NSCLC - Cancro do pulmão de não-pequenas células, do inglês *Non-small cell lung cancer*

pDNA - Plasmídeo de DNA

PEI - Polietilenimina

PLGA - Ácido (poli láctico-co-glicólico)

PLL - Poli-L-lisina

PM - Peso molecular

RISC - Complexo de silenciamento induzido pelo RNA, do inglês *RNA-induced silencing complex*

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

siRNA - Ácido ribonucleico de interferência, do inglês *Small interfering ribonucleic acid*

Stat3 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição-3, do inglês *Signal transducer and activator of transcription 3*

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR - Recetor do fator de crescimento vascular endotelial, do inglês *Vascular endothelial growth factor receptor*

RESUMO

A terapia génica representa uma grande promessa no tratamento de doenças inatas e adquiridas, apresentando diversas vantagens sobre as terapêuticas convencionais utilizadas. Esta abordagem terapêutica recorre a vetores para a entrega de genes terapêuticos no interior de células somáticas, sendo, portanto, a escolha do vetor, um fator chave no sucesso da terapia génica, salientando a utilização de vetores virais e vetores não virais.

Apesar de os vetores virais serem mais eficazmente utilizados, os sistemas de entrega de genes não virais têm ganho significativo reconhecimento como alternativa, devido à sua segurança e baixa imunogenicidade. Também a capacidade de transferir genes de grande porte, a facilidade de produção e o alto potencial para libertação no alvo terapêutico, têm levado à contínua aposta no desenvolvimento e utilização destes vetores.

Os poliplexos são vetores não virais, que rapidamente estão a emergir como sistemas de escolha para a entrega de genes. Através do estabelecimento de interações eletrostáticas, os polímeros catiónicos formam complexos nanométricos com os ácidos nucleicos, protegendo-os da degradação enzimática e favorecendo a sua captação celular.

No entanto, a aplicação clínica dos poliplexos é ainda limitada devido à baixa eficiência de transfecção e à pobre expressão do transgene, assim como pela incapacidade para compreender o mecanismo de ação associado, o que constitui um entrave no seu sucesso terapêutico.

Palavras-chave: Terapia génica, Vetores não virais, Poliplexos.

ABSTRACT

Gene therapy holds a great promise in the treatment of innate and acquired diseases, presenting several advantages over conventional therapeutics. This therapeutic approach uses vectors for delivering therapeutic genes within somatic cells, and therefore the choice of vector, is a key factor in the success of gene therapy, emphasizing the use of viral and non-viral vectors.

Although viral vectors are more effective, the delivery systems of non-viral genes have gained a significant recognition as an alternative, because of their safety and low immunogenicity. Also the ability to transfer large genes, the ease of production and the high potential for release into the therapeutic target, have led to continuous investment in the development and use of these vectors.

The polyplexes are non-viral vectors, which are rapidly emerging as the systems of choice for gene delivery. By establishing electrostatic interactions, cationic polymers form nanoscale complexes with nucleic acids, protecting them from enzymatic degradation and promoting its cellular uptake.

However, the clinical application of polyplexes is still limited due to low transfection efficiency and poor transgene expression, as well as the inability to understand the mechanism of action associated, which constitutes an obstacle to their therapeutic success.

Keywords: Gene therapy, Non-viral vectors, Polyplexes.

INTRODUÇÃO

Os avanços científicos em genômica têm permitido uma melhor compreensão sobre os efeitos dos genes no desenvolvimento e tratamento das doenças. Para além disso, conduziram a uma elevada quantidade de pesquisa sobre terapia génica, que se tornou numa das intervenções biomédicas e farmacológicas mais promissora e com sucesso clínico demonstrado em várias áreas. (1,2)

A terapia génica pode ser definida como a transferência de ácidos nucleicos para as células somáticas de um indivíduo, resultando em efeitos terapêuticos desejados; proporciona uma abordagem única para o tratamento, tanto de doenças inatas como adquiridas, através da transferência de material genético terapêutico e dos elementos reguladores associados para o núcleo celular, a fim de corrigir a perda da função causada por mutação ou para expressar o produto do gene deficiente em níveis fisiológicos. (1,3)

Um desafio fundamental da engenharia da terapia baseada em genes é o desenvolvimento de vetores de entrega seguros e eficazes. (4) Os vetores são os veículos que transportam o material genético para uma elevada variedade de células, tecidos e órgãos. (3)

De salientar que, o sucesso clínico da terapia génica depende criticamente da bio-segurança e eficácia dos vetores de transfecção, uma vez que, os genes terapêuticos por si só são rapidamente degradados por nucleases e exibem uma pobre captação celular. (5) Os vetores portadores de genes devem por isso ser concebidos de modo a, compactar e a proteger os materiais genéticos da degradação prematura na corrente sanguínea sistémica, e a transferir eficazmente os genes terapêuticos para os tecidos e células alvo. (6)

Um vetor ideal deve ser específico para o alvo, deve facilmente entrar no interior da célula e ser capaz de expressar abundantemente e continuamente o transgene. Tem ainda de ser seguro, sem apresentar quaisquer efeitos secundários, e ser produzido em larga escala. Os veículos de entrega utilizados na terapia génica encapsulam genes terapêuticos para a sua entrega em células alvo. (1,7) Os ácidos nucleicos, de forma a desenvolver uma ação farmacológica eficaz, devem atingir o local-alvo de ação em doses clinicamente relevantes, caso contrário perdem o seu valor terapêutico e podem até causar efeitos secundários através do desenvolvimento de interações não pretendidas. (7)

Por conseguinte, o primeiro passo nas abordagens sobre terapia génica é o desenvolvimento de transportadores (vulgarmente designados por vetores) e métodos, que facilitem a transferência de genes para células alvo, prevenindo desta forma a sua degradação. (4,7)

Deste modo, é necessário assegurar o desenvolvimento de um sistema de entrega de genes apropriado para a sua captação celular.

É importante realçar, que muitas vezes o conceito de terapia génica é normalmente referido como a entrega do gene, uma vez que a entrada do vetor na célula é o fator-chave que tem vindo a dificultar a utilização desta técnica em aplicações clínicas. (7)

Os vetores utilizados na terapia génica são amplamente classificados como vetores virais e vetores não virais. Apesar dos vetores virais serem os transportadores mais eficazmente utilizados na terapia génica, ainda existe uma grande preocupação com a sua segurança, devido ao risco de imunogenicidade e toxicidade. (8, 9,10) Neste sentido, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de colmatar estes inconvenientes e de desenvolver alternativas mais seguras, o que despertou o estudo dos vetores não virais. Devido à facilidade de os gerar e de os modificar, o uso de polímeros como vetores não virais tem atraído muita atenção para esta área terapêutica. (9)

Os polímeros catiónicos utilizados na entrega de genes variam em composição molecular, em peso molecular e em estrutura, podendo apresentar-se com estruturas linear, ramificada ou dendrítica. Estes polímeros ligam-se electrostaticamente aos ácidos nucleicos, permitindo a formação de complexos – poliplexos – pela condensação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e/ou do ácido ribonucleico (RNA) para dimensões nanométricas, assegurando a proteção da degradação enzimática e promovendo a captação celular, (9) de forma a maximizar a eficiência de transfecção.

