



Daniela Filipa Domingues Santo

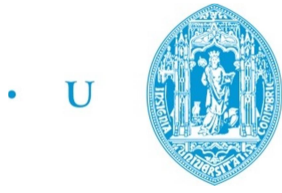
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE TRANSPORTE E ENTREGA DE MATERIAL GENÉTICO ASSOCIADA A DIFERENTES NANOSSISTEMAS DE BASE POLIMÉRICA

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Novembro de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



• U • C •

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Daniela Filipa Domingues Santo

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 Bioquímica. Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Vectores 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 Paula Veríssimo (CNC/UC).

Novembro de 2016

Agradecimentos

Apesar de esta tese de mestrado ter o meu nome como a pessoa responsável pela sua realização, na realidade, este projeto não seria possível sem a ajuda de muitas outras pessoas. Apesar das dificuldades e às vezes frustrações e desapontamentos inerentes à ciência, foi um ano de trabalho que, embora longo, se revelou incrivelmente fascinante e desafiante. Assim, gostaria de agradecer:

Em primeiro lugar, naturalmente, ao meu orientador, Doutor Henrique Faneca, pela orientação, apoio e disponibilidade prestados ao longo deste trabalho. Um profundo agradecimento por me ter incentivado, confiado e dado a oportunidade de crescer como investigadora, permitindo que participasse ativamente noutros projetos do grupo.

Quero também agradecer à Professora Doutora Paula Veríssimo, por ter aceitado ser minha orientadora interna e pela competência e apoio que sempre dedicou aos alunos de Bioquímica.

Gostaria de agradecer ao grupo de Síntese e Caracterização de Polímeros do departamento de engenharia química, da Universidade de Coimbra, responsável pela síntese dos polímeros catiónicos explorados neste trabalho.

Gostaria também de dedicar um agradecimento especial à Rose por todo o conhecimento que partilhou comigo, pelo profissionalismo, disponibilidade e ajuda em qualquer instância.

Gostaria de agradecer também à Dina Farinha e à Ana Fernandes pelo companheirismo e ensinamentos que me transmitiram.

Aos meus amigos por terem estado sempre presentes com palavras de apoio e motivação e por todos os momentos bem passados, que tornaram mais fácil ultrapassar algumas das adversidades deste percurso.

Quero agradecer também ao Ricardo que sempre me apoiou e motivou, com grande paciência, estando sempre ao meu lado neste período, sendo um grande alicerce na minha vida.

E em último lugar, mas em primeiro no meu coração, um agradecimento muito especial a toda a minha família, por todos os esforços que fizeram por mim, pelo apoio e dedicação. Dedico ainda um agradecimento especial à minha irmã, que na sua forma peculiar e divertida, me apoiou incondicionalmente.

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XIII
LISTA DE SIGLAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Terapia génica	2
1.2. Agentes terapêuticos e sistemas de entrega de material genético	5
1.2.1. Vetores virais	6
1.2.2. Vetores não virais	10
1.3. POLÍMEROS CATIONICOS.....	13
1.3.1. <i>Targeting</i> e internalização dos poliplexos	18
1.3.2. Escape endossomal.....	19
1.3.3. Internalização nuclear.....	21
1.4. OBJETIVOS	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Materiais	25
2.2. Cultura de células.....	25
2.3. Preparação dos poliplexos	26
2.4. Atividade Biológica	26

2.4.1.	Transfecção in vitro – ensaio de luminescência	26
2.4.2.	Eficiência da transfeção in vitro – citometria de fluxo.....	28
2.5.	Ensaio de viabilidade celular.....	29
2.6.	Estudo das vias endocíticas envolvidas na internalização dos poliplexos	29
2.7.	Caraterização físico-química dos poliplexos.....	30
2.7.1.	Análise da difusão dinâmica da luz e potencial Zeta.....	30
2.7.2.	Microscopia de Força Atómica.....	31
2.7.3.	Ensaio de intercalação de Brometo de Etídio.....	32
2.7.4.	Ensaio de eletroforese em gel de agarose.....	32
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1.	Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético de poliplexos baseados nos polímeros PAMA e copolímeros (PEG-b-PAMA).....	35
3.1.1.	Eficiência da transfeção in vitro - Ensaio de luminescência	36
3.1.2.	Viabilidade celular.....	44
3.1.3.	Condensação do material genético	49
3.2.	Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético de poliplexos baseados nos polímeros PDMAEMA e PβAE.....	51
3.2.1.	Eficiência da transfeção in vitro – Ensaio de luminescência.....	52
3.2.2.	Ensaio de viabilidade celular	59
3.2.3.	Eficiência da transfeção in vitro – Citometria de fluxo.....	65
3.2.4.	Estudo das vias endocíticas envolvidas na internalização dos poliplexos	66
3.2.5.	Caracterização físico-química dos poliplexos	71
4.1.	CONCLUSÃO	78
4.2.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	82
5.	BIBLIOGRAFIA	84

Lista de Figuras

Figura 1- Patologias alvo nos ensaios clínicos de terapia génica ⁵	3
Figura 2- Número de ensaios clínicos aprovados mundialmente envolvendo terapia génica entre 1989 e 2016 ⁵	4
Figura 3– Tipos de vetores utilizados nos ensaios clínicos de terapia génica ⁵	7
Figura 4– Representação da estrutura de um lípido catiónico típico (DOTAP).....	12
Figura 5-Os lípidos catiónicos formam estruturas vesiculares designadas lipossomas..	13
Figura 6– Barreiras a ter em conta no design de poliplexos para a entrega eficaz do material genético na célula alvo.....	15
Figura 7- Estrutura do polietilenoglicol (PEG).	15
Figura 8- Estrutura de vários polímeros catiónicos utilizados frequentemente na formação de poliplexos.	16
Figura 9– Escape endossomal dos poliplexos através do efeito “esponja de protões”.20	
Figura 10- Reação catalisada pela luciferase.....	27
Figura 11 - Estrutura química do homopolímero poli-2-aminoetil metacrilato (PAMA) (a) e do copolímero em bloco polietilenoglicol-poli-2-aminoetil metacrilato (PEG- <i>b</i> -PAMA) (b).....	35
Figura 12 - Efeito do rácio N/P e da composição dos poliplexos na expressão do gene luciferase em células cos-7.....	37
Figura 13- Efeito da presença de soro na atividade biológica dos diferentes poliplexos em células cos-7.....	39
Figura 14- Efeito do rácio N/P e da peguilação dos poliplexos na expressão do gene luciferase em células cos-7 na ausência de soro (a) e na presença de soro (b)..	43
Figura 15- Efeito da composição e do rácio N/P dos poliplexos na viabilidade celular na linha COS-7, na ausência de soro.....	45
Figura 16- Efeito da presença de soro na viabilidade das células cos-7 após o tratamento com diferentes poliplexos.....	47
Figura 17 - Efeito do rácio N/P e da peguilação dos poliplexos na viabilidade celular, na ausência de soro (a) e na presença de soro (b), em células cos-7.....	48
Figura 18- Acessibilidade do brometo de etídio ao ADN dos diferentes poliplexos preparados em vários rácios polímero/ADN N/P	50
Figura 19 - Efeito do rácio N/P e da composição dos poliplexos na expressão do gene luciferase em células cos-7.....	53

Figura 20- Efeito da presença de soro na atividade biológica dos diferentes políplexos em células Cos-7..	55
Figura 21 - Efeito da presença de soro na atividade biológica dos diferentes políplexos em células (a) A549, (b) MIA PaCa-2, (c) MDA-MB-231 e (d) Astrócitos humanos.	58
Figura 22 - Efeito da composição e do rácio N/P dos políplexos na viabilidade celular na linha COS-7.....	60
Figura 23– Efeito da presença de soro na viabilidade das células Cos-7, após o tratamento com os diferentes políplexos.....	62
Figura 24-Viabilidade das células (a) A549, (b) MIA PaCa-2, (c) MDA-MB-231 e (d) astrócitos, após o tratamento com os diferentes políplexos..	64
Figura 25 – Efeito da composição dos políplexos na expressão da proteína verde fluorescente, avaliada por citometria de fluxo, na presença de soro em células cos-7.....	65
Figura 26 - Efeito dos inibidores de endocitose na expressão do gene luciferase nas células Cos-7, após a transfeção com os políplexos baseados na combinação PDMAEMA:4PBAE..	69
Figura 27– Efeito dos inibidores de endocitose na viabilidade das células Cos-7, após a transfeção com os políplexos baseados na combinação PDMAEMA:4PBAE.	86
Figura 28- Caracterização físico-química e morfológica dos políplexos: (a) Tamanho, (b) potencial zeta e (c) microscopia de força atómica (AFM) ..	72
Figura 29- Acessibilidade do brometo de etídio ao DNA dos diferentes políplexos preparados em vários rácios polímero/DNA N/P.....	74
Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose para os diferentes políplexos.	76

Lista de Tabelas

Tabela 1– Sistemas de transporte e entrega de material genético.	5
Tabela 2- Alguns dos vetores virais mais utilizados como sistema de entrega de genes. 9	
Tabela 3- Principais métodos físicos de entrega de material genético.....	11
Tabela 4- Desafios associados à entrega eficaz do material genético dos poliplexos e as estratégias mais comuns para os ultrapassar.	22
Tabela 5- Grau de polimerização e peso molecular dos copolímeros PEG-b-PAMA e dos homopolímeros PAMA.....	36
Tabela 6- Estrutura química, grau de polimerização monómero (GP) e peso molecular dos polímeros PDMAEMA e P β AE	52
Tabela 7– Inibidores de encocitose e respectivas vias de atuação.	67

A terapia génica é uma estratégia terapêutica bastante promissora, que permite não só tratar, como também prevenir ou eliminar as causas de uma patologia, alterando o atual paradigma da medicina. Esta modalidade terapêutica tem sido aplicada em diversas patologias, de origem hereditária ou multifactorial. No entanto, o desenvolvimento de sistemas de transporte e entrega de material genético seguros e eficazes continua a ser um dos principais desafios para a sua implementação clínica.

Embora a eficácia dos vetores não-virais seja inferior à dos vetores baseados em vírus, estes apresentam algumas vantagens, quando comparados com os vetores virais, como por exemplo a baixa imunogenicidade, facilidade de produção, estabilidade, e a capacidade de transportar sequências nucleotídicas maiores. Entre os vetores não-virais, os sistemas de base polimérica têm-se revelado vetores bastante promissores para o transporte e entrega de material genético, destacando-se pela sua versatilidade, pela variedade de métodos de síntese disponíveis e pela facilidade de funcionalização química, que permitem a optimização da sua relação estrutura/atividade, a fim de incrementar a eficácia do nanossistema.

Nexte contexto, o objectivo deste trabalho consistiu em desenvolver um nanossistema de transporte e entrega de material genético de base polimérica, eficaz e inovador, que induzisse uma elevada expressão do transgene, aliada a uma reduzida citotoxicidade.

Deste modo, avaliou-se atividade biológica de poliplexos baseados no polímero poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PAMA), com diferentes pesos moleculares e copolimerizado com o polietilenoglicol (PEG). Foram também avaliados outros parâmetros como a sua citotoxicidade e a capacidade de condensação do ADN. Os resultados obtidos, na presença de soro, demonstraram que os copolímeros em bloco PEG-*b*-PAMA, promovem a formação de poliplexos com uma capacidade de transfeção superior à dos poliplexos baseados, exclusivamente, nos homopolímeros PAMA correspondentes. A copolimerização com o PEG promoveu, também, a diminuição da citotoxicidade dos poliplexos. Ainda assim, e embora os poliplexos baseados no copolímero PEG-*b*-PAMA₂₈₉₀₀ demonstrassem uma eficácia de transfeção bastante superior à obtida com a referência padrão dos sistemas de base polimérica, a

polietilenimina ramificada (bPEI), estes nanossistemas induziram níveis de citotoxicidade demasiado elevados, que comprometem a sua aplicação *in vivo*.

Assim sendo, posteriormente, foi avaliada a capacidade de transporte e entrega de material genético de poliplexos baseados na combinação dos polímeros poli(metacrilato de etilo-2-dimetilamino) (PDMAEMA) e poli(β -amino éster) (P β AE), em diferentes proporções. Para tal, avaliou-se a atividade biológica e a citotoxicidade das formulações em várias linhas celulares e analisou-se o seu mecanismo de internalização celular. Procedeu-se ainda à caracterização físico-química das formulações preparadas com a combinação mais promissora, tendo sido avaliado o tamanho, a carga superficial e a capacidade de condensação/proteção do ADN. Os resultados obtidos demonstraram que a combinação dos polímeros PDMAEMA e P β AE conduz à formação de poliplexos que tem a capacidade de entregar o material genético no núcleo. Os poliplexos preparados com a combinação PDMAEMA:4P β AE, na razão de carga N/P 25/1, foram selecionados como a melhor formulação, devido à sua elevada capacidade de transfeção, mesmo na presença de soro, e aos reduzidos níveis de citotoxicidade. Adicionalmente, os outros ensaios experimentais demonstraram que os poliplexos baseados nesta combinação de polímeros são internalizados, maioritariamente, por endocitose mediada por clatrina, promovendo a expressão do transgene numa elevada percentagem de células. Para além disso, estes nanossistemas apresentam uma elevada proteção de material genético e um tamanho reduzido, características estas favoráveis à sua aplicação *in vivo*.

Palavras-chave: Terapia Génica, sistema de transporte e entrega de material genético, poliplexos, polímeros catiónicos, combinação de polímeros.

Abstract

Gene therapy is a very promising therapeutic strategy that allows not only to treat but also to prevent or eliminate the causes of a disease, changing the current medicine's paradigm. This therapeutic technique has been applied in several pathologies, from hereditary to multifactorial diseases. However, the development of safe and effective gene delivery systems remains one of the main challenges to its clinical application.

Although non-viral delivery systems are less effective than the viral ones, they offer several advantages, when compared to viral vectors, including low immunogenicity, ease in production, stability, and higher capacity to carry nucleic acids. Among non-viral vectors, polymeric-based ones have emerged as promising systems for the transport and delivery of genetic material. These gene carriers are advantageous especially due to their versatility, the number of synthetic methods available and the facile chemical functionalization, which allows the optimization of their structure/activity relationship in order to increase the efficiency of the nanosystem.

In this context, the aim of this work was to develop a novel and effective polymeric-based gene delivery system, which would induce a high expression of the transgene with reduced cytotoxicity.

Therefore, the biological activity of polyplexes based on poly(2-aminoethyl methacrylate) (PAMA) polymer, with different molecular weights and copolymerized with polyethylene glycol (PEG), was evaluated. Other parameters, such as its cytotoxicity and the ability to condense DNA, were also tested. The results obtained in the presence of serum demonstrated that PEG-*b*-PAMA block copolymer promotes the formation of polyplexes with higher transfection activity than the corresponding homopolymer PAMA-based polyplexes. The copolymerization with PEG also promoted a decrease of cytotoxicity of the polyplexes. Nevertheless, and although the PEG-*b*-PAMA₂₈₉₀₀-based polyplexes demonstrated a transfection efficiency much higher than the obtained with the standard reference of the polymer-based systems, the branched poly(ethyleneimine) (bPEI), these nanosystems induced high levels of cytotoxicity, which compromise their *in vivo* application.

Therefore, the ability to transport and deliver genetic material associated to polyplexes based on a combination of different proportions of poly(β -amino ester)

(P β AE) and poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] (PDMAEMA) was evaluated. For this purpose, the biological activity and the cytotoxicity of the formulations were evaluated in different cell lines and their mechanism of cellular internalization was also studied. The physicochemical characterization of the most promising formulations was performed in order to obtain the size, surface charge and condensation/protection ability of the DNA. The obtained results demonstrated that the combination of PDMAEMA and P β AE polymers leads to the formation of polyplexes that have the ability to deliver the genetic material into the nucleus. The polyplexes prepared with the combination PDMAEMA: 4P β AE, in the N/P 25/1 ratio, were selected as the best formulation due to their high transfection activity, even in the presence of serum, and their reduced levels of cytotoxicity. In addition, the other experimental studies have demonstrated that these polyplexes based on this combination of polymers are internalized mostly by clathrin-mediated endocytosis, promoting the transgene expression in a high percentage of cells. Moreover, these nanosystems present a high protection of genetic material and reduced size, which are suitable physicochemical properties for *in vivo* applications.

Keywords: gene therapy, gene delivery, polyplexes, cationic polymers, combination of polymers

Lista de Siglas

ADN - Ácido desoxirribonucleico
AFM- Microscopia de Força Atômica
ARN- Ácido ribonucleico
ATRP - Polimerização radicalar por transferência de átomo
bPEI - Polietilenimina ramificada
BSA - Albumina do soro bovino
DLS - Difusão Dinâmica da Luz
DMEM-HG - Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose
EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético
EtBr - Brometo de etídio
FBS - Soro fetal bovino
GFP - Proteína verde Fluorescente
GP - Grau de polimerização
Luc - Luciferase
Mn - Peso molecular
N/P - Rácio azoto/fosfato
PAMA - poli (metacrilato de 2-aminoetil)
PAMA-b-PEG – polietilenoglicol-poli-(metacrilato de 2-aminoetil)
PBS - Tampão fosfato-salino
PDMAEMA - Poli(metacrilato de etilo-2-dimetilamino
pADN - Plasmídeo de ácido desoxirribonucleico
P β AE - Poli (β -amino éster)
PEG -Poli(etileno glicol)
PEI - Polietilenimina
RES- Sistema Reticuloendotelial
RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium
¹H RMN - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Terapia génica

A terapia génica é uma estratégia terapêutica que consiste na transferência de material genético exógeno para uma célula específica, a fim de obter um efeito terapêutico, corrigindo a expressão dos genes responsáveis pela situação patológica¹. Enquanto que a maioria das estratégias terapêuticas implementadas apenas combatem os sintomas da doença, a terapia génica é uma alternativa promissora que tem como objetivo prevenir, tratar ou eliminar as suas causas². Para alcançar estes objectivos, a terapia génica exige o desenvolvimento de sistemas de entrega de genes capazes de transferir o material genético, de um modo seguro e eficaz, numa grande diversidade de células.

A terapia génica é subdividida em duas categorias distintas: a terapia génica germinativa e a terapia génica somática¹. A terapia génica germinativa envolve a manipulação do material genético das células germinativas, pelo que as alterações induzidas no genoma são hereditárias. A terapia génica somática envolve apenas a manipulação de células diplóides, pelo que a alteração genómica promovida não afecta as gerações seguintes³. Embora a terapia génica germinativa permitisse erradicar doenças genéticas hereditárias, a sua aplicação é limitada por questões técnicas, éticas e de segurança. Deste modo, a terapia génica somática, que possibilita a transferência do material genético *ex vivo*, *in situ* ou *in vivo*, é a alternativa mais viável e realista para um futuro próximo^{3,4}.

A terapia génica é uma estratégia terapêutica que tem vindo a ser explorada para uma enorme diversidade de patologias⁵ (Figura 1). Apesar de, inicialmente, estar focada no tratamento de doenças monogénicas, como a fibrose cística ou a hemofilia, actualmente a comunidade científica procura aplicar esta modalidade terapêutica a doenças poligénicas, tais como: cancro, doenças cardiovasculares, alterações neurodegenerativas, artrite, diabetes mellitus, entre outras⁶. A elevada taxa de mortalidade do cancro, associada à ineficácia das estratégias terapêuticas implementadas, leva a que a maioria dos ensaios clínicos de terapia génica sejam direccionados (64,4%)⁵. Com uma percentagem também relevante, destacam-se as

doenças monogénicas, cardiovasculares ou infecciosas, que representam cerca de 25% dos ensaios clínicos realizados até à data.

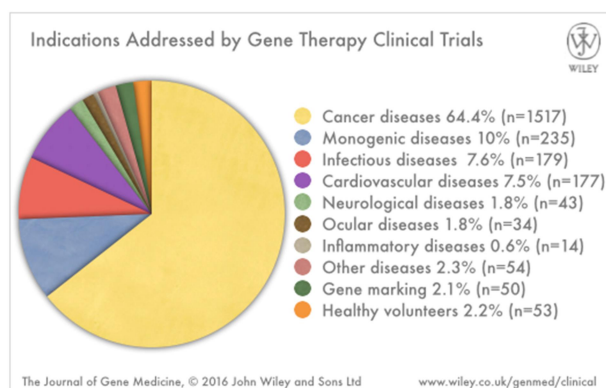


Figura 1- Patologias alvo nos ensaios clínicos de terapia génica⁵.

Em 1990 foi realizado o primeiro ensaio clínico de terapia génica. Blaese e a sua equipa introduziram um gene terapêutico em linfócitos T do sangue periférico de duas crianças com imunodeficiência combinada severa, patologia caracterizada pelo défice da enzima adenosina deaminase⁷. Desde esse período, verificou-se um crescimento exponencial na identificação de genes associados a patologias, bem como no desenvolvimento de vetores capazes de os transportar, facto este que se espelha no aumento do número de ensaios clínicos realizados nos últimos anos (Figura 2)⁸. No entanto, a história da terapia génica é também marcada por alguns incidentes graves, cujo efeito é observado pela diminuição do número de ensaios clínicos realizados nos anos seguintes a que esses incidentes são reportados. Dos efeitos adversos registados destaca-se, em 1999, a ocorrência de uma morte causada pela elevada imunogenicidade de um vetor adenoviral⁹ e, em 2002, o desenvolvimento de leucemia, como consequência de uma mutagénese insercional induzida por um retrovírus¹⁰.

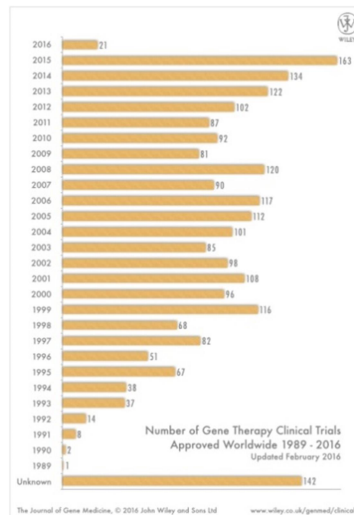


Figura 2- Número de ensaios clínicos aprovados mundialmente envolvendo terapia génica entre 1989 e 2016⁵.

A terapia génica, embora seja um estratégia bastante promissora, apresenta algumas limitações que condicionam a sua aplicação clínica. A complexidade das patologias é um dos fatores limitantes, pois o sucesso da terapia génica pode ser comprometido pela causa multifactorial das patologias alvo. Para ultrapassar esta limitação é necessário explorar e interpretar, do ponto de vista da biologia molecular, as alterações decorrentes bem como as consequências funcionais, para que se possa actuar no alvo molecular correto. Ainda assim, a segurança e/ou eficácia dos diferentes sistemas de entrega de material genético continuam a ser o maior desafio para a sua aplicação na fase clínica¹¹.

Até à data, apenas três estratégias de terapia génica foram comercializadas¹²: Gendicine™, um vetor adenoviral contendo o gene que codifica a proteína p53, aprovado na China em 2003, para o tratamento do cancro da cabeça e pescoço¹³; Glybera®, um vetor viral adenoassociado, aprovado na Europa em 2012, para o tratamento da deficiência da lipoproteína lipase¹⁴; Imlygic™, aprovado em 2015 pela FDA, um vetor viral herpes simplex, geneticamente modificado de modo a promover uma resposta antitumoral seletiva, através da replicação viral nas células tumorais e da estimulação do sistema imunitário, através da expressão do fator de crescimento de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)¹⁵.

1.2. Agentes terapêuticos e sistemas de entrega de material genético

Nas estratégias de terapia gênica existem dois componentes igualmente cruciais: o agente genético (ácidos nucleicos) e o sistema de entrega do material genético¹⁶. Quanto ao agente terapêutico, uma das estratégias mais utilizadas é inclusão de uma sequência transgênica num plasmídeo de ADN (pADN). A utilização do plasmídeo apresenta algumas vantagens, tais como a facilidade de construção, manipulação, produção e armazenamento, assim como a capacidade de inclusão de sequências nucleotídicas maiores e um risco muito menor de mutagênese insercional, em comparação com vetores virais. Alternativamente, pode-se recorrer a estratégias de interferência de ARN, tais como *microARN* (miARN), *small interfering ARNs* (siARNs), *short hairpin ARNs* (shARNs) e oligonucleótidos *antisense*. Apesar de ambas terem a mesma base molecular, enfrentam diferentes desafios relativamente à entrega do material genético, já que o seu tamanho, a estabilidade dos complexos formados e o mecanismo/local de ação são diferentes¹⁷. Estas moléculas, para além de serem bastante susceptíveis à degradação enzimática e à depuração renal e hepática, têm, devido à sua natureza aniónica, uma capacidade limitada de atravessar as membranas celulares. Assim, o desenvolvimento de sistema de entrega de material genético é da maior importância para impulsionar a implementação clínica da terapia gênica¹⁶. Os vetores utilizados como sistemas de entrega de genes podem ser classificados como vetores virais e vetores não virais (Tabela 1), sendo a sua eficácia definida com base na sua capacidade de transdução e transfecção, respectivamente. A transdução e transfecção são termos que englobam todo o percurso do vetor, desde a entrada na célula até à expressão do gene.

Tabela 1– Sistemas de transporte e entrega de material genético.

Vetores Virais	Vetores não-virais	
	Métodos Físicos	Métodos Químicos
Adenovírus	Eletroporação	
Vírus adenoassociados	Sonoporação	Base Lípidica
Lentivirus		
Retrovírus	Injeção	Base Polimérica
Vírus Herpes simplex	hidrodinâmica	

Um vetor de terapia génica eficaz, seja qual for a via pela qual é administrado, tem de ser absorvido pelo tecido alvo e promover níveis terapêuticos de expressão génica. No entanto, a distribuição do vector após a administração é condicionada por várias barreiras fisiológicas. A ativação do sistema imunitário, contra o vector, ou contra o produto resultante da expressão do transgene, é uma das maiores limitações da terapia génica¹⁸. A imunogenicidade excessiva é um dos maiores problemas dos vetores virais que são, naturalmente, reconhecidos e eliminados como agentes patogénicos. No entanto, os vetores não virais também conduzem à ativação do sistema imune inato, que medeia a eliminação dos nanossistemas através da opsonização ou fagocitose¹⁹. A elevada concentração de sais, característica dos fluídos fisiológicos, reduz as repulsões electrostáticas entre os vetores catiónicos, levando à agregação dos nanossistemas. Para além da instabilidade coloidal, as interações inespecíficas com as proteínas plasmáticas, como por exemplo a albumina, também induzem a agregação das nanopátulas. O agregado formado, para além de ser rapidamente eliminado pelos macrófagos, levando à diminuição da expressão do transgene, pode induzir a embolia dos capilares pulmonares²⁰.

Os sistemas de entrega de ADN, depois de sofrerem a acumulação no tecido alvo e a internalização celular, têm ainda de evitar a degradação lisossomal e aceder à maquinaria de transcrição localizada no núcleo. A internalização nuclear destaca-se como uma das principais barreiras na transfecção de células quiescentes com sistemas não virais, pois o envelope nuclear destas células encontra-se permanentemente intacto, impedindo a penetração do material genético²¹.

Dado o elevado espectro de patologias em que a terapia génica pode atuar, não existe um sistema de entrega único, cujas propriedades sejam desejáveis para todas as aplicações. No entanto, para uma aplicação específica, um vector “ideal” deve ser administrado por uma via não invasiva, deve ser seletivo para um determinado tipo de células ou tecido, e expressar, de forma controlada, uma quantidade de material genético suficiente para exercer uma acção terapêutica⁴.

1.2.1. Vetores virais

O ciclo de vida de um vírus consiste primeiramente na infecção, na qual ocorre a introdução do genoma viral na célula hospedeira, seguindo-se a replicação do material

genético, que culmina na formação de novas partículas virais que são, posteriormente, libertadas pela célula²². Esta capacidade de infecção inerente aos vírus, associada ao desenvolvimento da engenharia genética, possibilitou o desenvolvimento de vetores com elevada capacidade de transdução. Aproximadamente 70% dos ensaios clínicos de terapia génica recorrem a vetores virais, nos quais o genoma viral é manipulado, sendo substituídos os genes associados a patogenicidade dos vírus por genes terapêuticos²³ (Figura 3).

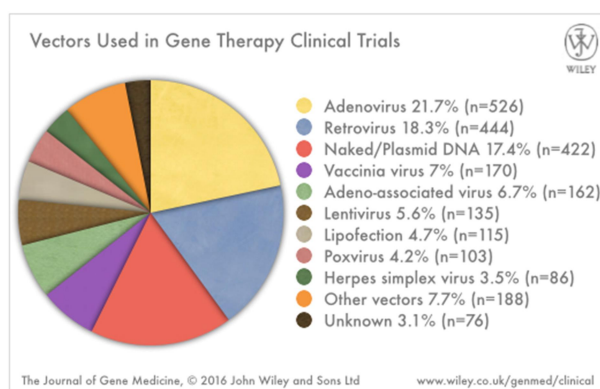


Figura 3 – Tipos de vetores utilizados nos ensaios clínicos de terapia génica⁵.

Os vetores virais subdividem-se em duas categorias: os vetores de integração e os vetores episomais. Os vetores de integração inserem o seu genoma no cromossoma da célula hospedeira, enquanto que, os vetores episomais são mantidos como um elemento genético extracromossomal. Os vetores de integração permitem uma expressão a longo prazo, já a expressão dos vetores episomais, embora seja igualmente eficiente, é apenas temporária, pois é diluída pelas sucessivas replicações celulares. Assim, a escolha do vetor viral depende da patologia a que a terapia génica se destina. Enquanto que doenças genéticas exigem uma expressão prolongada do transgene, algumas patologias, como por exemplo cancro, exigem níveis de expressão elevados, mas transientes.

Os tipos de vírus mais explorados como vetores de terapia génica são os adenovírus, retrovírus, vírus adenoassociados, os lentivírus e os vírus Herpes Simplex (Tabela 2).

Os vetores retrovirais foram os primeiros vetores virais a serem utilizados em ensaios clínicos de terapia génica²⁰. No entanto, o risco elevado de mutagenese insercional^{22,23}, associado à integração aleatória do genoma retroviral no genoma da célula hospedeira, limita a sua utilização como vetor.

Os adenovírus são o tipo de vírus mais utilizado como vetor viral em ensaios clínicos de terapia gênica, destacando-se pela capacidade de acomodar grandes sequências gênicas (aproximadamente 37 Kb) e pela facilidade de purificação, o que simplifica o processo de produção em larga escala²⁴. Os adenovírus são utilizados na transdução de células em divisão e células quiescentes numa grande diversidade de tecidos, permitindo obter, embora de forma transiente, elevados níveis de transdução. Apesar das vantagens acima referidas, a utilização deste vetor está associada a elevados níveis de imunogenicidade, pois cerca de 80% da população saudável tem anticorpos contra os mais de quarenta serotipos de adenovírus^{23,25}.

Os vetores adenoassociados apresentam características semelhantes aos vetores adenovirais, no entanto são menos imunogênicos⁴. Estes vetores podem manter o seu genoma num epissoma linear, ou, caso codifiquem o gene *rep*, integram o seu genoma num local específico do cromossoma 19²⁶. No entanto, estes vetores apresentam algumas limitações, tais como um processo de produção complicado, uma capacidade limitada de incorporação do transgene (até 4,8 kb) e a necessidade de co-infecção com um vírus auxiliar (adenovírus ou vírus herpes simplex).

Os lentivírus são uma subclasse dos retrovírus, que se destaca pela sua capacidade natural de infectar células quiescentes, pela expressão estável do transgene a longo prazo e pela capacidade para acomodar maiores sequências gênicas^{22,27}. Para além disso, este sistema viral apresenta um nível baixo de imunogenicidade. Devido ao elevado tropismo para as células estaminais neurais, os lentivírus tem sido amplamente utilizados na transferência de genes ex-vivo no sistema nervoso central²⁸.

Os vírus Herpes Simplex apresentam várias propriedades que os enaltecem como vetores, tais como: a capacidade de acomodar grandes sequências gênicas (50 kb) e a infeção do sistema nervoso, com a permanência num estado latente que pode, posteriormente ser reactivado, prolongando a expressão do transgene²⁹. Outra característica relevante destes vetores é sua capacidade de replicação seletiva em células tumorais, conseguida devido à complexidade genética do genoma viral, que permite obter diferentes tipos de vectores atenuados com propriedades oncolíticas³⁰. No entanto, o maior obstáculo à utilização destes vetores é a imunidade pré-existente, que promove a eliminação dos vetores e das células transduzidas que expressam as proteínas virais. Outra das limitações é a possibilidade de recombinação entre o genoma *wild-type*, presente nas células transduzidas e em estado latente, e o genoma do vetor²³.

Tabela 2- Alguns dos vetores virais mais utilizados como sistema de entrega de genes.

Vetor	Packaging capacity	Tropismo	Genoma vetorial	Expressão do transgene
Adenovírus	37 kb	Células quiescentes e células em divisão	Epissomal	Transiente
Retrovírus	8 kb	Células em divisão	Integrado	Prolongada
Vírus Adenoassociados	< 5 kb	Células quiescentes e células em divisão	Epissomal (integrado no cromossoma 19 se contiver o gene <i>rep</i>)	Prolongada
Lentivírus	8 kb	Células quiescentes e células em divisão	Integrado	Prolongada
Vírus Herpes Simplex	>30 kb	Células quiescentes e células em divisão	Epissomal	Transiente

Apesar da elevada capacidade de transdução, os vetores virais apresentam algumas limitações graves, tais como o potencial carcinogénico, a elevada imunogenicidade, a inflamação dos tecidos e o potencial para formar outros vírus e gerar outras partículas virais por recombinação. Para além disso, estes sistemas de entrega apresentam restrições no tamanho do gene inserido, dificuldade de produção e um custo excessivo⁶.

De modo a otimizar a sua eficácia como sistemas de transporte e entrega de material genético têm sido feitas várias alterações nos genomas virais³¹. Essas alterações podem envolver uma ampla variedade de características, tais como: uma melhor capacidade de infecção, a capacidade de se direcionarem de forma específica para determinados marcadores celulares, ou a capacidade de inserção de maiores sequências génicas³².

1.2.2. Vetores não virais

Os vetores não virais surgiram como uma alternativa aos sistemas virais, tendo-se tornado particularmente benéficos para estratégias terapêuticas que impliquem mais do que uma administração. Embora a eficiência de transfeção dos sistemas não virais seja inferior à dos sistemas virais, estes têm a capacidade de direcionar a entrega do transgene para uma população celular específica, com níveis de imunogenicidade reduzidos. Para além disso, estes vetores não têm potencial carcinogénico e permitem a utilização de maiores sequências génicas²⁰.

Os sistemas não virais podem ser subdivididos em dois grupos distintos: baseados em métodos físicos ou baseados em químicos de entrega do material genético²⁰.