I. Vetores com aplicação na terapia génica

I.1. Vetores virais

Os vírus representam apelativas ferramentas para a transferência de genes terapêuticos, devido à sua elevada eficiência de transdução numa grande variedade de células humanas. Como agentes patogénicos, necessitam de ser atenuados para que possam ser utilizados com segurança em aplicações clínicas. (11)

Os vetores virais mais utilizados são os retrovírus, vírus do *herpes simplex*, lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Estes vetores têm a capacidade natural para entrar nas células e expressar as suas próprias proteínas, exibindo uma elevada taxa de transdução e uma rápida transcrição do material exógeno inserido no genoma viral. (12)

A função primária de um vírus é a de transportar eficientemente o seu próprio genoma de uma célula hospedeira para outra, entrar na nova célula alvo, alcançar o núcleo da célula, e iniciar a expressão do seu genoma - ainda com o objetivo de auto-replicação. Os vírus podem ser transformados em veículos de entrega de genes pela remoção de parte do seu genoma e pela sua substituição por um gene terapêutico. Se o processo for corretamente realizado, o vírus recombinante que daí resulta irá reter as funções essenciais para a infeção de células alvo específicas, mas será incapaz de se replicar e, portanto, será não patogénico. (5)

Os transportadores virais exibem elevada eficiência na entrega e expressão de genes, tendo, no entanto, inconvenientes fundamentais associados, tais como severas reações imune/inflamatórias, recombinações com vírus *wild-type*, limitações do tamanho dos ácidos nucleicos inseridos e difícil produção farmacêutica em grande escala, limitando a sua utilização no tratamento de doenças, estimulando a investigação de vetores de genes não virais. (6)

I.2. Vetores não virais

Os vetores não virais foram desenvolvidos, como uma alternativa aos sistemas virais (13), apresentando como principal vantagem o facto de efetuarem o processo de transfecção. Os sistemas de entrega de genes não virais, consoante o processo utilizado na sua preparação, podem ser classificados em físicos e em químicos. Os métodos físicos envolvem o uso de força física de forma a aumentar a permeabilidade da membrana celular e permitir a entrada

do gene na célula, sendo a microinjeção, a eletroporação, os ultrassons e os sistemas hidrodinâmicos os mais usados. (3,12,13) Tratam-se de métodos de confiança, de fácil utilização, mas que apresentam a desvantagem de causarem lesões tecidulares, em algumas aplicações. Por sua vez, os métodos químicos envolvem o uso de transportadores preparados a partir de compostos sintéticos ou naturais, para a entrega de genes para o interior das células, que incluem polímeros catiónicos naturais e sintéticos, lipossomas, dendrímeros, proteínas sintéticas e lípidos catiónicos. (3,13)

Os vetores não virais oferecem várias vantagens sobre os seus homólogos virais, tais como, baixa imunogenicidade, facilidade de produção, flexibilidade na construção, ausência de recombinação com vírus endógenos e marcação de células/tecido. No entanto, apresentam consistentemente e significativamente reduzida eficácia de transfecção, quando comparada com a eficácia de transdução dos vetores virais, os quais têm a capacidade de superar as barreiras celulares e os mecanismos de defesa imune. Contudo, nas últimas décadas estes compostos têm demonstrado particular importância e ganho significativa atenção para a terapia génica devido à sua biocompatibilidade e excelente potencial para a produção em larga escala. (6)

Na terapia génica, os aspetos mais importantes a ter em conta são a introdução do gene no interior da célula e o aumento da eficiência de transfecção. Porém, a existência de várias barreiras extracelulares e intracelulares restringem a entrega eficiente de genes por sistemas não virais. (6) A passagem pela barreira celular constitui um dos passos mais críticos do processo, devido à repulsão entre os ácidos nucleicos e a superfície da célula, uma vez que ambos estão carregados negativamente. De notar que, a entrada de ácidos nucleicos no citoplasma pode ser facilitada quer por métodos físicos, que conduzem à criação de orifícios sobre a membrana celular permitindo a entrada de ácidos nucleicos livres, quer por métodos químicos, em que através da utilização de vetores génicos é possível encapsular e condensar o DNA de modo a formar complexos com carga superficial positiva, otimizando a captação celular. (14)

Após a captação, os endossomas contendo os ácidos nucleicos transformam-se em lisossomas digestivos: sofrem inicialmente um processo de maturação, seguido da fusão com os lisossomas. A fim de evitar a degradação enzimática dos ácidos nucleicos é necessário que ocorra a rutura da membrana do endossoma, antes que este se torne maduro, para permitir a saída dos ácidos nucleicos das vesículas. (14,15) Existem várias hipóteses para justificar a libertação do endossoma, todavia, são necessários mais estudos de forma a entender os

vários mecanismos moleculares associados. (16) Posteriormente à liberação dos ácidos nucleicos dos endossomas para o citoplasma, estes na forma livre ou complexada, são transportados para o núcleo, onde ocorrerá a transcrição.

2. Políplexos

Um sistema de entrega de genes bem-sucedido deve ser capaz de proteger o DNA da repulsão superficial celular, condensar o DNA em pequenas dimensões e deve protegê-lo da degradação extracelular e intracelular. Tendo isto em conta, três estratégias (Figura 1) são atualmente utilizadas para produzir vetores baseados em polímeros: encapsulação, interações eletrostáticas e adsorção. De salientar que, a maioria dos vetores poliméricos em utilização formam complexos com o DNA, carregado negativamente, através de interações eletrostáticas, obtendo-se os políplexos. (13) Os políplexos têm sido bastante estudados como sistemas de entrega de genes, constituindo uma promissora, segura, biodegradável e não tóxica alternativa à terapia viral. (17)

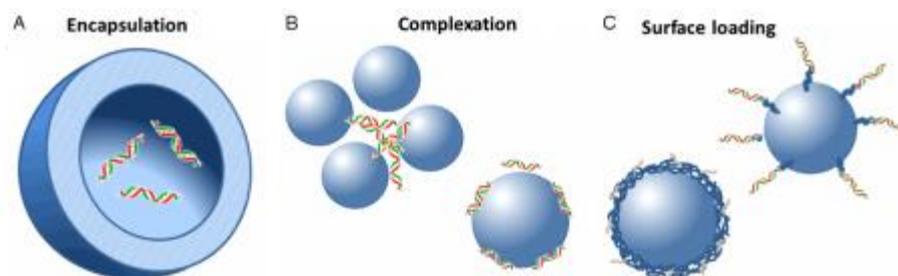


Figura 1 - Estratégias utilizadas na produção de vetores poliméricos. Adaptado de (18)

2.1. Estrutura

Os políplexos são definidos como partículas coloidais, de tamanho variável entre 10 e 1000 nm, compostos por polímeros naturais, como o quitosano, ou sintéticos, como a polietilenimina (PEI), a poli-L-lisina (PLL) e o ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA). (18,19)

Os polímeros catiónicos apresentam uma densidade de carga elevada conferida pelos grupos amina, protonados a pH neutro. Em contacto com o DNA carregado negativamente, as cargas positivas dos polímeros permitem a formação de complexos polímero/DNA (políplexos), através do estabelecimento de interações eletrostáticas. (14) Desta forma, os políplexos podem condensar eficazmente os ácidos nucleicos em complexos de escala

nanométrica, por meio de interações eletrostáticas entre os grupos amina, com carga positiva, do polímero e os grupos fosfato, carregados negativamente, dos ácidos nucleicos (relação N/P). (7)

O contributo dos polímeros catiónicos para a transfecção tem sido atribuído às suas capacidades de melhorar a absorção do DNA por endocitose através da interação carga-carga entre políplexos e os locais aniónicos da superfície celular, de proteger o DNA da degradação pelas nucleases e de facilitar a fuga do DNA dos endossomas. No entanto, com o uso de diferentes polímeros, a atividade de transfecção e a toxicidade podem variar drasticamente. (14)

As modificações químicas de alguns polímeros podem melhorar as suas funções, possibilitando o aumento da sua atividade de transfecção ou redução da sua toxicidade. Como resultado, alguns polímeros possuem um grande número de derivados. (14)

A versatilidade dos nanotransportadores poliméricos oferece uma vantagem significativa na entrega de genes, relativamente a outras plataformas nanotransportadoras. As matrizes dos polímeros podem ser selecionadas com base na sua utilidade, permitindo a personalização das propriedades dos políplexos. A fácil modificação da superfície, a eficiência de encapsulação de elevada carga útil, a capacidade de proteção de carga, a grande relação de área de superfície/volume e a capacidade de modificar a taxa de erosão do polímero para o controlo temporal da libertação dos nucleotídeos são também vantagens adicionais dos nanotransportadores poliméricos. (1)

Os polímeros catiónicos fornecem uma carga de superfície positiva ao complexo, requisito necessário para uma eficiente captação celular, uma vez que o processo de entrada na célula engloba a interação com os proteoglicanos existentes na superfície celular. (7,13) Além disso, devido ao seu tamanho, os políplexos conseguem uma maior captação intracelular, o que favorece uma melhor eficácia de transfecção, particularmente *in vivo*, quando comparados com outros sistemas. (7)

2.2. Formação

A formação de políplexos é influenciada por diversas condições, como a força iónica da solução, a concentração e a razão das cargas positivas/negativas do polímero e do DNA, assim como, pelo processo de formação do políplexo (processo cinético vs termodinâmico). (20) De notar que, geralmente, a formação de políplexos é cineticamente controlada e

realizada através de forças iónicas em que a associação estabelecida é rápida e quase irreversível. (7)

Os polímeros catiónicos podem facilmente ser submetidos a modificações estruturais de acordo com a sua geometria, comprimento, peso molecular, ou através de substituições/adições de grupos funcionais, desempenhando estes parâmetros uma importante função não só na formulação de poliplexos, mas também na degradação do polímero e na eficiência da transfecção. Este facto levantou a possibilidade de estudar e de estabelecer várias relações estrutura/função. (4,7,18)

As propriedades físico-químicas do complexo são determinadas pelas quantidades relativas de catiões/aniões, pelos parâmetros de preparação (velocidade de mistura, tempo, temperatura da mistura, concentração dos reagentes, etc.) e pelas propriedades do polímero, tais como hidrofobicidade, peso molecular, carga de superfície, número e densidade de cargas, correspondência de carga e conformação da cadeia. Além disso, a sequência de adição dos componentes durante o processo de complexação (adição de uma solução contendo o polímero à solução de ácidos nucleicos, ou vice-versa) determina o tamanho final do poliplexo, bem como a sua eficiência de transfecção. (7,21)

De salientar que, o tamanho e a estabilidade do vetor desempenham um papel crítico como critérios de qualidade para o sucesso na aplicação *in vivo*, bem como para o desenvolvimento de formulações. (18)

A administração *in vitro* dos poliplexos resulta na entrega de genes bem-sucedida, no entanto, a administração sistémica destes complexos é limitada devido à instabilidade sob condições fisiológicas. Ao interagirem com diversos fatores presentes no plasma, estes afetam significativamente a sua estabilidade e biodisponibilidade, através da agregação, dissociação ou degradação do complexo. (8,13) Também os inconvenientes associados à carga de superfície do poliplexos, como a toxicidade e a ligação não específica, constituem situações problemáticas na utilização destes vetores, uma vez que, podem conduzir à absorção indiscriminada e à expressão indesejada de genes em populações imprevistas de células. No entanto, vários estudos têm-se focado na modificação da superfície dos poliplexos, o que poderá minimizar as interações com os componentes do sangue, reduzir a sua toxicidade e aumentar a afinidade de ligação com as células alvo. (6)

Na verdade, a eficácia do sistema de transfecção resulta de um equilíbrio entre a eficiência de transfecção e a citotoxicidade. (7)

A formulação de poliplexos em sistemas com maior semelhança ao ambiente fisiológico pode melhorar a correlação entre os resultados obtidos em experiências de cultura de células e em testes *in vivo*.

De uma maneira geral, para encontrar o transportador ideal para entrega de ácidos nucleicos é necessário o estabelecimento de um equilíbrio entre as propriedades físico-químicas dos ácidos nucleicos/complexos transportadores e as restrições impostas pelas barreiras extracelulares e intracelulares. (7)

2.3. Mecanismo de ação

Durante o processo de transferência gênica, os poliplexos deparam-se com diversas barreiras, que podem condicionar a eficiência da transfecção. É importante entender como estas barreiras influenciam a transferência de genes, a fim de permitir o desenvolvimento de melhores vetores e modificações mais eficazes dos polímeros. (10)

A transferência de genes é um processo que envolve múltiplos passos, que se inicia com a condensação do ácido nucleico, captação celular, libertação do endossoma, entrega no citoplasma, transporte nuclear e por fim com a descompactação do vetor, seguida da expressão do transgene. (16) Todos estes passos são relevantes para a entrega de genes mediada por poliplexos podendo qualquer um deles ser o passo limitante do processo, dependendo da natureza do poliplexo.

Os poliplexos para além de transportarem plasmídeo de DNA (pDNA) têm a capacidade de transportar composto sintéticos como oligonucleótidos ou o ácido ribonucleico de interferência (siRNA). (11)

2.3.1. Captação celular

Os polímeros catiónicos complexam com os ácidos nucleicos através de interações eletrostáticas entre o grupo de fosfato dos ácidos nucleicos carregados negativamente e as moléculas catiónicas, levando à neutralização de cargas e a uma compactação do fragmento de nucleótido. (6,10)

Após alcançarem as células alvo, os poliplexos necessitam de ser internalizados de modo a concluírem a sua função, pelo que, a nível celular, a membrana plasmática constitui o primeiro obstáculo a superar por estes complexos. (22)

A membrana plasmática é uma estrutura dinâmica, relativamente lipofílica, que representa uma barreira importante para a absorção de pDNA ou siRNA, uma vez que está carregada negativamente, devido ao seu conteúdo de glicoproteínas, glicerolfosfatos e proteoglicanos sulfatados. (7,10) Apesar do seu tamanho, a hidrofiliabilidade e carga negativa das moléculas de pDNA ou siRNA impede-os de atravessar facilmente as membranas biológicas. (7)