1.2.2.1. Métodos Físicos

Os métodos físicos utilizados na entrega do material genético, *in vitro* ou *in vivo*, baseiam-se na indução da destabilização da membrana celular, a fim de alterar o seu estado de permeabilização, para que moléculas exógenas, tais como o ADN, possam entrar na célula³³. Essa destabilização pode ser induzida através da utilização de impulsos eléctricos de alta intensidade (electroporação)^{34,35}, ultra-sons (sonoporação)^{36,37} ou de um campo magnético (*magnetofection*) (Tabela 3).

Tabela 3- Principais métodos físicos de entrega de material genético.

Método Físico	Princípio	Vantagens	Desvantagens
<i>Microinjeção de ADN</i>	Injeção manual	Seguro Simples	Baixa eficácia da transfeção Não aplicável <i>in vivo</i>
<i>Gene gun</i>	Bombardeamento de partícula a alta velocidade	Citotoxicidade reduzida	Pouca penetração dos tecidos (órgãos internos)
Electroporação	Campo eléctrico induz a permeabilização da membrana e/ou mobilidade eletroforética	Eficiência elevada	Danos nos tecidos Acessibilidade limitada dos eletrodos a órgãos internos
Sonoporação	Ultrassons induzem a permeabilização da membrana citoplasmática	Imagiologia	Eficácia reduzida
<i>Magnofection</i>	Complexação do material genético em partículas magnéticas que são posteriormente concentradas na célula alvo pela aplicação de um campo magnético	Económico	Eficácia reduzida
<i>Injeção hidrodinâmica</i>	Pressão hidrodinâmica, gerada pela injeção rápida de um volume grande da solução de ADN (8 a 12% do peso corporal), induz a permeabilização da membrana	Simples Eficiência elevada	Dificuldade de controlar a cinética da injeção (volume e velocidade) Danos nos tecidos

A injeção direta de material genético no citoplasma ou no núcleo da célula é um método que, possivelmente devido à sua simplicidade e segurança, assume uma posição proeminente em ensaios clínicos de terapia génica³³ (Figura 3). No entanto, a eficiência desta estratégia é relativamente baixa, pois o material genético é rapidamente degradado pelas endonucleases plasmáticas³⁸.

1.2.2.2. Métodos Químicos

Os métodos químicos de entrega de material genético são mais comuns do que os métodos físicos, sendo geralmente baseados em nanopartículas. As nanopartículas, definidas como dispersões de partículas ou partículas sólidas com um tamanho na gama de 1-100 nm, têm-se revelado potenciais sistemas de entrega de uma enorme diversidade de moléculas terapêuticas, tais como agentes antibacterianos³⁹ e anticancerígenos⁴⁰, hormonas⁴¹, proteínas⁴², vacinas⁴³ e material genético^{21 44}.

A elevada razão área superficial/volume das nanopartículas possibilita a modificação da sua superfície com grupos funcionais que permitem controlar as propriedades farmacocinéticas de libertação do material genético e a biodistribuição das partículas⁴⁵. Para além disso, em comparação com os sistemas virais, as nanopartículas permitem a compactação de um plasmídeo de maiores dimensões e não apresentam níveis de imunogenicidade e toxicidade tão elevados.

As nanopartículas podem ser de base polimérica⁴⁶, de base lipídica⁴⁷, ou nanopartículas inorgânicas⁴⁸. As nanopartículas mais utilizadas como vetores de material genético são de base lipídica ou polimérica, sendo que, recentemente, as vantagens de cada um destes sistemas tem sido conjugada em nanopartículas híbridas polímero-lípido⁴⁹. De um modo geral, estes vetores sintéticos são materiais com capacidade de formar ligações electrostáticas com o ADN ou o ARN, condensando o material genético em nanopartículas com diâmetro de algumas dezenas a centenas de nanómetros, que garantem a proteção dos genes e medeiam a sua entrada na célula.

Os lipossomas, nanossistemas amplamente utilizados em estratégias de terapia génica, destacam-se pela sua diversidade, dado que existe um vasta gama de lípidos sintéticos e naturais disponível. Os lípidos catiónicos são moléculas anfifílicas, que contém um domínio hidrofílico, carregado positivamente, ligado a uma porção hidrofóbica através de um espaçador.

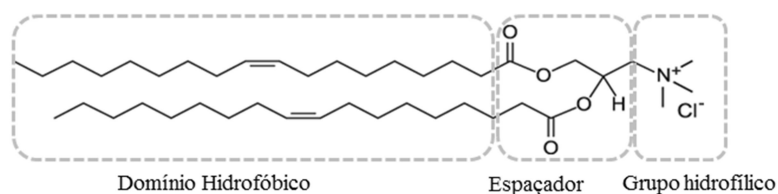


Figura 4 – Representação da estrutura de um lípido catiónico típico (DOTAP).

Embora os três constituintes influenciem a estrutura final do lipossoma, o domínio hidrofílico, carregado positivamente, é o que tem maior influência na eficácia da transfecção. Este grupo estabelece interações electrostáticas com o grupo fosfato dos ácidos nucleicos levando à formação de complexos designados lipoplexos.

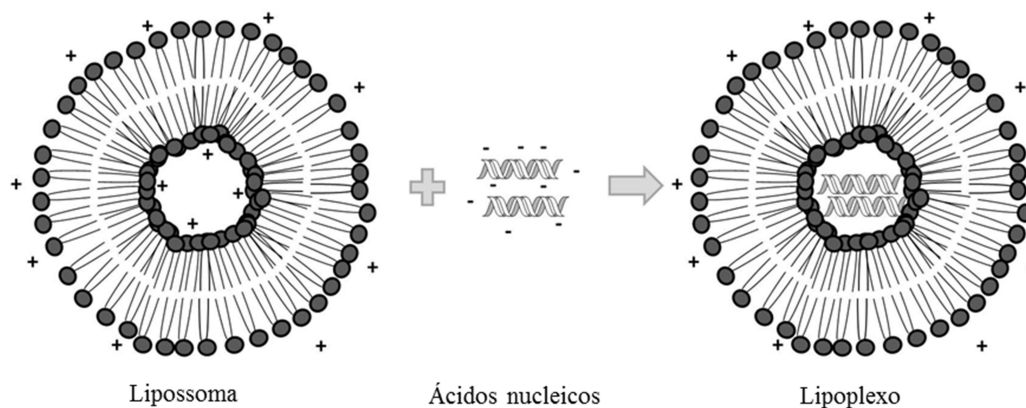


Figura 5 -Os lípidos catiónicos formam estruturas vesiculares designadas lipossomas. Os lipossomas são complexados com ácidos nucleicos dando origem aos lipoplexos. (Imagem representativa cedida pelo autor de:Cordeiro, R. A. *Development of non-viral vectors based on poly(B-amino ester) segments for gene delivery*. (University of Coimbra, 2015).

A biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade ou toxidade moderada são as principais vantagens destes vetores. No entanto, a sua aplicação *in vivo* é limitada por vários fatores, tais como: reduzida eficácia de transfecção, instabilidade coloidal, susceptibilidade de agregação na circulação sanguínea e dificuldade da síntese em larga escala⁵⁰.

As nanopartículas poliméricas surgem como uma classe de vetores não-virais bastante promissora, destacando-se pela diversidade química e facilidade de funcionalização. Uma vez que os vetores utilizados neste projeto são de base polimérica, o próximo ponto será dedicado à sua discussão mais pormenorizada.

1.3. Polímeros catiónicos

Os polímeros catiónicos têm vindo a revelar-se sistemas de entrega bastante atrativos para a terapia génica, destacando-se pela facilidade com que as suas propriedades físico-químicas são moduladas⁵¹. As interações electrostáticas estabelecidas entre os grupos catiónicos do polímero (aminas) e os grupos aniónicos dos ácidos nucleicos (grupos fosfato) levam à formação de complexos, designados

poliPLEXOS. Estas interações devem ser suficientemente fortes para proteger o material genético de enzimas nucleolíticas mas, ao mesmo tempo, permitir a entrega e libertação eficiente do material genético na célula alvo.

A variedade de métodos de síntese, aleada à enorme diversidade de polímeros existentes, permite obter nanopartículas poliméricas com diversas funcionalidades e propriedades físico-químicas⁵². Estes vetores, apresentam ainda algumas vantagens sobre os lipoplexos, tais como a capacidade de penetração de tecidos, a estabilidade em fluidos fisiológicos e a versatilidade de perfis de libertação controlada⁵³.

No entanto, a utilização de nanopartículas poliméricas catiónicas apresenta algumas limitações, tais como o uso de solventes orgânicos tóxicos no processo de produção, o encapsulamento ineficaz de agentes terapêuticos de natureza hidrofílica e problemas de produção em larga escala^{51,53}. A aplicação de nanopartículas poliméricas *in vivo* é limitada, essencialmente, pela citotoxicidade dos poliPLEXOS e pela reduzida eficácia da transfecção. A citotoxicidade é influenciada por várias propriedades do polímero, tais como o peso molecular, a densidade de carga, a estrutura e a flexibilidade conformacional⁵⁴. Embora a natureza catiónica do polímero promova a internalização celular, a carga positiva dos complexos interage com componentes celulares, inibindo alguns processos celulares, tais como a atividade de canais iónicos e receptores membranares, com conseqüente alteração do metabolismo celular⁵⁵. Por exemplo, a citotoxicidade induzida pelo polímero PEI, *in vivo*, é devida à destabilização da membrana celular dos glóbulos vermelhos, que conduz à ativação de processos necróticos, apoptóticos e de autofagia⁵⁶. O tamanho dos poliPLEXOS é também um fator limitante para a biocompatibilidade do nanossistema^{57,58}. Geralmente, se os complexos forem demasiado grandes ocorre a sua acumulação no fígado (50 a 100 nm), no baço (>200 nm) ou nos capilares pulmonares (2–5 µm)⁵⁷. No entanto, se as nanopartículas forem demasiadamente pequenas, com um diâmetro inferior a 5nm, sofrem depuração renal, após administração intravenosa⁵⁹. Quanto à eficácia da transfecção, esta é condicionada pela capacidade dos poliPLEXOS ultrapassarem uma série de barreiras extra e intracelulares (Figura 6).

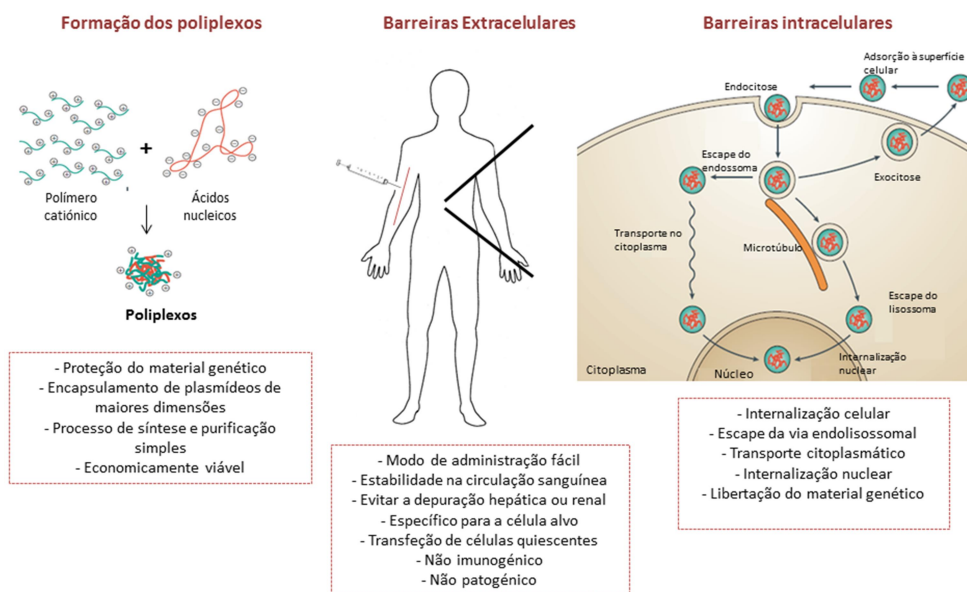


Figura 6– Barreiras a ter em conta no design de poliplexos para a entrega eficaz do material genético na célula alvo. (Adaptado de Nat. Rev. Drug Discov. 4, 581–93 (2005)).

A agregação das nanopartículas poliméricas, resultante da interação destas com as proteínas plasmáticas (carregadas negativamente) e, a consequente eliminação do vetor pelas células fagocíticas ou através do sistema reticuloendotelial⁶⁰, é um fator limitante para a eficácia da transfeção *in vivo*²¹. Deste modo, a adição de monómeros hidrofílicos ao polímero, tais como o polietilenoglicol (PEG), é uma estratégia frequentemente adoptada, que promove o aumento da estabilidade coloidal, reduz a citotoxicidade e aumenta a biodisponibilidade, através do bloqueio dessas interações não específicas com os componentes da corrente sanguínea⁶¹ (Figura 7).

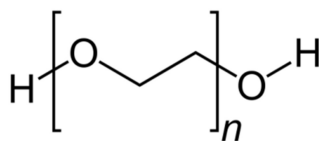


Figura 7- Estrutura do polietilenoglicol (PEG).

A conjugação do polímero com o PEG cria uma camada de hidratação em torno do poliplexo que, através de efeitos estéreo, não só minimiza a interação com as proteínas plasmáticas, como evita o reconhecimento pelos componentes do sistema imunitário. Embora esta estratégia promova um aumento da biodisponibilidade e biocompatibilidade do nanossistema, verifica-se que a sua utilização conduz à diminuição da internalização dos poliplexos e dificulta o desempacotamento destes,

impedindo a correta libertação do ADN⁶². Ainda assim, as vantagens dos copolímeros com PEG para entrega de material genético favorecem a sua utilização. Estes copolímeros, para além de induzirem níveis de citotoxicidade reduzidos, *in vitro* e *in vivo*, aumentam a solubilidade dos complexos polímero/ADN em água, reduzem as interações com as proteínas do soro e aumentam o tempo de circulação do complexo.

Os polímeros catiónicos mais explorados como vetores para estratégias de terapia génica são a polietilenimina (PEI), a polilisina (PLL), os polimetacrilatos, o quitosano e os poli(β -amino ésteres) (Figura 8).

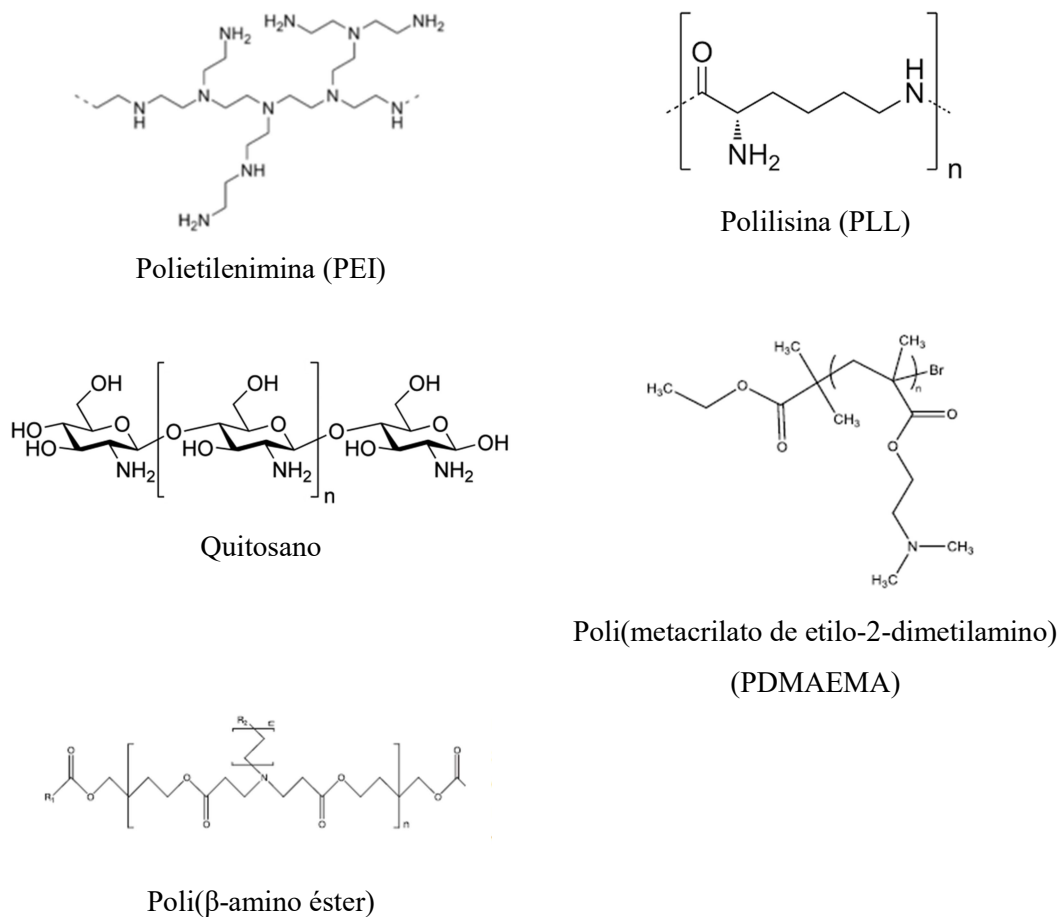


Figura 8- Estrutura de vários polímeros catiónicos utilizados frequentemente na formação de políplexos.