De notar que, as repulsões eletrostáticas existentes entre a superfície celular e o pDNA ou siRNA são responsáveis pela endocitose de apenas uma pequena quantidade de pDNA ou siRNA livre pelas células. No entanto, os níveis de captação podem ser melhorados pela utilização de transportadores químicos, como polímeros catiónicos, que neutralizam as cargas aniónicas do pDNA ou siRNA, em associação com ligandos específicos conjugados com o sistema de libertação que promove a afinidade preferencial por um tipo particular de recetores na superfície da célula. (7,10)

Várias vias celulares podem ser processadas pelos sistemas transportadores, incluindo endocitose mediada por clatrina através de poros revestidos (absortivos ou mediados por recetores), jangadas de lípidos mediadas por endocitose (mediadas ou não por caveolina), fagocitose e macropinocitose. (6,10,22) Não obstante, torna-se importante afirmar que a contribuição de cada via para a internalização dos complexos ainda não está totalmente esclarecida. No entanto, de entre os fatores que podem determinar a entrada na célula através de um mecanismo em detrimento de outros, estão o tamanho do políplexo e a sua carga de superfície. (9)

Após a ligação do políplexo à célula, este veículo de entrega celular específico e o ácido nucleico associado são captados por endocitose e depositados em endossomas. (7)

2.3.2. Libertação do endossoma

O facto dos polímeros catiónicos, associados a ácidos nucleicos, estarem incluídos no interior de vesículas endossomais intracelulares no citoplasma, representa uma grande desvantagem para uma transfecção eficiente. Na verdade, se o transportador permanecer por tempo indeterminado na vesícula, irá provavelmente ser degradado pelos lisossomas, e a entrega do material genético não será eficientemente concluída. (7,11)

Os primeiros endossomas fundem-se com outros transferindo o seu conteúdo e dando origem a um endossoma tardio, que contém bombas de prótons ATPase, reduzindo o pH de 7,4 para aproximadamente 5,0. Nestes estadios finais, o conteúdo endossomal funde-se com o conteúdo lisossómico, que é o compartimento principal de degradação da célula, que

também tem um pH baixo (~ 4,5) e uma elevada concentração de nucleases, que podem promover a degradação do pDNA ou siRNA. Assim, para evitar a degradação lisossomal, o pDNA ou o siRNA (livres ou complexados com o transportador) têm de se libertar do endossoma para o citoplasma. (7)

Para cadeias policatiónicas com capacidade tampão, a "hipótese da esponja de protões" (Figura 2) é amplamente utilizada para explicar o seu mecanismo de fuga endo-lisossômica. Esta hipótese sugere que diferentes grupos de aminas das cadeias poliméricas podem ainda ser protonadas dentro dos endo-lisossomas. À medida que os poliplexos entram na célula, ficando aprisionados no interior das vesículas endossomais, os canais iónicos ATPases presentes na membrana de cada endossoma, vão bombear protões para o seu interior. Deste modo, os polímeros tornam-se protonados e sendo impedida a acidificação do endossoma. Esta resistência vai conduzir a um influxo contínuo de protões e à entrada passiva de iões cloreto. Como resultado, cria-se um gradiente osmótico, a água acumula-se no interior do endossoma, o que leva à eventualmente rutura da membrana endossomal, libertando assim o poliplexo para o citoplasma. (9,10,15) Apesar de amplamente aceite esta hipótese pode não ser válida para os polímeros com uma capacidade tampão a um pH de cerca de 5. (9)

Portanto, são necessários mais estudos para entender os mecanismos moleculares do comportamento dos poliplexos no compartimento endossomal e a interação com a membrana dos endossomas. A fuga endossomal também pode ser promovida pelo uso de péptidos conjugados com os poliplexos ou com a utilização de agentes químicos, tais como bases fracas, que promovem o tamponamento do pH nas vesículas endossomais. (9,10)

A libertação do endossoma é um dos elementos-chave que influenciam a eficiência de transfecção. (11,17)

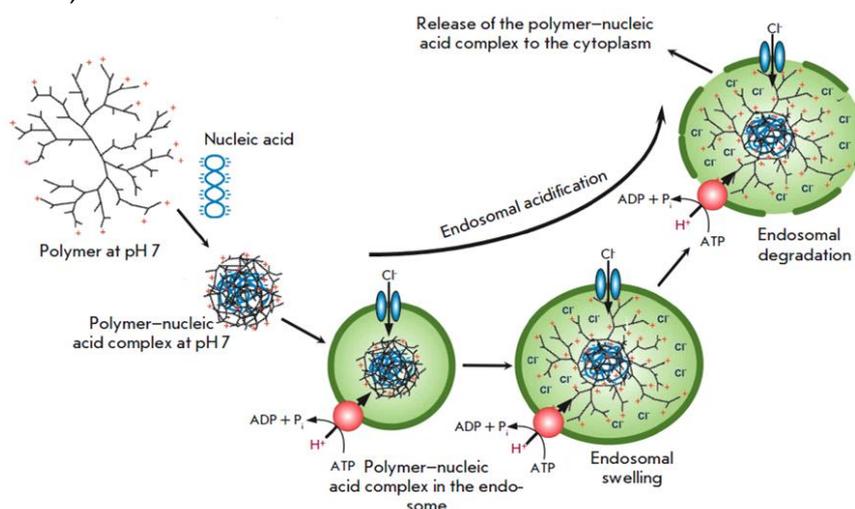


Figura 2 - Representação esquemática da hipótese da esponja de protões. Adaptado de (15)

2.3.3. Entrega no citoplasma

Uma vez libertado dos endossomas, o pDNA pode finalmente deslocar-se através do citoplasma para o núcleo para ser transcrito em ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e, subsequentemente, traduzido no antigénio proteico. De notar que, a entrega de siRNA para dentro do compartimento citoplasmático, o local em que a sua função é exercida, é geralmente uma barreira crítica para uma resposta terapêutica eficiente. Biologicamente, os siRNA são reconhecidos pelo complexo proteico conhecido como o complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC) para se ligarem ao mRNA alvo através de emparelhamento de bases complementares. Após a ligação, o mRNA é degradado, evitando assim a tradução da proteína. (7,15) Para cumprir este requisito, o sistema de entrega tem de se ligar ao RNA com força suficiente para protegê-lo contra as nucleases mediadoras de degradação, mas, ao mesmo tempo, tem de ser capaz de libertar o RNA, não afetando a sua atividade. O fator desfavorável neste passo é a presença de nucleases citosólicas, que degradam o pDNA ou o siRNA. Esta é outra razão para a importância de associar um sistema de transporte que proteja o pDNA ou o siRNA da degradação, que não interaja com componentes do sangue e que permaneça estável em condições fisiológicas para melhorar o seu transporte através da célula. Para além disso, o tamanho de partícula é também um parâmetro importante que pode influenciar o sucesso da entrega dos complexos, especialmente na circulação do sangue a longo prazo. (7)