A polilisina (PLL) foi um dos primeiros polímeros catiónicos a ser explorado no desenvolvimento de sistemas de entrega de material genético⁶³. Este polímero, cuja estrutura é peptídica, para além de promover uma condensação eficiente do material

genético, tem natureza biodegradável. No entanto, os níveis de transfeção obtidos com este polímero são relativamente baixos, sendo necessário a utilização de cloroquina para induzir a ruptura da vesícula endocítica. A polilisina é frequentemente conjugada com ligandos, tais como o folato e anticorpos, que aumentam significativamente os níveis de transfeção *in vitro* e *in vivo*⁵¹.

A polietilenimina (PEI) é um polímero que tem uma densidade de grupos amina muito elevada, dos quais apenas 15-20% se encontra protonado a pH fisiológico⁶⁴. Esta propriedade única permite não só uma elevada condensação do material genético, como garante a fuga da via endolisossomal, uma das barreiras mais limitantes na transfeção (apresentada no ponto 1.3.2). Deste modo, este polímero promove a entrega e libertação do material genético numa enorme variedade de células, *in vitro* e *in vivo*⁶⁵. No entanto, os poliplexos resultantes da condensação do material genético com a PEI, são propensos a agregação e apresentam uma elevada toxicidade celular, que depende fortemente das suas propriedades estruturais, especialmente no que diz respeito ao peso molecular e conformação (linear ou ramificada). De modo a otimizar a sua utilização *in vivo*, têm sido feitas várias modificações na sua estrutura, como por exemplo a conjugação com ligandos, que promovem a especificidade do nanossistema, ou a conjugação com o PEG, que promove a biocompatibilidade⁶⁶. Assim, a PEI e as suas variantes são dos polímeros mais explorados como vetores de terapia génica, sendo mesmo considerado o *gold standard* de entre os vários polímeros catiónicos.

O quitosano é um polissacarídeo biodegradável que se tornou num dos mais proeminentes vetores para a transferência de genes devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, e facilidade de funcionalização química⁶⁷. No entanto, a sua aplicação é significativamente limitada pela baixa eficiência de transfeção. Para contornar esta limitação, uma variedade de derivados do quitosano, com melhores propriedades funcionais, tem vindo a ser desenvolvida^{68 69}.

O poli(metacrilato de etilo-2-dimetilamino) (PDMAEMA) é um polímero catiónico duo-responsivo (temperatura e pH), que tem sido amplamente utilizado como vetor em terapia génica⁷⁰. A influência de alguns parâmetros, tais como o peso molecular, o tamanho dos poliplexos, o rácio N/P e as condições de transfeção (pH, temperatura) na eficiência da transfeção com este polímero têm sido muito explorada. O peso molecular é reportado como um dos aspectos principais, sendo que os PDMAEMAs com maior peso molecular levam à formação de poliplexos mais pequenos, que permitem níveis de expressão do transgene superiores. Contudo, estes

polímeros revelam também maior citotoxicidade que os PDMAEMAs de menor peso molecular⁷¹. De modo a minimizar a citotoxicidade, sem comprometer a eficácia da transfeção, têm sido adoptadas várias estratégias, tais como a adição de segmentos cliváveis, ou a síntese de copolímeros de PDMAEMA⁷⁰.

Os poli- β -amino ésteres são uma classe de polímeros catiónicos com características muito atrativas para o desenvolvimento de vetores de terapia génica, destacando-se pela biocompatibilidade e elevada capacidade de transfeção^{72,73}. Estes polímeros podem ser sintetizados através de uma reacção de adição de Michael entre uma amina primária ou uma bis (amina secundária) e diacrilatos. A facilidade do processo de síntese, aliada à grande diversidade de monómeros existente, permite obter poli- β -amino ésteres com diferentes propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, cristalinidade e perfil de degradação. Ainda assim, a maior vantagem destes polímeros é o facto de serem degradáveis por clivagem hidrolítica das ligações ésteres. Para além dos produtos da degradação serem inertes, o que torna o nanossistema mais seguro, o próprio processo de degradação facilita a libertação do material genético no alvo, aumentando assim a eficácia da transfeção^{72,74}. Os grupos de Anderson e Langer sintetizaram mais de 2350 poli(β -amino ésteres) lineares cujas variações estruturais foram relacionadas com a eficiência de transfeção e biocompatibilidade numa vasta gama de linhas celulares^{75,72,76,77,78}. Recentemente, os poli- β -amino ésteres ramificados e de maior peso molecular revelaram-se, também, bastante promissores, apresentando uma elevada eficácia de transfeção e reduzida citotoxicidade⁷⁹.

1.3.1. Targeting e internalização dos políplexos

O desenvolvimento de nanossistemas com a capacidade de entregar o material genético especificamente no alvo da terapia é crucial para a implementação de estratégias de terapia génica. A administração sistémica de nanopartículas dirigidas a um tecido, uma célula ou um organelo específico, não só reduz os efeitos adversos associados à adsorção por alvos indesejados, como promove o aumento do efeito terapêutico, devido ao aumento da concentração no alvo.

Os polímeros catiónicos são facilmente derivatizados com várias moléculas, tais como anticorpos, proteínas, péptidos e aptâmeros, que se ligam especificamente a receptores sobreexpressos nas membranas celulares⁸⁰. Em alternativa aos sistemas de

targeting ativos, os poliplexos podem sofrer acumulação no tecido alvo devido às condições patofisiológicas deste, tais como o pH, a temperatura ou a carga superficial do tecido, ocorrendo, nesse caso, um *targeting* passiva. Esta estratégia é amplamente utilizada em terapias antitumorais, pois a porosidade da vasculatura e o déficit da drenagem linfática nos tecidos tumorais promove a acumulação das nanopartículas no interstício tumoral, processo reconhecido como efeito de permeação e retenção melhorada (*EPR*)⁸¹. O *targeting passivo* pode, também, ser promovido pela conjugação com o PEG, pois este aumenta o tempo de circulação e evita a agregação das nanopartículas poliméricas.

Após o extravasamento no tecido alvo, é expectável que ocorra a internalização celular das nanopartículas, para que o material genético possa ser libertado e exerça o efeito terapêutico desejado. A internalização dos poliplexos pode ocorrer através de várias vias endocíticas⁸², dependendo do tipo de célula⁸³ e do tamanho da nanopartícula⁸⁴. A endocitose é um processo dependente de energia que pode ser subdividida em duas categorias: fagocitose e pinocitose^{85 86}. A fagocitose é geralmente levada a cabo por células especializadas, tais como monócitos, macrófagos e neutrófilos. No entanto, não é a via endocítica ideal para a internalização de poliplexos, pois é um processo utilizado para eliminar as partículas estranhas e, assim, pode ser um obstáculo para a entrega eficiente na célula alvo. A pinocitose é subdividida em macropinocitose, endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolinas e endocitose independente de clatrininas e caveolinas⁸⁶. O tamanho dos poliplexos é um factor crítico para a determinação de qual das vias de pinocitose é ativada, sendo que, na ausência de ligandos, o tamanho da partícula, por si só, determina a via de internalização pela qual o poliplexo entra na célula^{84,82}.

A endocitose adsortiva não específica, seguida da internalização mediada por clatrininas é o mecanismo mais frequentemente adoptado pelos poliplexos, pois estes nanosistemas catiónicos tendem a estabelecer interações com biomoléculas carregadas negativamente, presentes à superfície da membrana celular, tais como os proteoglicanos, os glicerofosfatos e as glicoproteínas^{87,88}.

1.3.2. Escape endossomal

Após a internalização mediada por endocitose, os poliplexos são direccionados ao longo da via endocítica, que culmina com a fusão lisossomal. Os lisossomas, vesículas

ácidas com elevada concentração de enzimas, promovem a rápida degradação do material genético. Assim, a fuga dos poliplexos da via endolisossomal é crucial para garantir a eficácia da transfecção. Os polímeros catiónicos são constituídos por aminas, com diferentes pKa (consoante sejam aminas primárias, secundárias ou terciárias) o que lhes permite ter diferentes graus de protonação, para diferentes valores de pH do meio. A protonação sucessiva do polímero no interior do endossoma promove a entrada, por difusão passiva, de iões cloreto com conseqüente aumento da pressão osmótica e rebentamento da membrana endossomal. Este processo, designado como o efeito “esponja de prótons”, é aceite como o principal mecanismo de escape à degradação da via endossomal pelos poliplexos⁸⁹ (Figura 9).

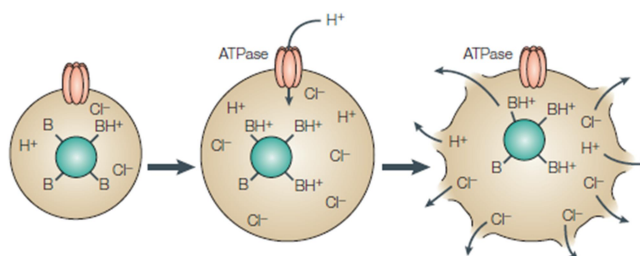


Figura 9– Escape endossomal dos poliplexos através do efeito “esponja de prótons” (Nat. Rev. Drug Discov. 4, 581–93 (2005)).

Uma vez libertados das vesículas endossomais, os poliplexos têm de se dirigir, através do citoplasma, para o núcleo. Os poliplexos, devido à sua natureza catiónica, podem mover-se ao longo dos microtúbulos, interagindo de forma não específica com microtúbulos aniónicos ou proteínas motoras⁹⁰.

A eficácia da transfecção é, também, condicionada pela capacidade do polímero libertar o material genético, para que este possa ser, posteriormente, transcrito no núcleo. A descondensação e libertação do ADN do polímero é promovida pela diminuição da força da interação ADN/polímero, o que pode ser conseguido através da diminuição da carga positiva⁹¹, da conjugação do polímero com PEG, ou através da diminuição da massa molecular do polímero⁹². Uma alternativa bastante promissora para contornar esta condicionante é a utilização de polímeros inteligentes, que alteram as suas propriedades em função das condições fisiológicas^{93,94}. Os polímeros bio-redutíveis degradam-se no ambiente intracelular, permitindo a libertação rápida e eficiente de ADN no interior do citoplasma⁹⁵.

1.3.3. Internalização nuclear

Uma vez no citoplasma, o material genético tem de chegar ao núcleo e atravessar a membrana nuclear para que a transcrição ocorra. Enquanto que os sistemas virais utilizam a maquinaria de importação nuclear da célula, os vetores não virais dependem da ruptura da membrana nuclear durante a divisão celular para que ocorra a internalização nuclear. Aquando da reconstituição da membrana nuclear, após o processo mitótico, o material genómico exógeno, é integrado no genoma do hospedeiro e transcrito. Assim, imediatamente antes da divisão celular, a transfecção é 30 a 500 vezes mais eficaz do que a transfecção de células no início do seu ciclo celular⁹⁶. Porém, na ausência de divisão celular, a importação do material genético para o núcleo pode ocorrer através de um processo ativo, no qual ocorre a internalização após a associação inespecífica do material genético a proteínas ou péptidos que contêm o sinal de localização nuclear (NLS)⁹⁷. Deste modo, a conjugação do polímero com sequências peptídicas, reconhecidas pelas importinas expressas na membrana nuclear, é um estratégia que potencia a internalização nuclear, com consequente aumento da transfecção, até mesmo em células quiescentes⁹⁷.

A consideração de todas estas barreiras, intra e extracelulares, é da maior importância para otimizar a razão citotoxicidade/eficácia de transfecção dos políplexos e transpor a sua utilização para a prática clínica. A versatilidade química dos polímeros, aliada ao desenvolvimento de estudos *de high-throughput screening* e química combinatória, permite não só explorar novas combinações poliméricas, como também modificar os polímeros já existentes, para que estes promovam uma entrega e expressão do material genético eficaz (Tabela 4).

Uma estratégia bastante promissora para ultrapassar as limitações associadas a cada polímero é a combinação de polímeros, através de ligações covalentes entre si (copolímeros) ou mesmo pela simples combinação de soluções poliméricas aquando da transfecção⁹⁸. Os copolímeros em bloco permitem a incorporação de múltiplas funcionalidades numa só estrutura polimérica e têm sido muito explorados para aplicação em estratégias de terapia génica. Idealmente, estes copolímeros devem incorporar um segmento catiónico, que garanta a condensação do material genético, um segmento hidrofílico, que promova a estabilidade e biocompatibilidade da formulação e um segmento biodegradável, que minimize os efeitos citotóxicos e facilite a libertação do material genético no alvo⁹⁹.

Tabela 4- Desafios associados à entrega eficaz do material genético dos poliplexos e as estratégias mais comuns para os ultrapassar.

Barreira	Estratégias adotadas	Critério de <i>design</i> do polímero/molécula conjugada
Estabilidade na presença de soro	Conjugação com monómeros e/ou polímeros hidrofílicos (Ex: conjugação com PEG)	Segmento hidrofílico que diminui as interações inespecíficas (poliplexo-proteína plasmática) através efeitos estéreos Razão segmento catiónico/segmento hidrofílico adequada para não comprometer a solubilidade do polímero e a carga superficial do poliplexo
Interação com a membrana celular e internalização dos poliplexos	Interação receptor/ligando (Ex. conjugação do polímero com anticorpo) Interações não específicas com a superfície da célula (potencial zeta positivo, conjugação com lípidos)	Ligando específico para a célula alvo (Ex: asiolofetúina específica para o recetor da asiolofetúina sobreexpresso nas células de hepatocarcinoma) Estabelecer interações eletrostáticas com a membrana celular
Escape da via endolisossomal	Capacidade de tampão entre o pH 7,2 e 5 Conjugação com péptidos fusogénicos	Capacidade de “romper” a membrana endossomal (efeito esponja de protões)
Transporte através do citoplasma até ao espaço perinuclear	Elevado peso molecular para manter a estabilidade no citoplasma	Estabilidade termodinâmica dos poliplexos no citoplasma Promova a condensação do material genético de modo a evitar a degradação pelas endonucleases plasmáticas
Separação do poliplexo para permitir a translocação nuclear	Polímeros inteligentes (Ex: P β AE sofre degradação por clivagem hidrolítica)	Induzir a degradação (hidrolítica ou redutiva) do polímero para reduzir a estabilidade termodinâmica e cinética do complexo. Libertação do DNA intacto perto do envelope nuclear
Internalização nuclear	Conjugação com sequências que induzem a internalização Mitose	Sequências derivadas de vírus facilitam a internalização dos poliplexos Internalização facilitada durante a mitose

1.4. Objetivos

A terapia génica tem vindo a demonstrar um enorme potencial no tratamento ou prevenção de diversas patologias. No entanto, a implementação clínica desta estratégias terapêutica está grandemente condicionada pelo desenvolvimento de sistemas de transporte e entrega de material genético eficazes e biocompatíveis. A utilização de vetores virais, embora possibilite uma elevada eficácia de transdução, é limitada pelo potencial mutagénico e elevada imunogenicidade. Assim, o desenvolvimento de vetores não virais, tais como os poliplexos, torna-se crucial para a implementação e aceitação da terapia génica.

Os polímeros catiónicos, têm vindo a destacar-se pela sua diversidade e versatilidade. Estas características permitem que a eficácia da transfeção seja otimizada, modulando a sua composição química e/ou estrutura, a fim de ultrapassar as diversas barreiras fisiológicas.

Assim, com este trabalho pretendeu-se desenvolver um sistema de transporte e entrega de material genético de base polimérica, eficaz e inovador, que induzisse uma elevada expressão do transgene aliada a uma reduzida citotoxicidade. Para tal, avaliou-se a capacidade de vários polímeros catiónicos complexarem o pADN em poliplexos, com um razão de citotoxicidade/atividade biológica superior à do polímero reconhecido como o *gold standard*. Objetivou-se, ainda, correlacionar os mecanismos de internalização e a eficácia da transfeção com as características físico-químicas, como por exemplo o tamanho e o potencial zeta, desse mesmo nanossistema.

2. *Materiais e Métodos*

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Os polímeros foram sintetizados através de reações de adição de Michael e polimerização radicalar por transferência atômica (ATRP), no departamento de engenharia química pelo grupo de síntese e caracterização de polímeros.

2.2. Cultura de células

A linha celular COS-7 deriva do rim do Macaco Verde Africano, *Cercopithecus aethiops*. Estas células são semelhantes aos fibroblastos humanos e são, frequentemente, usadas em ensaios de transfecção com vetores não virais, razão pela qual foram escolhidas para efetuar a avaliação da atividade biológica das várias formulações desenvolvidas. A linha celular A549 tem origem num carcinoma de pulmão, de um homem caucasiano de 58 anos. A linha celular MIA PaCa-2 deriva do carcinoma de pâncreas de um homem caucasiano de 65 anos. A linha celular MDA-MB-231 foi obtida de um tecido de um local metastático da glândula mamária de uma mulher caucasiana de 51 anos de idade. Os Astrócitos Humanos Normais (AHN) são células que tiveram origem em tecido cerebral humano.

As linhas celulares COS-7, A549 e MiaPaCA-2 foram cultivadas no meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle medium – high glucose* (DMEM-HG) (Sigma-Aldrich, MO, USA), suplementado com 10mM de HEPES, 12mM de bicarbonato de sódio, 10% (V/V) de soro bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich, MO, USA) inativado por calor, 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, MO, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, MO, USA), em frascos de cultura de 75cm² (Corning®), numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37°C. Estas células, uma vez que crescem em monocamada, foram subcultivadas sempre que atingiam uma confluência de, aproximadamente, 80%, tipicamente duas vezes por semana, de modo a garantir que se mantinham na fase exponencial de crescimento. No processo de subcultura, primeiramente, procedeu-se à remoção do meio de cultura, seguindo-se uma lavagem com PBS. Depois, adicionaram-se 2 mL de tripsina (0,05%) (Sigma-Aldrich, MO, USA), para destacar as células, e o frasco foi colocado na incubadora, até que as

células ficassem em suspensão (aproximadamente 5 minutos). De seguida, foram adicionados 8 mL de meio de cultura, para inativar a ação da tripsina e homogeneizar a suspensão celular. As linhas celulares foram passadas para frascos novos, com diluições de 1:10, 1:4 e 1:5, para as células COS-7, A549 e MiaPaCa-2, respetivamente. A linha celular MDA-MB-231 foi cultivada no meio *Roswell Park Memorial Institute medium – RPMI 1640* (Sigma-Aldrich, MO, USA), suplementado tal como o meio DMEM-HG e mantida nas mesmas condições que as restantes linhas celulares, sendo subcultivadas numa diluição de 1:6. Os astrócitos humanos foram cultivados no meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle medium - high glucose* (DMEM-HG) (Sigma-Aldrich, MO, USA), suplementado com 10mM de HEPES, 10 mM de bicarbonato de sódio, 2% (V/V) de soro bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich, MO, USA) inativado por calor, 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, MO, USA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, MO, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais e 1% de N-2 (Sigma-Aldrich, MO, USA), em frascos de cultura de 75cm² (Corning®), numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37°C. No processo de sub-cultura, estas células foram destacadas com uma solução de acutase (Sigma-Aldrich, MO, USA) e transferidas para outro frasco, numa diluição de 1:2.

2.3.Preparação dos poliplexos

Os polímeros foram dissolvidos em água Milli-Q e misturados com 1 µg do plasmídeo de ADN de acordo com o rácio de carga polímero/ADN (N/P, +/-) pretendido, de modo a obter 1µg de ADN em 50 µL de poliplexos. Os poliplexos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente, período após o qual foram imediatamente usados.

2.4.Atividade Biológica

2.4.1. Transfecção in vitro – ensaio de luminescência

Para avaliar a capacidade de transfecção dos polímeros, estes foram complexados com um plasmídeo de ADN que contém o gene que codifica a luciferase (pCMV-Luc). Na presença de ATP, a luciferase converte a luciferina em oxiluciferina, ocorrendo a

libertação de luz (Figura 10). Como esta reacção só ocorre na presença da luciferase, e a luciferina é o único substrato desta enzima, é possível correlacionar a quantidade de luz emitida com a quantidade de luciferase presente na amostra. Esta técnica é bastante sensível, pelo que permite distinguir amostras com pequenas diferenças quanto à emissão de luz.



Figura 10- Reacção catalisada pela luciferase.

Para os ensaios de transfeção, as células foram plaqueadas quando atingiram uma confluência de 70 a 80%, ou seja, numa fase ótima de crescimento. Em primeiro lugar, as células foram tripsinizadas e suspensas em meio de cultura, sendo depois determinada a densidade de células na suspensão, através da sua contagem no hemocítmetro. Foram utilizadas 3.5×10^4 células Cos-7; 2.5×10^4 células Mia PaCa-2; 5×10^4 células A549; 7.5×10^4 células MDA-MB-231 e 4×10^4 astrócitos humanos normais, por poço, em placas de 48 poços. A transfeção foi iniciada apenas 24h após o *seeding*, garantindo uma confluência de 50-70%. Aquando da transfeção, foi retirado o meio de cultura e adicionado a cada poço 300 μL de meio de cultura novo (com ou sem soro) seguindo-se a adição de poliplexos num volume total de 50 μL , de modo a ter 1 μg de pADN por poço. Após 4h de incubação (a 37°C e sob uma atmosfera de 5% de CO_2) o meio de transfeção foi removido e substituído por DMEM-HG completo. Procedeu-se a uma incubação de 48 horas para permitir a expressão do gene da luciferase. Findo esse período, foi avaliada a viabilidade celular segundo o procedimento descrito na secção 2.5.

Para avaliação do nível de expressão do gene, as mesmas células foram lavadas duas vezes com uma solução de tampão fosfato salino (PBS) e foi adicionado a cada poço 100 μL de tampão de lise [1 mM ditioneitol; 1 mM EDTA; 25 mM tri-fosfato (pH 7,8); 8 mM MgCl_2 ; 15% glicerol; 1% v/v TritonTM X-100]. Depois das células serem destacadas, as placas foram colocadas a -80°C , durante pelo menos 15 minutos, a fim de facilitar o processo de lise celular. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para *ependorfs*, para que fosse centrifugado (10000rpm, durante 5 minutos a 4°C). De seguida, foram transferidos 50 μL do sobrenadante de cada amostra para uma placa branca de 96 poços. O nível de expressão do gene nos lisados foi determinado através da leitura da produção de luz, resultante da reacção catalisada pela luciferase, a

37°C, no luminómetro Lmax II 384 (Molecular Devices, USA), programado para injectar, em cada poço, 100 µL de solução de luciferina a 167 µM (Sigma-Aldrich, USA), seguido de 100 µL de tampão de leitura (1mM de DTT; 1mM EDTA; 25mM de Tris-fosfato (pH 7,8); 8mM MgCl₂; 15% de Glicerol (V/V)), contendo 2mM de ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), antes da leitura de cada poço, que decorreu durante 10 segundos. O teor de proteína dos lisados celulares foi analisado através do *kit* de DC Protein Assay (Bio-Rad, USA), usando a albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) como padrão. A quantificação decorreu segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os resultados da atividade biológica foram expressos como unidades relativas de luz emitida pela luciferase por mg de proteína celular total ((RLU)/mg de proteína).

2.4.2. Eficiência da transfecção in vitro – citometria de fluxo

A eficiência da transfecção foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo, analisando-se a expressão da proteína verde fluorescente (GFP). Para estes ensaios foram usadas $1,4 \times 10^5$ células COS-7, por poço, em placas de cultura de 12 poços. Todas as condições experimentais foram realizadas em duplicado. A transfecção foi iniciada apenas 24h após o *seeding*, de modo a garantir uma confluência de 50-70%. Aquando da transfecção, foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionado a cada poço 1 mL de meio de cultura, seguindo-se a adição dos poliplexos num volume total 200 µL (preparados segundo o procedimento descrito no ponto 2.3), correspondendo a um total de 4 µg de pADN por poço. Após 4h de incubação numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, a 37°C, o meio de transfecção foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas durante as 48 horas seguintes (5% de CO₂, a 37°C). Findas as 48h incubação, as células foram lavadas com PBS e destacadas por acção de uma solução de tripsina (0,05%). De seguida, de modo a inibir a acção da tripsina, adicionaram-se 500 µL de meio de cultura com soro (FBS) a cada poço. Posteriormente, a suspensão celular de cada condição experimental foi transferida para tubos de citometria, que foram centrifugados a 950rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Os *pellets* foram lavados duas vezes com PBS, em dois ciclos de centrifugação, nas condições descritas acima. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS e mantidas a 4°C para imediata leitura no citómetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, USA).

As células vivas foram selecionadas através de uma *gate forward/side scattering* num total de 20000 eventos. Os dados foram analisados no *software* FlowJo (Oregon, USA).

2.5. Ensaio de viabilidade celular

Após a transfeção das diversas condições experimentais, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio Alamar Blue modificado¹⁰⁰. Este ensaio permite medir o potencial redutor das células, decorrente da produção de metabolitos durante o crescimento celular e, conseqüentemente, determinar a viabilidade celular. Basicamente, a resazurina, o composto activo no ensaio de Alamar Blue, é um reagente azul não tóxico que, após entrar nas células metabolicamente ativas, é reduzido a resorufina, um composto cor-de-rosa altamente fluorescente. Este método, para além de ser dotado de uma enorme sensibilidade, não obriga à lise celular, possibilitando a determinação da viabilidade sem que ocorra o destacamento das células aderentes.

Resumidamente, 48 horas após a transfeção, as células foram incubadas com 300 µL de uma solução de DMEM-HG com 10% (V/V) de resazurina (Sigma-Aldrich, MO, USA) preparada a partir de uma solução stock de 0,1 mg/mL de resazurina. Após incubação a 37 °C e o aparecimento da coloração rosa nos poços das células controlo, face à coloração azul do corante (controlo negativo), foram colhidos 180 µL de sobrenadante de cada poço e transferidos para uma placa transparente de 96 poços. De seguida, a absorvância das amostras foi medida a 570 e 600 nm, no espectrofotómetro SPECTRAmax PLUS 384 (Molecular Devices, USA). A viabilidade celular, apresentada como percentagem de células controlo não tratadas, foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade} = \frac{(A_{570} - A_{600}) - (C_{570}^- - C_{600}^-)}{(C_{570}^+ - C_{600}^+) - (C_{570}^- - C_{600}^-)}$$

2.6. Estudo das vias endocíticas envolvidas na internalização dos poliplexos

A fim de determinar as vias endocíticas envolvidas na internalização dos poliplexos foi avaliado o efeito de vários fármacos inibidores da endocitose na atividade biológica dos poliplexos em células Cos-7.

De modo a determinar a concentração mais adequada dos várias inibidores de endocitose, ou seja, a concentração para qual ocorre inibição da via endocítica, sem que a viabilidade celular seja comprometida em demasia, foi realizado um ensaio de Alamar Blue modificado na presença dos poliplexos e diferentes concentrações dos fármacos¹⁰¹.

Foram utilizados os seguintes inibidores: clorpromazina (75 a 200 μM), filipina (0,25 a 1 $\mu\text{g/mL}$) e a amilorida (1 a 2 mM). Como controlo positivo as células foram tratadas somente com os poliplexos.

As células Cos-7 foram plaqueadas quando atingiram uma confluência de 70 a 80%, com uma densidade de $3,5 \times 10^4$ células por poço, numa placa de 48 poços. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído, tendo sido adicionado a cada poço 300 μL de meio DMEM-HG com soro, contendo os diferentes inibidores. Após um período de incubação de 1 hora, os poliplexos foram adicionados às células, seguindo-se uma incubação de 4 horas a 37°C e sob uma atmosfera de 5% de CO_2 . Finda esta incubação o meio de transfeção foi substituído por DMEM-HG completo. A viabilidade celular foi determinada 48 horas depois, tal como é descrito na secção 2.5.

De modo a determinar a via endocítica pela qual os poliplexos são internalizados, analisou-se o efeito de cada um destes inibidores na transfeção. Para tal, após o ensaio de viabilidade celular procedeu-se à quantificação da expressão do gene da luciferase, tal como é referido na secção 2.4.1.

2.7. Caracterização físico-química dos poliplexos

A caracterização físico-química dos complexos polímero/ADN foi feita em termos de tamanho, carga elétrica superficial e proteção/condensação do ADN conferidos pelos vários polímeros catiónicos.

2.7.1. Análise da difusão dinâmica da luz e potencial Zeta

O tamanho das nanopartículas foi determinado pela técnica de difusão dinâmica da luz (DLS). Este método baseia-se no movimento browniano das nanopartículas suspensas num líquido, que provoca a dispersão da luz com diferentes intensidades¹⁰². A análise desta intensidade permite calcular a velocidade com que as partículas se movem e, conseqüentemente, o tamanho da partícula. As medições de DLS foram realizadas num Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., UK). A distribuição de

tamanhos das partículas (em intensidade), o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (z-médio) e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados com o *software* Zetasizer 6.20. As medidas foram efetuadas a 25 °C e com um ângulo de dispersão oposto de 173°.

O potencial zeta é uma medida da carga elétrica à superfície das nanopartículas, baseada na mobilidade eletroforética resultante da aplicação de um campo elétrico. As medições deste parâmetro foram, também, realizadas num Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) acoplado a um laser de eletroforese doppler. Esta grandeza foi determinada através do modelo de *Smoluchovski*.

Para a realização destes ensaios, os polímeros foram dissolvidos em água Milli-Q e misturados com 4 µg de pCMV-Luc de acordo com o rácio de carga polímero/ADN (N/P, +/-) pretendido (tal como descrito no ponto 2.3). Os poliplexos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente, período após o qual foram imediatamente usados. Foram realizados dois ensaios independentes, em triplicado, tanto para o tamanho como para o potencial zeta das nanopartículas.

2.7.2. Microscopia de Força Atômica

O tamanho e morfologia dos poliplexos foi analisado através da técnica de microscopia de força atômica (AFM)¹⁰³.

Para a realização destes ensaios, os polímeros foram dissolvidos em água Milli-Q e misturados com 4 µg de pCMV-Luc de acordo com o rácio de carga N/P pretendido (tal como descrito no ponto 2.3). Os poliplexos foram incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente, período após o qual foram depositados numa placa silício. Essas placas de silício foram previamente preparadas: primeiro colocaram-se em acetona num banho de ultrassons, durante dez minutos, de seguida foram colocadas num banho de etanol por igual período de tempo. Por fim, as placas foram secas e adicionaram-se os poliplexos na face mais brilhante. Após uma incubação de, aproximadamente, 12 horas, as imagens foram obtidas no microscópio de força atômica Innova-Veeco (Bruker, U.S.A), no modo de operação TappingTM, com uma sonda revestida com alumínio de silício (frequência de ressonância (f_0) de 180 KHz e constante de mola de 5N/m), à temperatura ambiente. A análise e processamento das imagem de AFM foram realizadas no software WSxM 5.0.

2.7.3. Ensaio de intercalação de Brometo de Etídio

O brometo de etídio (EtBr) é um agente monovalente intercalante do ADN, que produz um sinal de fluorescência intenso após a formação de complexos com o ADN. Deste modo, a quantificação da fluorescência emitida após a intercalação deste agente com o ADN permite avaliar a condensação do material genético, conferida pelo poliplexo. Os poliplexos foram preparados, tal como descrito no ponto 2.3. e, após os 15 minutos de incubação, foram transferidos 50 μ L de cada amostra para uma placa de 96 poços preta (Costar, CA, USA). De seguida, 50 μ L de uma solução de EtBr foi adicionada de forma a atingir uma concentração final de 400 nM. Após um período de incubação de 10 minutos, a fluorescência emitida foi medida num fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, CA, USA), usando um comprimento de onda de excitação de 518 nm e um comprimento de onda de emissão de 605 nm. A escala de fluorescência foi calibrada de forma a que a fluorescência inicial do EtBr fosse estabelecida como a fluorescência residual. Para tal, adicionaram-se 50 μ L de solução de EtBr a 50 μ L de água Milli-Q, de modo a obter uma concentração final de EtBr de 400 nM. O valor de fluorescência obtido com 1 μ g de ADN, dissolvido em 50 μ L de água Milli-Q e misturados com 50 μ L de EtBr, foi estabelecido como a fluorescência máxima emitida (100%). A quantidade de ADN disponível para interagir com a sonda foi calculado subtraindo o valor da fluorescência residual aos valores obtidos para as amostras e expresso como percentagem do controlo.

2.7.4. Ensaio de eletroforese em gel de agarose

De modo a complementar os resultados obtidos no ensaio de intercalação do brometo de etídeo, o grau de condensação e proteção conferido pelos poliplexos foi também analisado com um ensaio de eletroforese em gel de agarose.

Preparou-se um gel de agarose a 1%, contendo 0,9g de agarose em 90 mL de TBE (89 mM Tris-base (pH=8,6); 89 mM ácido bórico; 2,5 mM EDTA). A mistura de agarose e de TBE foi aquecida, sob agitação, até dissolver completamente a agarose. De seguida, adicionou-se o EtBr, de modo a obter uma concentração de 1 μ g deste por mL de gel. Verteu-se a mistura para um suporte e deixou-se arrefecer, cerca de 30 minutos. Prepararam-se os diferentes poliplexos, nas várias razões de carga, tal como descrito no ponto 2.3. Posteriormente, retiraram-se 20 μ L de amostra, correspondente a cada

condição experimental, e adicionaram-se 5 μ L de *loading buffer* (Ficol 400 15% (v/v), azul bromofenol 0,05 (m/v); SDS 11% (m/v); EDTA 0,1 M a pH7,8). As amostras foram então introduzidas nos poços do gel e a eletroforese decorreu, aproximadamente, durante 45 minutos, usando-se uma diferença de potencial de 80V. A análise da intensidade de fluorescência das bandas resultantes da eletroforese foi efectuada no sistema GellDoc (Bio-Rad, USA), utilizando o software QuantityOne.

3. *Resultados e Discussão*

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste trabalho. Em primeiro lugar serão apresentados os resultados da atividade biológica obtidos com poliplexos preparados com vários polímeros e copolímeros catiónicos, baseados no monômero aminoetil metacrilato. Na segunda parte será avaliada a eficácia da transfeção e as propriedades físico-químicas de diferentes formulações de poliplexos, preparados a partir da combinação dos polímeros PDMAEMA e P β AE, a fim de desenvolver um sistema de entrega e transporte de material genético eficaz.

3.1. Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético de poliplexos baseados nos polímeros PAMA e copolímeros (PEG-b-PAMA)

Inicialmente foi feito um *screening* da atividade biológica, em células cos-7, de poliplexos preparados com o polímero poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PAMA) e com o copolímero em bloco polietilenoglicol-poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PEG-b-PAMA) (Figura 11). Estes polímeros foram sintetizados através da técnica de polimerização radicalar por transferência de átomo (ATRP). Esta técnica, para além de simples, permite obter polímeros com massas molares, estruturas macromoleculares e dispersividades controladas, requisitos estes imprescindíveis para aplicações biomédicas¹⁰⁴.