2.3.4. Entrega nuclear

Ao contrário do siRNA, cujo local de ação é no citoplasma, o DNA deve ser entregue no núcleo para se iniciar a transcrição. Uma vez libertados para o citoplasma, os poliplexos devem superar as barreiras adicionais no citosol. Os filamentos intermédios e microfilamentos são organizados numa rede densa para formar a estrutura do tipo citoesqueleto, que impede a difusão de moléculas grandes, tais como o DNA isolado do plasmídeo. Os vetores que compactam o DNA em partículas pequenas podem ajudar no movimento do DNA para o núcleo. Para além disso, há muitas enzimas nucleótidas dentro do meio citosólico prontas para degradar ácidos nucleicos desprotegidos, pelo que os transportadores catiónicos protegem o DNA dessa degradação no citoplasma. (6)

O DNA do plasmídeo pode difundir para a região nuclear durante a fase de divisão celular, uma vez que a membrana nuclear se encontra temporariamente desagregada. (7,10) No entanto, plasmídeos com tamanho inferior a 10 nm podem difundir passivamente através dos poros nucleares e plasmídeos com tamanho menor que 25 nm podem ser transportados

ativamente através de complexos de poros nucleares (NPC), um processo mediado pelos mecanismos de importação celular que depende de pequenas proteínas denominadas carioferinas. (7)

2.3.5. Descompactação do vetor

A etapa final e a mais importante consiste na separação dos ácidos nucleicos do vetor para que possa ocorrer a transcrição. (4) A alta afinidade do polícatião para o pDNA pode ser um passo limitante no sucesso da transfecção, dada a dificuldade na separação do pDNA do transportador do gene. O mecanismo envolve o deslocamento de ácidos nucleicos por polianiões intracelulares, um processo que é essencialmente influenciado pela estrutura química do veículo de entrega. (7)

A dissociação do DNA a partir do seu vetor é um requisito necessário para a expressão eficiente do gene. Alguns estudos demonstraram que a dissociação no núcleo pode aumentar ainda mais a expressão do gene através da minimização do tempo de residência do DNA desprotegido no citosol nucleoliticamente rico. A expressão estável e a longo prazo é geralmente conseguida através da inserção transgênica no genoma do hospedeiro, enquanto que na expressão transiente e de curto prazo, os transposões de DNA são incorporados em sistemas de entrega de genes. Em estudos anteriores, a sequência de transposição foi incorporada ou no mesmo plasmídeo como o transgene ou num plasmídeo separado e co-entregue com o plasmídeo transgênico. No entanto, a inserção aleatória no genoma do hospedeiro limita significativamente a integração do genoma mediada por transposição. Assim, os alvos e as capacidades de integração específicas do local requerem mais investigação. (6)

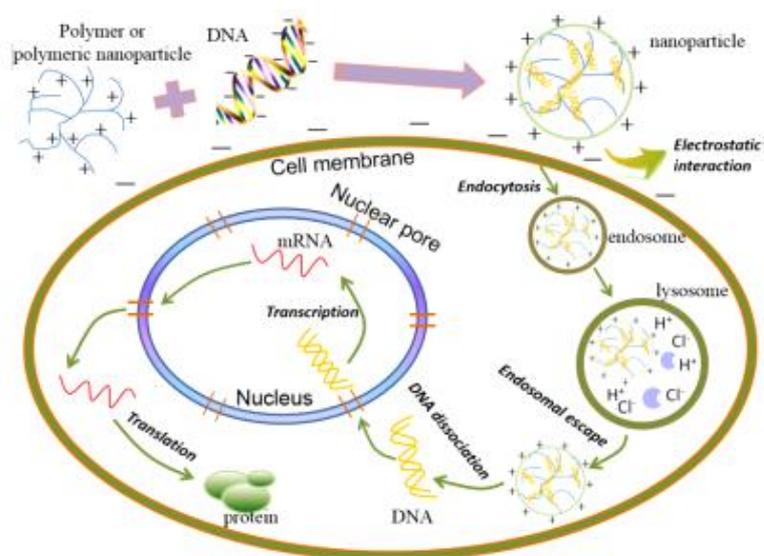


Figura 3 - Representação esquemática do processo de entrega de genes dos políplexos. Adaptado de (17)

3. Polímeros catiónicos mais utilizados na preparação de políplexos

3.1. Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo catiónico linear natural composto por unidades de D – glucosamina e N -acetil-D-glucosamina, ligadas por uma ligação glicosídea β (1 \rightarrow 4) com diferentes proporções e de comprimentos de cadeia diferentes. (23,24)

O potencial do quitosano como um veículo de entrega de genes baseia-se na sua propriedade catiónica. É uma base fraca, insolúvel em pH neutro e alcalino, mas, no entanto, solúvel a pH ácido. Em pH ácido, abaixo do pKa, as aminas primárias do quitosano ficam positivamente carregadas, originando uma elevada densidade de carga. (23) Estas aminas protonadas permitem que o quitosano se ligue ao DNA, carregado negativamente, através de uma interação eletrostática. Por sua vez, sob condições neutras ou alcalinas, o quitosano está ligeiramente carregado, sendo as ligações de hidrogénio e as interações hidrofóbicas as possíveis responsáveis pela ligação entre o quitosano e o DNA. (6)

Os políplexos de quitosano são fáceis de preparar, sendo que o seu tamanho e estabilidade, constituem importantes fatores a considerar. (23)

O peso molecular (PM) do quitosano é um fator que afeta a eficiência da transferência de genes. Para se obter uma alta eficiência de transfecção deve ser atingido um grau de estabilidade intermédia, para que o quitosano com um apropriado PM, garanta a proteção do DNA extracelular versus uma eficiente libertação intracelular do ácido nucleico. (6,25)

Além do PM, o grau de desacetilação (DD), a relação N/P, o pH do meio de transfecção e o tipo de célula também podem afetar significativamente a eficiência de transfecção de complexos formados entre o quitosano e o ácido nucleico. (6,25)

Apesar das vantagens do quitosano como um vetor de entrega de genes não viral, a sua aplicação é significativamente limitada pela sua baixa eficiência de transfecção. Contudo, o quitosano apresenta diferentes grupos químicos que podem facilmente ser modificados para melhorar eficiência na entrega de genes. (17) De modo a reduzir a agregação dos políplexos de quitosano e a melhorar a interação com as superfícies celulares, uma série de porções hidrofóbicas, incluindo ácido 5-beta-colânico, ácido desoxicólico, cadeias de ácidos esteárico e alquilo, têm sido conjugadas com este polímero. (6)

Ao longo dos anos, o quitosano tem sido utilizado em várias aplicações biomédicas, nomeadamente na terapia génica, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, segurança ecológica, baixa toxicidade, baixa imunogenicidade e atividade antimicrobiana. (17,26)

3.2. Polietilenimina

A Polietilenimina (PEI) é um dos polímeros mais promissores e mais usados na terapêutica génica. (6) Apresenta uma forte capacidade de condensação do DNA e propriedades de tamponamento intrínsecas que lhe permitem mediar uma eficiente transferência de genes (17,26) Pode ser sintetizada em diferentes comprimentos, ser ramificada ou linear e pode ser funcionalizada para uma melhor compatibilidade. No que concerne a vetores não virais, a PEI apresenta bons resultados quando se trata de eficiência da transfecção, condensando eficientemente o DNA e levando à formação de poliplexos esféricos homogéneos. (6,17)