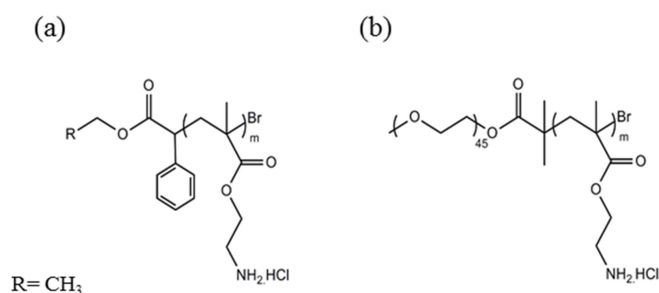


Figura 11 - Estrutura química do homopolímero poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PAMA) (a) e do copolímero em bloco polietilenoglicol-poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PEG-b-PAMA) (b).

Na tabela 5 encontram-se descritas as propriedades dos polímeros testados, nomeadamente o grau de polimerização do monómero aminoetil metacrilato, que indica a quantidade de cargas positivas por mol de polímero e o seu peso molecular médio (M_n), determinado através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (1H RMN).

Tabela 5- Grau de polimerização e peso molecular dos copolímeros PEG-*b*-PAMA e dos homopolímeros PAMA.

Polímero	Grau de polimerização do PEG	Grau de polimerização do monómero aminoetil metacrilato	M_n (g/mol)
PAMA ₆₃₀₀	-	36	6300
PAMA ₈₆₀₀	-	51	8600
PAMA ₁₄₀₀₀	-	83	14000
PAMA ₁₇₄₀₀	-	103	17400
PEG- <i>b</i> -PAMA ₈₆₀₀	45	40	8600
PEG- <i>b</i> -PAMA ₁₂₄₀₀	45	63	12400
PEG- <i>b</i> -PAMA ₂₀₆₀₀	45	111	20600
PEG- <i>b</i> -PAMA ₂₈₉₀₀	45	163	28900

3.1.1. Eficiência da transfeção in vitro - Ensaio de luminescência

Os polímeros catiónicos foram avaliados como vetores não-virais para entrega de material genético em células COS-7. A atividade biológica foi quantificada através de ensaios de luminescência, nos quais se avaliou a expressão do gene luciferase. Este ensaio é, frequentemente, utilizado para avaliar a capacidade de transfeção de vetores não virais, envolvendo a expressão de genes repórteres, uma vez que permite obter resultados quantitativos de forma rápida e não muito dispendiosa.

Os poliplexos, preparados com os polímeros indicados na tabela 5, foram testados em seis razões de carga N/P (5/1, 10/1, 25/1, 50/1, 75/1, 100/1). Para avaliar o desempenho destes polímeros catiónicos como agentes de transfeção, foi utilizado como controlo o polímero bPEI e os poliplexos correspondentes preparados na razão de carga

N/P 25/1, considerado, devido sua à elevada eficiência de transfeção, o *gold standard* dos sistemas poliméricos de entrega de material genético¹⁰⁵.

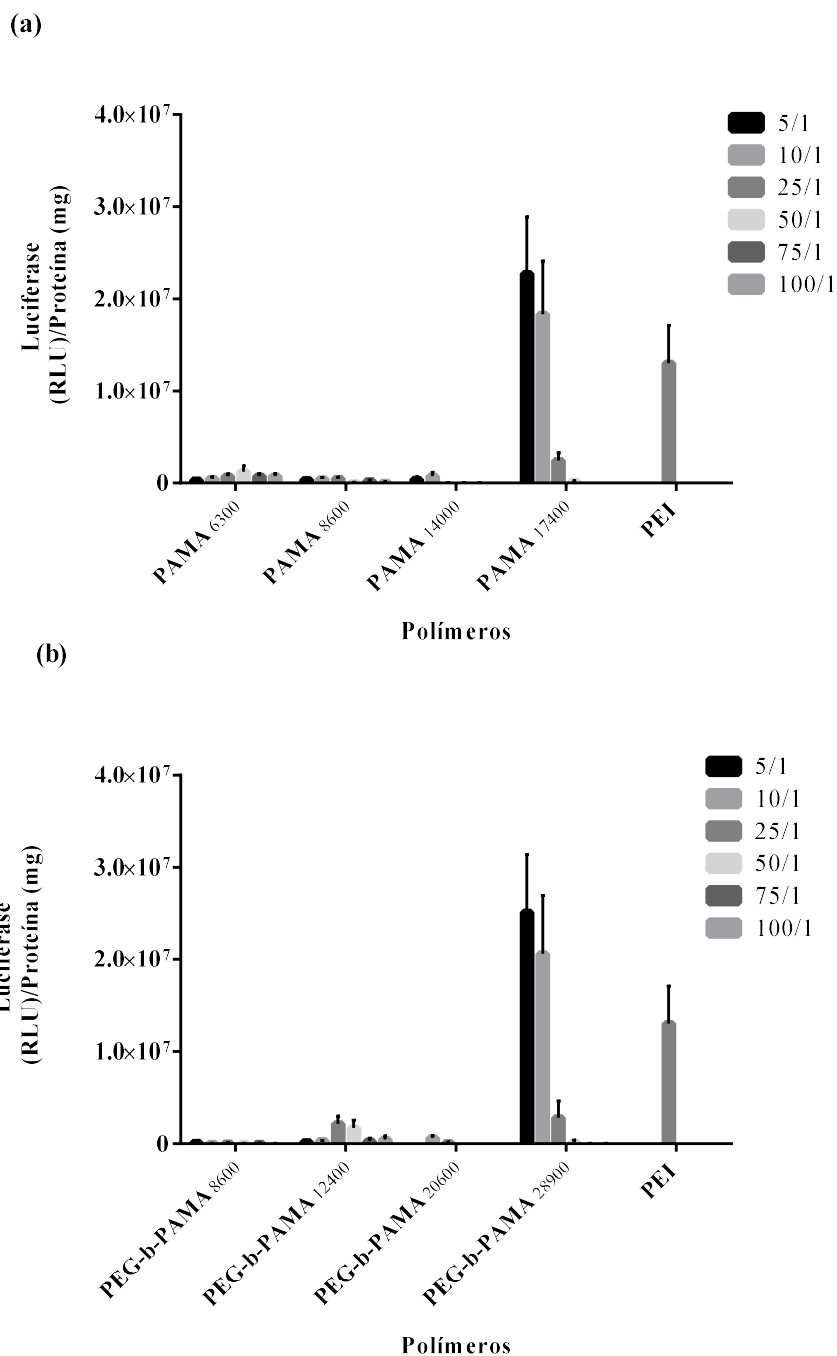


Figura 12 - Efeito do rácio N/P e da composição dos políplexos na expressão do gene luciferase em células cos-7. Os homopolímeros PAMA (a) e os copolímeros PEG-b-PAMA (b) foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc de acordo com o rácio N/P indicado. Como controlo utilizou-se o polímero bPEI, cujos políplexos foram preparados no rácio N/P 25/1. As

células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG com 10% FBS e procedeu-se a um período de incubação de 48h. O nível de expressão génica foi avaliado tal como está descrito na secção de “Materias e métodos”. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Tal como se pode verificar na Figura 12, a eficiência da transfeção, nas células Cos-7, é bastante condicionada pela composição dos poliplexos e pelo rácio N/P em que estes são preparados.

Dos vários copolímeros testados, apenas os poliplexos preparados com o PEG-b-PAMA₂₈₉₀₀ têm atividade biológica, apresentando um nível de transfeção semelhante ao dos poliplexos formados com o polímero bPEI (Figura 12b). Quanto aos homopolímeros, apenas o PAMA₁₇₄₀₀, demonstrou ter a capacidade de complexar o material genético em poliplexos que possibilitam a expressão do transgene. Assim, pode-se constatar, que de ambos os grupos de polímeros testados (homopolímeros e copolímeros), apenas os de maior grau de polimerização têm a capacidade de formar poliplexos que promovem a internalização e entrega eficiente do plasmídeo no núcleo, onde ocorre a transcrição do gene luciferase. Esta relação entre o grau de polimerização e a eficiência da transfeção tem sido reportada em vários estudos, com polímeros de estrutura química diversa, como por exemplo a PEI¹⁰⁶, o PDAEMA¹⁰⁷ e os poli (β -amino ésteres)¹⁰⁸. Basicamente, com o aumento da extensão da cadeia polimérica, as interações electrostáticas, estabelecidas com os ácidos nucleicos, tornam-se mais fortes, promovendo a formação de poliplexos mais estáveis e de menores dimensões, que são mais facilmente internalizados pelas células alvo, resultando, regra geral, numa maior atividade biológica¹⁰⁹.

Na Figura 12 observa-se ainda, que a actividade biológica dos poliplexos baseados nos polímeros PEG-b-PAMA₂₈₉₀₀ e PAMA₁₇₄₀₀, preparados nos rácios N/P de 5/1 e 10/1, é semelhante à dos poliplexos preparados com o polímero bPEI. Para rácios N/P superiores, verifica-se uma diminuição drástica da expressão do transgene. Este efeito pode estar associado ao excesso de complexação do material genético, que pode não permitir a necessária libertação do ADN, para que ocorra a expressão do gene repórter. Por outro lado, a toxicidade induzida pelos poliplexos (resultados apresentados

na secção 3.1.2), preparados com estes polímeros em rácios superiores a 25/1, também pode justificar, parcialmente, a ausência de atividade biológica

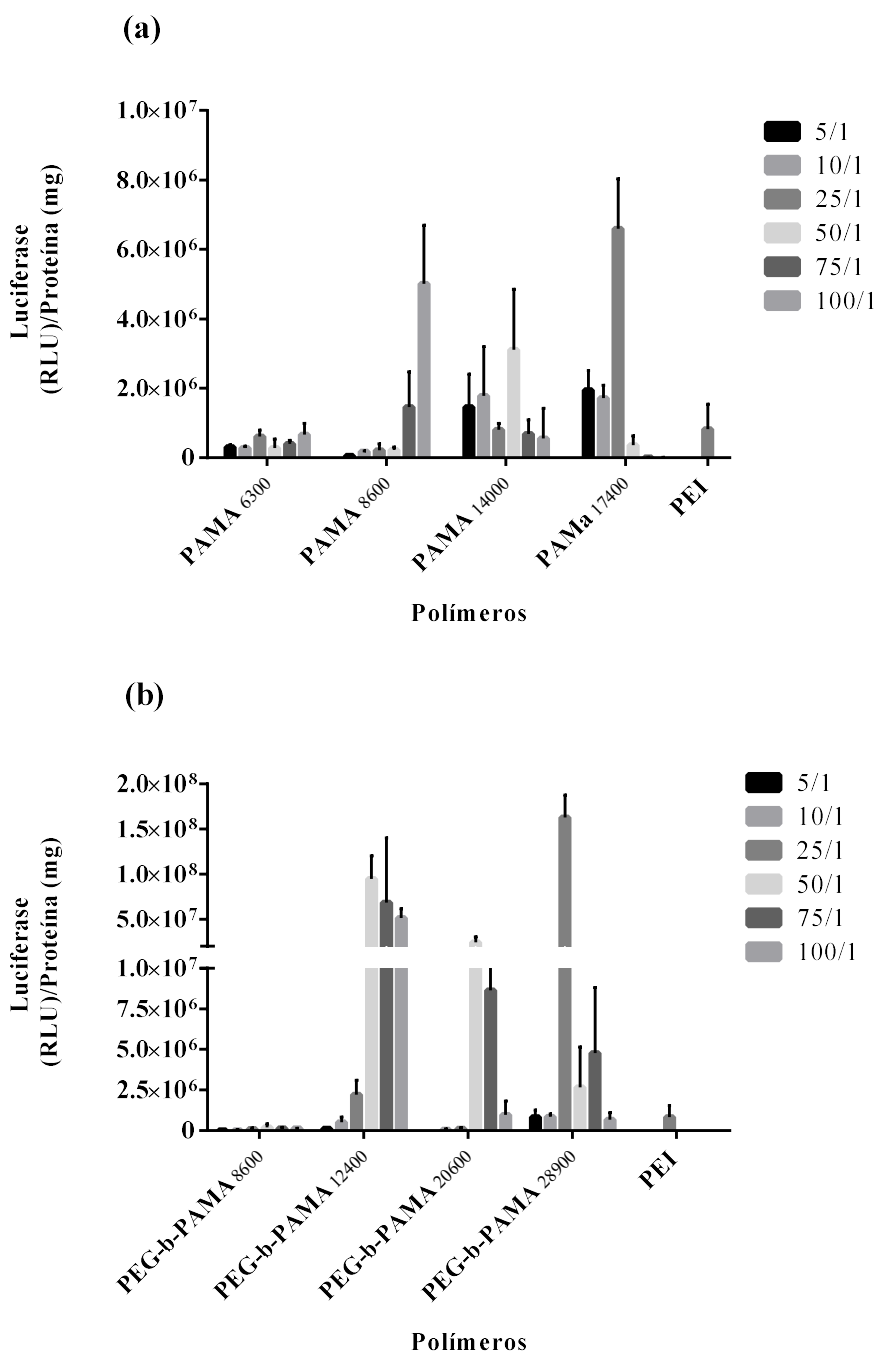


Figura 13- Efeito da presença de soro na atividade biológica dos diferentes poliplexos em células *cos-7*. Os homopolímeros PAMA (a) e os copolímeros PEG-b-PAMA (b) foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc de acordo com o rácio N/P indicado. Como controlo utilizaram-se os poliplexos preparados com o polímero bPEI no rácio 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio com 10% de FBS e posteriormente adicionaram-se os

poliPLEXOS. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e procedeu-se a um período de incubação de 48h. O nível de expressão génica foi avaliado tal como está descrito na secção de “Materias e métodos”. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

A transfeção com poliPLEXOS é, geralmente, afetada negativamente pela adição de soro ao meio de transfeção. Embora, a inativação pelo soro possa ser contornada nos estudos *in vitro*, através da incubação das células com os poliPLEXOS em meio isento de soro, esta abordagem é impraticável nos ensaios *in vivo*. Deste modo, torna-se imperativo avaliar o desempenho dos polímeros catiónicos sob esta condição.

De um modo geral, verifica-se que na presença de soro, a expressão do gene da luciferase, obtida para os poliPLEXOS preparados com os copolímeros PEG-b-PAMA, aumenta em relação à transfeção na ausência de soro (Figura 13a). O PEG-b-PAMA₈₆₀₀ é o único polímero para o qual tal não se verifica. Este, como apresenta um grau de polimerização menor, com apenas quarenta unidades de repetição do monómero, possivelmente não estabelece interações eletrostáticas suficientemente fortes com o material genético, resultando numa estrutura pouco estável, que pode promover a dissociação precoce do poliPLEXO. Por outro lado, neste copolímero o segmento hidrofílico é relativamente grande quando comparado com o segmento catiónico, pelo que a densidade de carga superficial dos poliPLEXOS, possivelmente, não é suficientemente positiva para interagir com a membrana celular, condicionando assim a internalização do poliPLEXO. Atendendo aos resultados obtidos no ensaio de acesso do brometo de etídeo (apresentados na secção 3.1.3), esta última hipótese torna-se a mais válida, uma vez que o copolímero têm a capacidade de condensar o material genético em nanossistemas que impedem o acesso do agente intercalante.

Quanto aos copolímeros PEG-b-PAMA₁₂₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ verificou-se um aumento dos níveis de transfeção em relação à transfeção na ausência de soro. Este aumento foi, particularmente, notório para os poliPLEXOS baseados no PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ preparado na razão de carga 50/1, cuja expressão do transgene foi, aproximadamente, 1700 vezes superior. Este incremento da atividade biológica na presença de soro, pode dever-se à associação de alguns componentes do soro aos

poliPLEXOS, como por exemplo proteínas, que podem promover a internalização do nanossistema por endocitose, ou facilitar a libertação intracelular do ADN^{110,111}.

Na Figura 13 pode-se, também, constatar que, na presença de soro, os poliPLEXOS preparados com os copolímeros promovem níveis de expressão do transgene bastante superiores aos obtidos com poliPLEXOS preparados com os homopolímeros. Embora este facto seja reportado para outros polímeros conjugados com o PEG, tais como a bPEI¹¹² ou o PBAE¹¹³, a copolimerização com o polietilenoglicol é, também, associada à diminuição da internalização dos poliPLEXOS e alteração do seu tráfego intracelular, com consequente diminuição da eficácia da transfeção⁶². Este efeito contraditório do PEG, copolimerizado com polímeros com propriedades físico-químicas distintas, está associado ao processo de *self-assembly* dos poliPLEXOS. Este processo conduz à formação de poliPLEXOS, cuja internalização e capacidade de ultrapassar as várias barreiras intracelulares é condicionada pelas características adquiridas, tais como o potencial zeta, o tamanho, a morfologia e a estabilidade^{114,115}.

Quanto ao rácio N/P, verifica-se que os poliPLEXOS formados com os copolímeros PEG-b-PAMA₂₈₉₀₀ promovem uma maior expressão do transgene para o rácio 25/1. Já os copolímeros PEG-b-PAMA₁₂₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ apresentam melhores níveis de transfeção para o rácio 50/1. Deste modo, verifica-se que na presença de soro a expressão do gene repórter é promovida pelos poliPLEXOS com um rácio N/P superior. Este efeito deve-se, muito provavelmente, ao excesso de polímero, e consequentemente de cargas positivas, capazes de estabelecer determinadas interações com componentes do soro, como por exemplo a albumina, capaz de promover um aumento da internalização celular dos poliPLEXOS¹¹¹. Adicionalmente, essas interações com os componentes do soro, nas razões de carga mais elevadas, poderão facilitar uma reorganização estrutural dos poliPLEXOS, favorável ao aumento da sua atividade biológica. Para além disso, recentemente, Cai J. et al. sugeriu que o excesso de polímero nas razões de carga superiores, associado ao aumento de cadeias poliméricas livres, promove a eficácia da transfeção através do aumento do transporte do plasmídeo para o núcleo e do mRNA do núcleo para o citoplasma¹¹⁶. Assim, pode-se inferir que a atividade biológica destes poliPLEXOS, muito provavelmente, resulta da combinação de vários fatores, tais como: a composição química dos polímeros; a conformação adquirida no processo de *self-assembly*, após o estabelecimento de interações eletrostáticas com pADN; as características físico-químicas dos poliPLEXOS formados; as interações estabelecidas com os componentes do soro; as interações estabelecidas com a

membrana citoplasmática que promovem a sua internalização e, por fim o tráfego intracelular até ao núcleo, onde ocorre a expressão do transgene.