Um dos fatores que influenciam a eficiência de transfecção mediada por PEI é o seu peso molecular (PM). PEI de elevado PM têm sido associadas a uma maior eficiência de transfecção, sendo, no entanto, demasiado tóxicas para aplicações clínicas, por contribuírem para uma maior citotoxicidade aguda, devido à rutura da membrana celular, seguida pela indução da apoptose. Por sua vez, PEI de baixo PM têm sido associadas a uma baixa toxicidade, mas apresentam valores de eficiência de transfecção indesejáveis. (15,17) Por conseguinte, torna-se um desafio preparar vetores baseados em PEI com alta eficiência de transfecção e simultaneamente com baixa citotoxicidade. (17,26)

A PEI ramificada por ter um peso molecular mais elevado, é mais citotóxica, mas por sua vez, também condensa mais DNA, uma vez que possui mais cargas positivas disponíveis, que formam poliplexos mais pequenos. A PEI linear, com um peso molecular mais baixo, exhibe menores valores de eficiência de transfecção e menor citotoxicidade quando comparada com a PEI ramificada. Para além da toxicidade, a PEI tem outros inconvenientes que dificultam a transfecção *in vivo*, como a tendência para agregar glóbulos vermelhos e a fraca degradabilidade, limitando o seu uso em aplicações clínicas. (15,17)

Dito isto, a PEI tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de vários vetores devido à sua superior eficiência de transfecção, em consequência da elevada capacidade de tamponamento, o que constitui uma importante vantagem durante a fuga endossomal. (9,26)

3.3. Ácido poli (lático-co-glicólico)

O ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA) é um polímero constituído por ácido lático e ácido glicólico ligados entre si por ligações éster. Tem a capacidade de incorporar o DNA, protegendo-o da degradação e permitindo a sua libertação controlada. No entanto, o PLGA também tem algumas limitações que necessitam de ser ultrapassadas nomeadamente, o facto de apresentar uma taxa de libertação do DNA lenta, reduzido encapsulamento do DNA devido às cargas negativas que dificultam o processo e o microambiente ácido das partículas de PLGA que origina mudanças estruturais no DNA. (17)

3.4. Poli (L-lisina)

A Poli (L-lisina) (PLL) é um homopolipeptido sintético que devido à sua natureza biodegradável torna-se num polímero ideal para a transfecção de DNA, tendo sido um dos primeiros polímeros catiónicos utilizados em terapia génica. (14,17) Com um peso molecular superior a 3 kDa, liga-se eficazmente às moléculas de DNA para formar complexos estáveis. No entanto, a pH fisiológico, todos os grupos amina primários da PLL estão protonados, o que impede a libertação do DNA dos endossomas, e que conseqüentemente se traduz numa fraca eficiência de transfecção. (6) Além disso, os complexos PLL apresentam uma alta citotoxicidade. (14,17) Para ultrapassar estes problemas, numerosos conjugados PLL biodegradáveis têm sido sintetizados, pelo que a derivatização de moléculas de PLL com ligandos alvo tem sido uma das soluções correntes para ultrapassar este problema.

4. Aplicações terapêuticas dos poliplexos

Os sistemas de entrega de genes baseados em nanopartículas representam uma importante ferramenta no tratamento de doenças hereditárias e adquiridas, desde desordens neurológicas, cancro, doenças cardiovasculares e síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS). (14,27,28) No entanto, a sua utilização em aplicações clínicas é ainda bastante controversa. Até à data, a Food and Drug Administration (FDA) não aprovou nenhum sistema de entrega de genes devido à toxicidade desconhecida a longo prazo e à baixa eficiência de transfecção *in vivo*. (27)

Atualmente, existem vários investigadores empenhados em demonstrar a potencial aplicabilidade dos poliplexos na prática clínica. Cada vez mais, a procura por terapêuticas mais seguras e mais eficazes abre o caminho a terapêuticas alternativas, como a utilização de poliplexos. Os poliplexos têm sido bastante estudados como sistemas de entrega de genes devido à sua alta estabilidade, biocompatibilidade e também devido à possibilidade de efetuar diversas modificações para que as partículas adquiram as propriedades desejadas. (7,18) No entanto, as limitações existentes destes vetores levam à necessidade da contínua aposta na melhoria das suas características e propriedades.

4.1. Nanopartículas – base da terapia génica alvo para o cancro do pulmão (29)

A terapia génica alvo com base em nanopartículas é uma das áreas mais extensa e que mais rapidamente evoluiu no campo de investigação para o cancro do pulmão. Este avanço deve-se à marcação alvo e à regulação da expressão génica anormal, responsável pelo desenvolvimento de cancro. (29,30) De notar que, o conceito de marcação alvo consiste na utilização de um agente molecular que se liga especificamente aos biomarcadores ou recetores das células cancerosas.

Em comparação às abordagens terapêuticas convencionais, espera-se da terapia génica uma maior eficiência em tratamentos anti-cancerígenos e a minimização da citotoxicidade sistémica em doentes com cancro. (29,31)

Na maioria dos casos, os genes carregados negativamente, nomeadamente o DNA e o RNA, não têm a capacidade de penetrar a membrana celular e de se introduzirem eficazmente no núcleo. Por sua vez, as nanopartículas catiónicas, carregadas positivamente, devido às cargas negativas das células cancerosas, apresentam uma maior captação celular. (29)

A terapia génica baseada em nanopartículas tem vindo a ser combinada com a quimioterapia convencional para uma melhoria da eficácia terapêutica. (29)

4.1.1 Nanopartículas de PLGA para a co-entrega de paclitaxel e Stat3 siRNA como forma de superar a resistência celular em células do cancro do pulmão (32)

Su e os seus colaboradores (32) desenvolveram um sistema de entrega de genes combinado com a libertação controlada de fármacos quimioterapêuticos em estudos *in vitro* de tratamento do cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC). Neste estudo, foram sintetizadas nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com paclitaxel e com o transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (Stat3) siRNA (S3SI), sendo investigadas as suas aplicações em células cancerosas. O revestimento das nanopartículas por polietilenimina (PEI) permitiu o transporte de Stat-3 siRNA na sua superfície por meio de interações eletrostáticas. De notar que, o Stat-3 é conhecido como o regulador de resistência celular de agentes anticancerígenos, pelo que a sua ativação conduz à resistência celular a estes agentes. (32)

As células A549, presentes neste tipo de cancro, contém constitutivamente Stat3 ativado, pelo que o silenciamento do Stat3 pelo siRNA torna estas células cancerosas mais sensíveis ao paclitaxel. Portanto, o complexo PLGA-PEI-tax-S3SI foi sintetizado de modo a testar o seu papel terapêutico nas células A549. (32)

Os resultados mostraram que o sistema de combinação de PLGA-PEI-tax-S3SI suprimiu a expressão do Stat-3 e induziu uma maior apoptose celular por paclitaxel em células A549. Com isto, pode-se concluir que o complexo de PLGA-PEI-tax-S3SI proporciona uma nova estratégia terapêutica para o controlo do crescimento de células cancerígenas e uma nova estratégia para superar a resistência aos medicamentos anti-tumorais. (32)

4.1.2. Terapia combinada com VEGFR2 e EGFR siRNA para o aumento do efeito anti-tumoral da cisplatina em xenoinxertos do cancro do pulmão de não-pequenas células (33)

Uma outra terapia combinada envolvendo quimioterapia com silenciamento de genes, utilizando complexos de polietilenimina (PEI), foi demonstrada por Chen e colaboradores. (33)

Em condições fisiológicas normais, os fatores pró-angiogénicos e os inibidores endógenos da angiogénese encontram-se em equilíbrio, no entanto, durante a angiogénese o mesmo não se verifica e diferentes fatores pró-angiogénicos tornam-se sobre-expressos. No cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC) tem-se verificado uma *upregulation* da expressão do EGFR (recetor do fator de crescimento epidérmico) e do VEGF/VEGFR (fator de crescimento vascular endotelial /recetor do fator de crescimento vascular endotelial), sendo ambos fatores pró-angiogénicos. Neste estudo, as expressões de EGFR e de VEGFR2 foram *knocked down* de forma a inibir o crescimento de NSCLC em xenoenxertos humanos. (33)

O complexo do VEGFR2, EGFR siRNA e PEI foi injetado intratumoralmente nos xenoenxertos de NSCLC, juntamente com a administração de cisplatina. Os complexos de siRNA-PEI protegeram o siRNA da degradação e permitiram uma captação mais eficaz por mecanismos de endocitose celular e subseqüentemente uma libertação do siRNA mais fácil a partir dos endossomas. Como resultados deste estudo, foi observada uma melhoria na eficácia do tratamento com uma menor dose de siRNA e de cisplatina, o que pode originar uma redução da toxicidade sistémica associada à quimioterapia. Em conclusão, o *knockdown* alvo pelo siVEGFR2 e siEGFR inibiram o crescimento do tumor de forma eficaz, e uma combinação desta abordagem com uma menor dose de quimioterapia poderá oferecer uma nova estratégia para o tratamento de cancro. (33)

4.2. Poliplexos de oligoquitosano como vetores de entrega de genes na retina (34)

A terapia génica não viral representa uma abordagem promissora para o tratamento de doenças da retina, especificamente para as doenças crónicas do segmento posterior que afetam a retina, tais como degeneração macular relacionada com a idade, a retinite pigmentosa ou retinite por citomegalovirus. (34)

O olho é um órgão promissor imune-privilegiado para a terapia génica não viral devido à sua anatomia compartimentada, que permite uma entrega localizada para tecidos oculares específicos, e por ser afetado por doenças de origem génica já estudadas. (34)

Neste estudo, a fim de elucidar a potencial aplicação de oligoquitosano como transportador de DNA para a retina, poliplexos baseados em oligoquitosano foram administrados na retina de rato através de injeções sub-retinianas e intravítreas, as vias mais amplamente utilizadas para a entrega de material genético no segmento posterior do olho, e a expressão da

proteína verde fluorescente melhorada (EGFP) foi avaliada em diferentes células e camadas da retina. (34)

Os resultados deste estudo demonstraram que uma formulação selecionada de políplexos, constituídos por oligoquitosanos, levou a uma expressão significativa de EGFP em diferentes camadas e células da retina, demonstrando a capacidade deste vetor para condensar e proteger o plasmídeo incorporado contra a degradação enzimática. (34)

A realização deste estudo veio confirmar a potencial utilização de oligoquitosanos para a entrega de material genético em células da retina. No entanto, são necessários mais estudos de forma a explorar e a compreender as propriedades deste material como transportador genético. (34)

5. Conclusão e perspectivas futuras

A terapia génica tem demonstrado diversas vantagens sobre as modalidades terapêuticas convencionais. A capacidade de transferir genes de grande porte, a baixa toxicidade, a facilidade de preparação, o alto potencial para a libertação no alvo terapêutico, a segurança e os baixos custos associados levaram ao desenvolvimento e à utilização de numerosos sistemas de entrega não virais numa ampla gama de estudos durante os últimos anos. (2)

No entanto, os métodos de transferência desenvolvidos até agora, apresentam algumas limitações, incluindo a baixa eficiência de transfecção e a fraca expressão do transgene, que restringem as suas aplicações clínicas. Os desafios associados à utilização destes sistemas na prática clínica, tais como a manutenção da estabilidade das nanopartículas, a duração da expressão do gene, o controlo da biodistribuição e da farmacocinética, a penetração através das barreiras biológicas e a minimização da potencial citotoxicidade das nanopartículas, devem ser considerados e superados antes de integrarem ensaios clínicos. (29)

Até à data, muitos nanomateriais têm sido utilizadas como sistemas não virais de entrega de genes, entre os quais os poliplexos.

Os poliplexos estão rapidamente a emergir como sistemas de escolha para a entrega de vários ácidos nucleicos. Estes sistemas têm a capacidade de proteger eficientemente os ácidos nucleicos da degradação pelas nucleases, tanto *in vitro* como *in vivo*. Contudo, apesar dos significativos progressos, a incapacidade de entender o mecanismo de ação dos veículos de entrega de ácidos nucleicos continua a ser um impedimento no seu sucesso terapêutico, sendo difícil projetar novos veículos de entrega até ser estabelecida uma clara relação estrutura-atividade entre os agentes de transfecção e a eficiência de transfecção. (16,35) Posto isto, um dos principais focos de estudo deve ser elucidar o mecanismo de ação dos poliplexos que medeiam a entrega dos ácidos nucleicos. (16)

Os polímeros catiónicos, tanto naturais como sintéticos, com versátil funcionalidade, têm vindo a superar as expectativas como sistemas de entrega em terapia génica. (16,18) Durante os últimos anos, embora várias modificações tenham sido propostas para estes polímeros e estudos *in vitro* e *in vivo* tenham sido encorajados, ainda nenhum novo derivado polimérico foi identificado com aplicações terapêuticas. (16)

De notar que, os resultados positivos que têm vindo a ser alcançados nos vários estudos desenvolvidos, comprovam a potencial aplicação dos poliplexos na terapêutica de diversas

doenças, estimulando a contínua aposta no trabalho a desenvolver para a melhoria dos sistemas já desenvolvidos e no desenvolvimento de novas abordagens para futuramente aplicar.