Quanto aos homopolímeros (Figura 13b), verificou-se que a expressão do gene repórter foi negativamente afetada pela adição do soro ao meio de transfeção. Os poliplexos baseados no homopolímero PAMA₁₇₄₀₀ sofreram uma redução nos níveis de transfeção de, aproximadamente, 3 vezes, em relação à transfeção na ausência de soro. Já os poliplexos preparados com os homopolímeros de menor peso molecular, tal como na transfeção na ausência de soro, não promoveram uma expressão significativa do transgene. Apesar de residuais, os níveis de transfeção obtidos com estes homopolímeros foram, ainda assim, superiores aos obtidos com poliplexos preparados com a PEI, cuja transfeção é negativamente afectada pela presença do soro.

Neste estudo, para além do *screening* inicial onde foi possível identificar os polímeros com maior potencial, pretendeu-se ainda avaliar o efeito do PEG na atividade biológica. O PEG tem demonstrado imenso potencial em estratégias de terapia génica baseadas em vetores não virais¹¹⁷. Este, devido à sua natureza biocompatível e à capacidade de promover no nanossistema uma proteção estérea, que minimiza as interações não específicas, tem sido conjugado com diversos polímeros para inúmeras aplicações de libertação controlada de fármacos e/ou material genético¹¹⁸. Para tal, avaliou-se a expressão do gene luciferase e a viabilidade celular após a transfeção com poliplexos preparados com um copolímero e um homopolímero, com um grau de polimerização semelhante, nos rácios N/P de 5 a 100/1. Embora o copolímero PEG-b-PAMA₂₈₉₀₀ se tenha destacado, em relação aos restantes polímeros e mesmo em relação à bPEI, quanto à transfeção na presença de soro, este não foi selecionado para esta análise, porque, devido a um constrangimento de síntese, não foi possível testar um homopolímero com um grau de polimerização semelhante. Deste modo, esta análise foi feita para o copolímero PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ e para o homopolímero PAMA₁₇₄₀₀, com um grau de polimerização do monómero de 111 e 103, respetivamente.

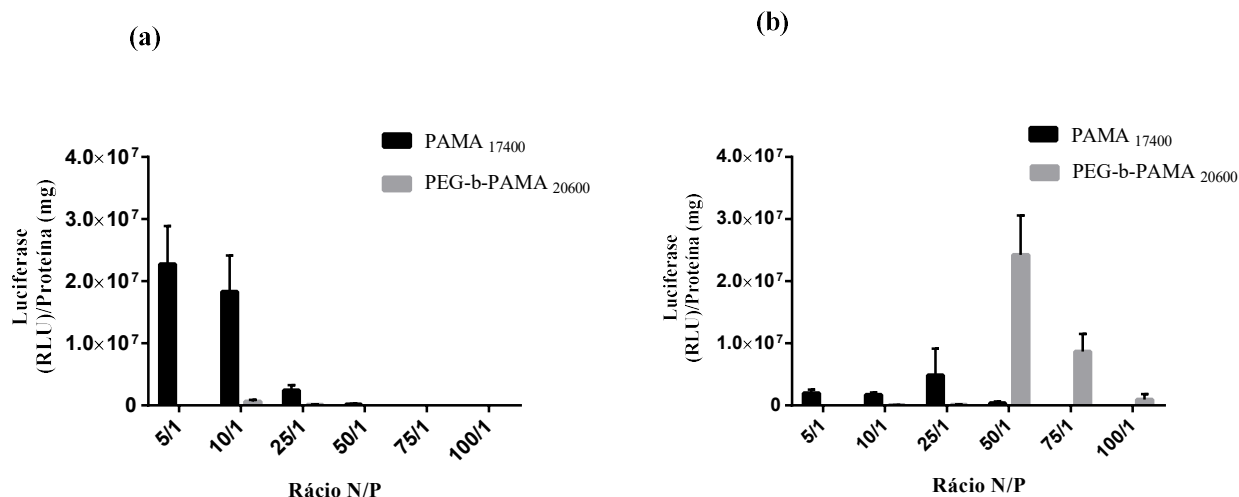


Figura 14- Efeito do rácio N/P e da peguilação dos poliplexos na expressão do gene luciferase em células cos-7 na ausência de soro (a) e na presença de soro (b). Os polímeros PAMA₁₇₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc nos rácio N/P 5/1; 10/1; 25/1; 50/1; 75/1 e 100/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem FBS ou com 10% de FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h. O nível de expressão génica foi avaliado tal como está descrito na secção de “Materias e métodos”. Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Na Figura 14 é possível observar que, na ausência de soro, somente os poliplexos preparados com o homopolímero, nos rácios N/P 5/1 e 10/1, garantem a entrega eficaz do plasmídeo nas células. Para rácios superiores verifica-se uma diminuição drástica dos níveis de expressão de luciferase, podendo esta diminuição correlacionar-se com a elevada toxicidade induzida por estes poliplexos (resultados apresentados na secção 3.1.2). Quanto aos poliplexos preparados com o copolímero PEG-b-PAMA, verifica-se que estes não possibilitam a expressão do gene repórter. No entanto, e embora não se tenha avaliado a carga superficial destes poliplexos, segundo a literatura, é expectável que o potencial zeta dos poliplexos preparados com o copolímero PEG-b-PAMA seja inferior ao dos poliplexos preparados com o homopolímero, no mesmo rácio N/P^{119,62}. Este facto, aliado à citotoxicidade induzida por estes poliplexos em rácios superiores a 10/1, permite-nos inferir que, possivelmente, nos rácios 5/1 e 10/1 a carga superficial do poliplexo não é suficientemente positiva

para que este estabeleça interações eletrostáticas com os componentes da membrana citoplasmática e, conseqüentemente seja internalizado.

Na presença de soro, tal como se constatou para os restantes copolímeros testados (Figura 13), os poliplexos preparados com o copolímero PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ promovem níveis de transfeção superiores aos dos poliplexos preparados com o respetivo homopolímero. Verifica-se, também, que na presença de soro a eficácia da transfeção é promovida pelo aumento da razão de carga dos poliplexos. Os poliplexos preparados com o copolímero PEG-b-PAMA nos rácios N/P inferiores a 50/1, uma vez mais, não têm a capacidade de promover a expressão do transgene. No rácio N/P 50/1, possivelmente, a quantidade de polímero catiónico é já suficiente para superar o efeito do segmento hidrofílico e, assim estabelecer interações eletrostáticas com os componentes da membrana celular, que conduzem à internalização do nanossistema e à expressão do gene luciferase, tal como se pode verificar na Figura 14b. Contudo, tendo em conta a ineficácia destes poliplexos, na ausência de soro, para esta razão de carga (50/1), pode-se inferir que as interações estabelecidas com os componentes do soro são, efetivamente, cruciais para que ocorra uma entrega eficiente do plasmídeo. Para as razões de carga superiores a esta verifica-se uma diminuição da expressão do transgene. Esta tendência, pode correlacionar-se com o aumento da morte celular, pois, por exemplo, para o rácio 75/1 a viabilidade celular é inferior a 40% (resultado apresentado no ponto 3.1.2). No caso dos poliplexos preparados com o homopolímero observa-se um decréscimo da expressão do transgene, face à transfeção na ausência de soro. Esta redução da atividade biológica na presença de soro está possivelmente associada às interações eletrostáticas estabelecidas entre os nanossistemas catiónicos e os componentes do soro carregados negativamente. Estas interações, podem induzir modificações estruturais nos poliplexos que impedem a sua ligação à membrana plasmática e/ou diminuem a sua internalização através de vias endocíticas, devido à carga superficial negativa ou ao aumento do tamanho dos poliplexos, respetivamente⁶⁰.

3.1.2. Viabilidade celular

A aplicação de polímeros catiónicos como vetores de entrega de material genético está normalmente associada a alguma citotoxicidade, sendo esta uma das suas principais limitações⁵⁸. Como tal, a avaliação da viabilidade celular após o tratamento com os

diversos poliplexos é de extrema importância. Um dos métodos mais comuns para quantificar a citotoxicidade *in vitro* é a utilização de reagentes colorimétricos, como o Alamar Blue.

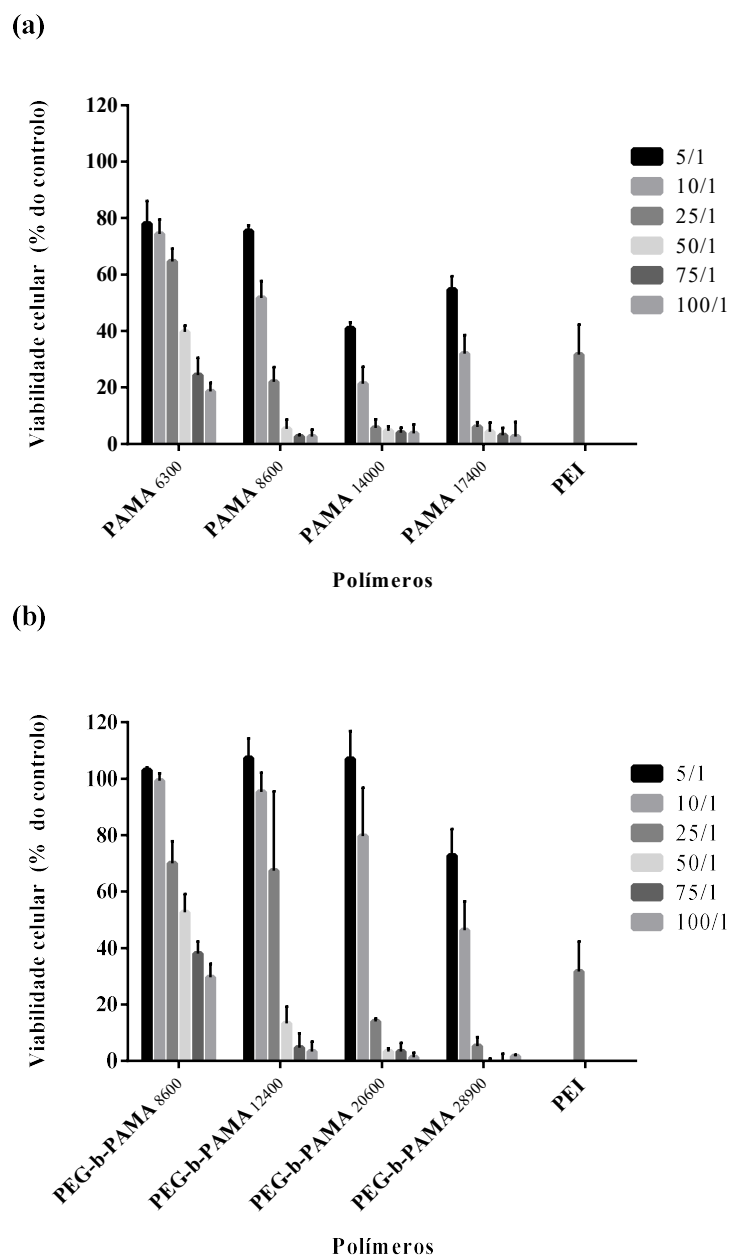


Figura 15- Efeito da composição e do rácio N/P dos poliplexos na viabilidade celular na linha COS-7, na ausência de soro. Os homopolímeros PAMA (a) e os copolímeros PEG-b-PAMA (b) foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc de acordo com o rácio N/P indicado. Como controlo utilizou-se o polímero bPEI preparado no rácio N/P 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após

4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG com 10% FBS e procedeu-se a um período de incubação de 48h. Os dados são expressos em percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células sem tratamento) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Na Figura 15 é possível observar que a toxicidade dos poliplexos é dependente da composição polimérica e do rácio N/P em que estes são preparados. De um modo geral, verifica-se que o aumento do rácio N/P conduz a uma diminuição da viabilidade celular. Este efeito deve-se ao aumento da quantidade de polímero nas razões de carga superiores, que induz um incremento da citotoxicidade, possivelmente, devido ao aumento das interações com a membrana celular. Para além disso, é notório que para o mesmo rácio, a viabilidade celular diminui com o aumento do peso molecular dos polímeros. Este efeito, reportado para outros polímeros, como por exemplo para a bPEI¹⁰⁶ ou para o PDMAEMA¹²⁰, pode estar associado ao estabelecimento de maiores interações eletrostáticas com o glicocálix, em múltiplos locais da superfície celular, que conduzem à disrupção da membrana citoplasmática e ativação de processos apoptóticos⁵⁴.

O polímero PEG-b-PAMA₂₈₉₀₀, no rácio 5/1, rácio para o qual a expressão do gene repórter é superior, apresenta uma viabilidade celular de, aproximadamente, 80%. No entanto, para os rácios superiores a 10/1 este polímero é demasiado agressivo para as células (Figura 15a).

Na presença de soro, a citotoxicidade dos poliplexos diminui significativamente, sendo este efeito, particularmente, notório para os rácios N/P superiores (Figura 16). Esta diminuição da citotoxicidade, deve-se não só à melhoria das condições de crescimento das células, como possivelmente às interações estabelecidas com as proteínas do soro, cuja carga negativa promove a diminuição da densidade de carga superficial dos poliplexos, minimizando as interações destes com a membrana citoplasmática e, conseqüentemente, reduz os danos celulares.

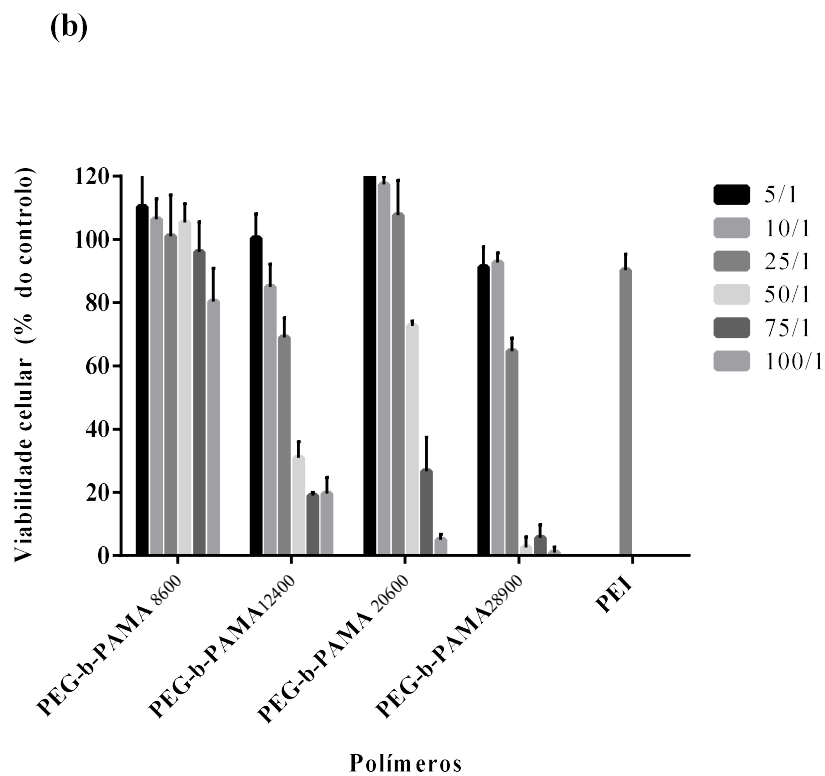
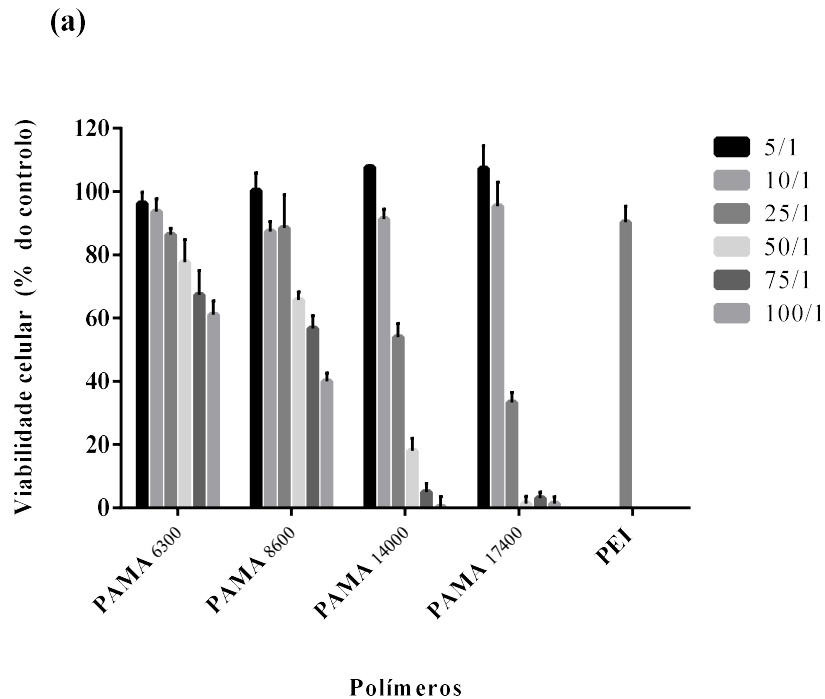


Figura 16- Efeito da presença de soro na viabilidade das células cos-7 após o tratamento com diferentes poliplexos. Os homopolímeros PAMA (a) e os copolímeros PEG-b-PAMA (b) foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc de acordo com o rácio polímero/ADN N/P indicado, à exceção da PEI, cujo rácio N/P é 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio com 10% FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG com 10% FBS e as células foram

incubadas durante 48h. A viabilidade celular foi determinada através de um ensaio de Alamar Blue e os dados são expressos em percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo (células sem tratamento) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Verifica-se, ainda, que, independentemente da condição sob a qual a transfeção é realizada (na presença ou ausência de soro) os poliplexos baseados nos copolímeros são, de um modo geral, menos citotóxicos que os poliplexos formados com os homopolímeros. Na Figura 17, pode-se verificar que os poliplexos baseados no copolímero PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ são muito menos agressivos para as células do que poliplexos preparados com o homopolímero PAMA₁₇₄₀₀. Esta diferença deve-se, possivelmente, ao segmento hidrofílico de polietilenoglicol presente nos copolímeros. Este segmento, de natureza flexível, gera uma camada de hidratação em torno do poliplexo, que pode minimizar as interações das cargas positivas dos poliplexos com a membrana citoplasmática, impedindo a destabilização desta e, conseqüentemente, a ativação de processos apoptóticos e necróticos¹²¹.