Em suma, os poliplexos exibem um grande potencial para a utilização como sistemas de entrega de genes seguros e eficazes numa variedade de aplicações clínicas. (18) Todavia, esforços adicionais devem ser feitos de modo a ultrapassar os desafios enfrentados pelos nanotransportadores na terapia génica, acima mencionados. Estes devem especificamente centrar-se na melhoria da eficiência de transfecção e da especificidade para o alvo terapêutico, assim como na redução da toxicidade e na minimização de danos tecidulares. (1)

O futuro da terapia génica com os poliplexos deve basear-se essencialmente em ensaios *in vivo*, de forma a superar as barreiras físicas que estão a abrandar o seu progresso em estudos clínicos e o desenvolvimento de transportadores de genes eficazes. (9,36) Também o desenvolvimento de sistemas de transferência génica híbridos, reunindo as vantagens dos vetores virais e dos vetores não-virais, constitui uma alternativa a desenvolver, como forma de proporcionar a melhoria na eficiência de transfecção e na manutenção a longo prazo da expressão do gene de interesse *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

1. XU H., LI Z., SI J. - Nanocarriers in Gene Therapy: A Review. *J Biomed Nanotechnol.* 2014; 10(12):3483–507.
2. M. FOLDVARI, *et al.* - Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J. Control. Release.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.012>
3. RAMAMOORTHY M., NARVEKAR A. - Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2015; 9(1):GE01–06.
4. YIN H., KANASTY R. L., ELTOUKHY A. A., VEGAS A. J., DORKIN J. R., ANDERSON D. G. - Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014; 15(8):541–55.
5. BAJPAI A. K., BAJPAI J., SAINI R. K. - **Design and Development of Biopolymeric Nanocarriers for Gene Delivery.** In: GOVIL J., KUMAR A., *Biotechnology Volume 10 Nanobiotechnology*, Boston: Studium Press LLC, 2014. ISBN: 1-62699-025-5. p.151-177
6. LI L., WEI Y., GONG C. - Polymeric Nanocarriers for Non-Viral Gene Delivery. *J Biomed Nanotechnol.* 2015;11(5):739–70.
7. PEREIRA P., SOUSA F., FIGUEIRAS A. - **Polyplexes as Nanovectors for Gene Therapy.** In: GOVIL J. N., KUMAR A., *Biotechnology Volume 10 Nanobiotechnology*, Boston: Studium Press LLC, 2014. ISBN: 1-62699-025-5. p. 179–223
8. JAFARI M., SOLTANI M., NAAHIDI S., KARUNARATNE D. N., CHEN P. - Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery. *Curr Med Chem.* 2012;19(2):197–208.
9. AIED A., GREISER U., PANDIT A., WANG W. - Polymer gene delivery: overcoming the obstacles. *Drug Discov Today.* 2013; 18(21–22):1090–8.
10. NAMVAR A., BOLHASSANI A., KHAIRKHAH N., MOTEVALLI F. - Physicochemical properties of polymers: An important system to overcome the cell barriers in gene transfection. *Biopolymers*, 2015; 103 (7): 363–75.
11. CHIRA S., JACKSON C. S., OPREA I., OZTURK F., PEPPER M. S., DIACONU I., *et al.* - Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. *Oncotarget.* 2015, 6(31):30675–703.
12. KAMIMURA K., SUDA T., ZHANG G., LIU D. - Advances in Gene Delivery Systems. *Pharm Med.* 2011; 25 (5):293–306.
13. CEVHER E., DEMIR A., SEFIK E. - **Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy.** In: SEZER A. D., *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems.* InTech; 2012. ISBN: 978-953-51-0810-8. p. 437–470.
14. WANG W., LI W., MA N., STEINHOFF G. - Non-viral gene delivery methods. *Curr Pharm Biotechnol.* 2013;14(1):46–60.
15. NIKITENKO N. A., PRASSOLOV V. S. - Non-viral delivery and therapeutic application of small interfering RNAs. *Acta Naturae*, 2013; 5 (3(18)): 35–53.

16. NIMESH S., GUPTA N., CHANDRA R. - Cationic Polymer Based Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. *J Biomed Nanotechnol.* 2011; 7(4):504–20.
17. 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):240–55.
18. OLIVEIRA C., SILVEIRA I., VEIGA F., RIBEIRO AJ. - Recent advances in characterization of nonviral vectors for delivery of nucleic acids: impact on their biological performance. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015; 12(1):27–39.
19. KIM J., WILSON D. R., ZAMBONI C. G., GREEN JJ. - Targeted polymeric nanoparticles for cancer gene therapy. *J Drug Target.* 2015; 23(7–8):627–41.
20. AL-DOSARI M. S., GAO X. - Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *AAPS J.* 2009; 11(4):671–81.
21. PEREIRA P., JORGE A. F., MARTINS R., PAIS AACC, SOUSA F., FIGUEIRAS A. - Characterization of polyplexes involving small RNA. *J Colloid Interface Sci.* 2012; 387(1):84–94.
22. YAMEEN B., CHOI W.I., VILOS C., SWAMI A., SHI J., FAROKHZAD O.C. - Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Control Release.* 2014; 190:485–99.
23. KUNDU P.P., SARKAR K. - **Natural Polymeric Vectors in Gene Therapy.** In: KALIA S., AVÉROUS L., *Biopolymers*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. ISBN: 978-1-118-16479-3. p. 575–603.
24. SUM C. H., WETTIG S., SLAVCEV R. A. - Impact of DNA vector topology on non-viral gene therapeutic safety and efficacy. *Curr Gene Ther.* 2014; 14(4):309–29.
25. BUSCHMANN M. D., MERZOUKI A., LAVERTU M., THIBAUT M., JEAN M., DARRAS V. - Chitosans for delivery of nucleic acids. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013; 65(9):1234–70.
26. NAM J-P., NAH J-W. - Target gene delivery from targeting ligand conjugated chitosan–PEI copolymer for cancer therapy. *Carbohydr Polym.* 2016; 135:153–61.
27. KELES E., SONG Y., DU D., DONG W-J., LIN Y. - Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications. *Biomater Sci.* 2016; 4(9):1291–309.
28. LUK B. T., FANG R. H., ZHANG L. - Lipid- and polymer-based nanostructures for cancer theranostics. *Theranostics.* 2012; 2(12):1117–26.
29. LEE H-Y., MOHAMMED K. A., NASREEN N. - Nanoparticle-based targeted gene therapy for lung cancer. *Am J Cancer Res.* 2016; 6(5):1118–34.
30. SANTOS-CARBALLAL B., *et al.* - Physicochemical and biological characterization of chitosan-microRNA nanocomplexes for gene delivery to MCF-7 breast cancer cells. *Sci. Rep.* 5, 13567; doi: 10.1038/srep13567 (2015).

31. RAȚĂ DM, CHAILAN J-F, PEPTU CA, COSTULEANU M, POPA M. - Chitosan: poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride) nanocapsules - a promising alternative for the lung cancer treatment. *J Nanoparticle Res.* 2015. 17 (7): 316–26.
32. SU W-C, SU W-P, CHENG, SHIEH, YEH. - PLGA nanoparticles codeliver paclitaxel and Stat3 siRNA to overcome cellular resistance in lung cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7:4269–83.
33. CHEN S., LIU X., GONG W., YANG H., LUO D., ZUO X., LI W., WU P., LIU L., XU Q., JI A. - Combination therapy with VEGFR2 and EGFR siRNA enhances the antitumor effect of cisplatin in non-small cell lung cancer xenografts. *Oncol Rep.* 2012, 29: 260–68
34. PURAS G, ZARATE J, DÍAZ-TAHOSES A, AVILÉS-TRIGUEROS M, FERNÁNDEZ E, PEDRAZ JL. - Oligochitosan polyplexes as carriers for retinal gene delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 48(1–2):323–31.
35. YUE Y., WU C. - Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. *Biomater Sci.* 2013; 1(2):152–70.
36. MODRA K., DAI S., ZHANG H., SHI B., BI J. - Polycation-mediated gene delivery: Challenges and considerations for the process of plasmid DNA transfection. *Eng Life Sci.* 2015; 15(5):489–98.