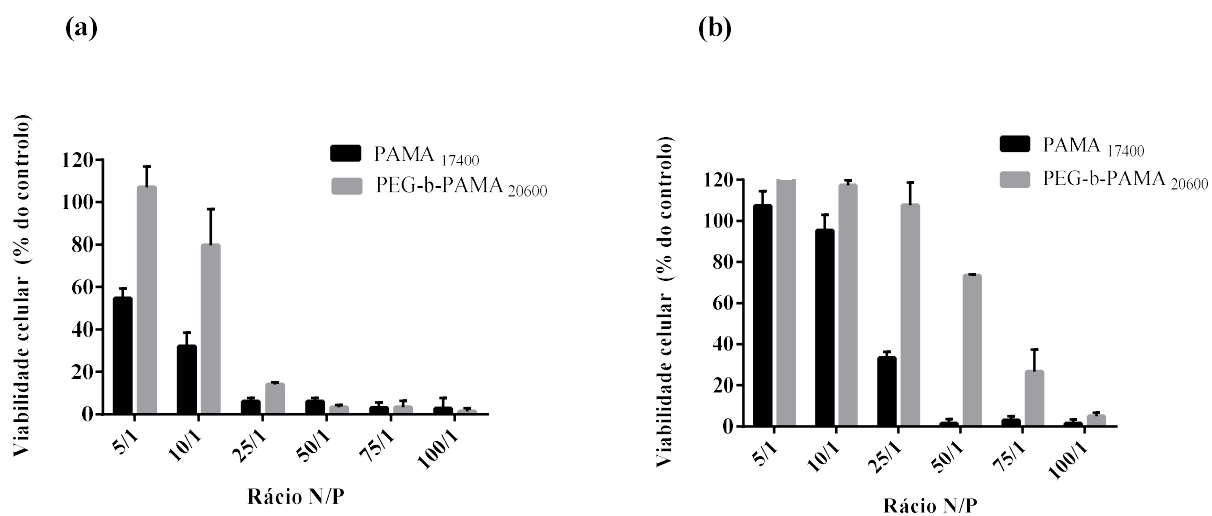


Figura 17 - Efeito do rácio N/P e da peguilação dos poliplexos na viabilidade celular, na ausência de soro (a) e na presença de soro (b), em células cos-7. Os polímeros PAMA₁₇₄₀₀ e PEG-b-PAMA₂₀₆₀₀ foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácio N/P 5/1; 10/1; 25/1; 50/1; 75/1 e 100/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem FBS ou com 10% de FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h. A viabilidade celular foram avaliadas tal como está descrito na secção de “Materias e métodos”. Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

3.1.3. Condensação do material genético

A condensação do material genético em nanopartículas é um pré-requisito essencial para um vetor não-viral de terapia génica, pois é necessário que ocorra uma complexação adequada do ADN, para evitar que este seja degradado pelas endonucleases plasmáticas. A capacidade dos polímeros para condensar o ADN foi avaliada através da quantificação da fluorescência emitida após a adição do brometo de etídeo aos poliplexos. O brometo de etídeo (EtBr) é um agente monovalente intercalante do ADN, que produz um sinal de fluorescência intenso após a formação de um complexo com o ADN.

Como se comprova pelos resultados apresentados na Figura 18, os poliplexos formados com os diversos polímeros testados garantem a proteção do ADN, pois o acesso do brometo de etídeo ao material genético é muito reduzido, ou mesmo nulo. Assim, pode-se inferir que a quantidade de polímero presente nos poliplexos, mesmo nos rácios N/P menores, é suficiente para estabelecer interações electrostáticas com o ADN, condensando-o e protegendo-o. Para além disso, pode-se inferir, que a copolimerização com o PEG incrementa a complexação do material genético, pois o acesso do EtBr ao ADN nos poliplexos formados com os copolímeros é nulo, até mesmo para o rácio 5/1. Este facto deve-se, provavelmente, à camada de hidratação, gerada pelas cadeias de polietilenoglicol, em torno do poliplexo, que por efeitos estéreos, bloqueia o acesso do agente intercalante ao ADN.

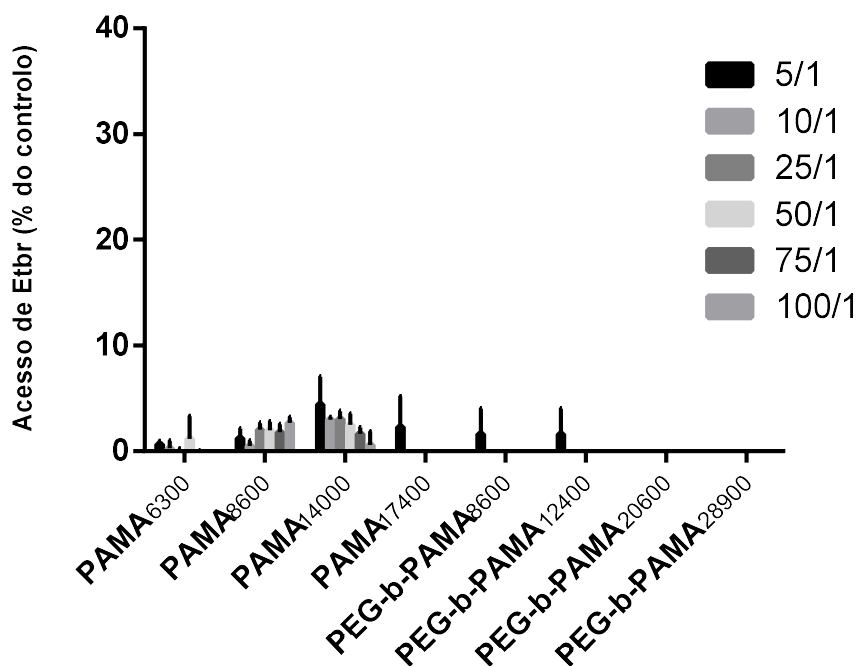


Figura 18- Acessibilidade do brometo de etídio ao ADN dos diferentes poliplexos preparados em vários rácios polímero/ADN N/P . Os copolímeros PEG-b-PAMA e os homopolímeros PAMA foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc de acordo com o rácio N/P indicado. Estes foram incubados com o Brometo de Etídeo, tal como é descrito nos Materiais e Métodos. A quantidade de ADN disponível para interagir com a sonda foi calculada subtraindo os valores da fluorescência residual aos obtidos para as amostras e expressos como percentagem do controlo. O controlo corresponde a ADN livre (100% de acessibilidade do EtBr), na mesma quantidade que o associado aos complexos. Os resultados são expressos como acesso do EtBr (% do controlo) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

A conjugação do polímero poli(metacrilato de 2-aminoetil), em determinados graus de polimerização, com o polietilenoglicol, embora possibilite a condensação do ADN em poliplexos que garantem a entrega e expressão do material genético, de forma mais eficaz que o polímero aceite como o *gold standard* dos polímeros catiónicos, apresenta uma enorme desvantagem: os níveis de citotoxicidade induzidos pelos poliplexos formados.

Sendo a citotoxicidade uma das maiores limitações dos sistemas de entrega de base polimérica, e tendo por base a experiência do nosso grupo de investigação no

desenvolvimento de vetores de terapia génica^{122,123,80,124,125}, optou-se por avaliar o potencial de transporte e entrega de material genético de outros polímeros catiónicos.

3.2. Avaliação da capacidade de transporte e entrega de material genético de poliplexos baseados nos polímeros PDMAEMA e P β AE

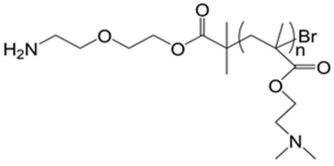
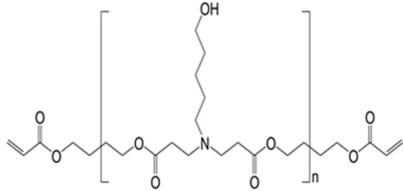
O poli(metacrilato de etilo-2-dimetilamino) PDMAEMA é um polímero catiónico duo-responsivo, cujo potencial como vetor de entrega de material genético tem sido demonstrado *in vitro* e *in vivo*^{126,127}. Segundo a literatura, os PDMAEMAs com elevado peso molecular conduzem à formação de poliplexos pequenos, que apresentam elevados níveis de transfeção¹⁰⁷. No entanto, este incremento na expressão do transgene é comprometido pela elevada citotoxicidade¹²⁰.

Os poli(β -amino ésteres) P β AE são uma classe de polímeros que se destacam pelo seu carácter biodegradável. Para além dos produtos da degradação serem inertes, o processo de degradação em si, facilita a libertação do material genético no núcleo, promovendo a eficácia da transfeção⁷².

Deste modo, o nosso grupo de investigação, avaliou o potencial da combinação destes polímeros, ligados covalentemente num copolímero em bloco, como vetor de terapia génica^{44,128}. O copolímero em bloco PDMAEMA-*b*-P β AE-*b*-PDMAEMA, para além de garantir a complexação do material genético, devido à densidade de carga positiva conferida pelo PDMAEMA, destaca-se pela biocompatibilidade e facilidade de descomplexação do material genético, associada ao carácter biodegradável do P β AE.

Perante a magnitude dos resultados obtidos com o copolímero PDMAEMA-*b*-P β AE-*b*-PDMAEMA, neste projeto pretendeu-se avaliar o efeito da combinação de homopolímeros, PDMAEMA e P β AE, sem que estes estivessem ligados covalentemente.

Tabela 6- Estrutura química, grau de polimerização monómero (GP) e peso molecular dos polímeros PDMAEMA e PβAE .

Polímero	Estrutura química do polímero	GP	M (g/mol)
PDMAEMA		28	4000
PβAE		40	12000

3.2.1. Eficiência da transfeção in vitro – Ensaio de luminescência

Inicialmente foi feito um *screening* da atividade biológica, em células cos-7, de políplexos preparados com o PDMAEMA e PβAE, em cinco combinações com diferentes proporções de cada um deles (1:1; 1:2; 1:4; 2:1; 4:1). Todos os políplexos foram preparados e testados em seis rácios N/P diferentes (2/1; 5/1; 10/1; 25/1; 50/1; 75/1) . Os políplexos preparados com bPEI, foram usadas como um controlo, uma vez que o polímero bPEI é considerado o *gold standard* dos sistemas de entrega de genes baseados em polímeros¹²⁹.

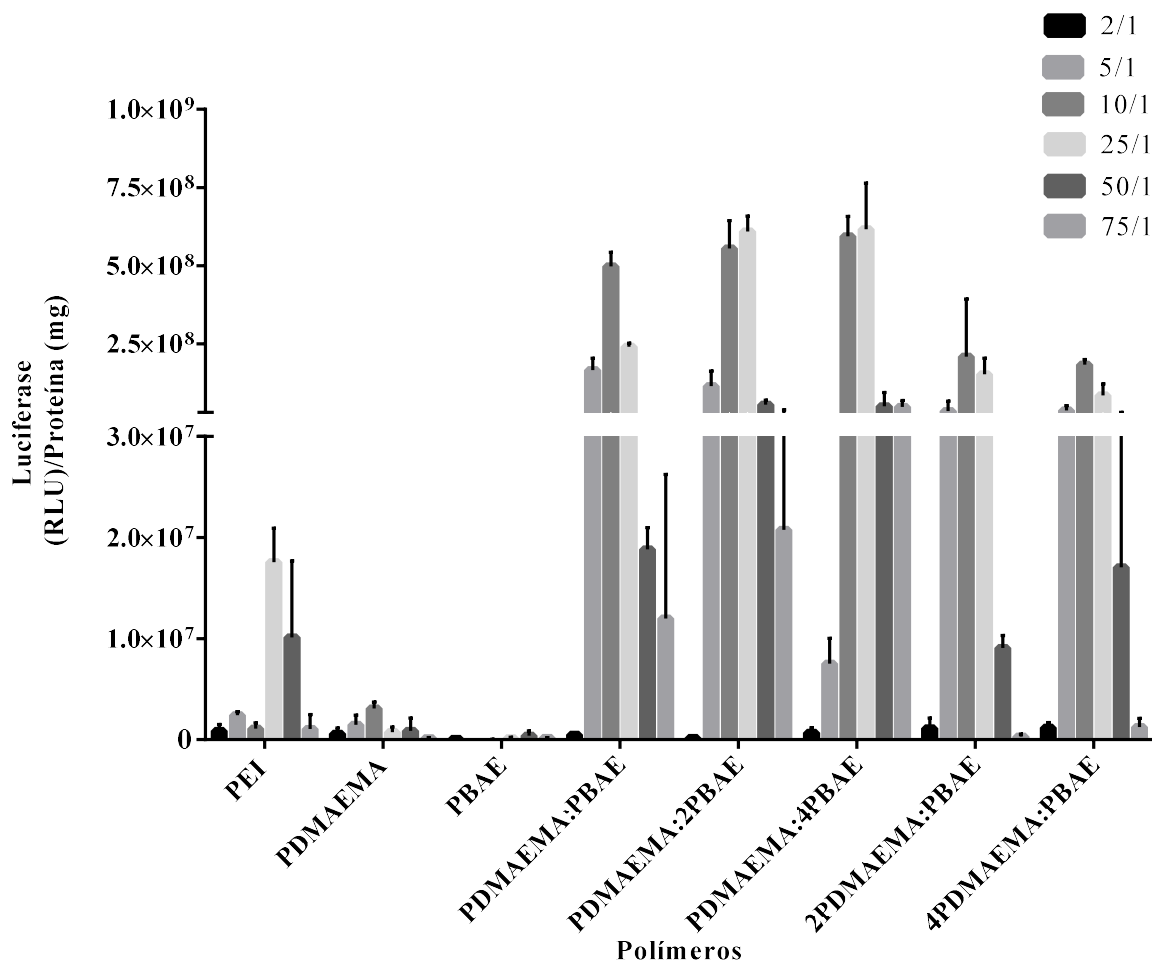


Figura 19 - Efeito do rácio N/P e da composição dos poliplexos na expressão do gene luciferase em células cos-7. Os polímeros bPEI, PDMAEMA, PBAE e as combinação poliméricas PDMAEMA:PBAE, PDMAEMA:2PBAE, PDMAEMA:4PBAE, 2PDMAEMA:PBAE e 4PDMAEMA:PBAE foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácio N/P 2/1; 5/1; 10/1; 25/1; 50/1 e 75/1 . As células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem soro e, posteriormente, adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG com 10% FBS e procedeu-se a um período de incubação de 48h. O nível de expressão génica foi avaliado tal como está descrito na secção de “Materias e métodos”. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

A capacidade dos diferentes poliplexos para entregar de forma eficaz o plasmídeo na linha celular COS-7 é dependente da sua composição polimérica e do rácio N/P (Figura 19). Em relação aos poliplexos preparados com cada um dos homopolímeros, aqueles que contêm o PDMAEMA demonstraram uma capacidade de transfecção superior aos preparados com o PBAE. Contudo, tal como já tinha sido

reportado, anteriormente, poliplexos baseados unicamente no PDMAEMA ou no P β AE têm uma atividade biológica baixa, inferior à dos poliplexos preparados com a bPEI^{128,44}.

Por outro lado, a expressão do gene da luciferase obtida com a maioria dos poliplexos preparados com as diferentes combinações dos dois homopolímeros é muito superior à observada com poliplexos preparados com bPEI ou com os homopolímeros (PDMAEMA e P β AE). Assim, é possível constatar o efeito sinérgico da combinação destes dois polímeros na actividade biológica dos poliplexos. Surpreendentemente, tendo em conta a capacidade de transfecção relativamente reduzida dos poliplexos baseados no P β AE, os nanossistemas preparados com a combinação PDMAEMA:2P β AE e PDMAEMA:4P β AE, que contêm o dobro e quádruplo de P β AE, respectivamente, apresentam uma capacidade de transfecção maior do que as formulações com maior proporção de PDMAEMA.

A dependência da eficiência da transfecção em relação ao rácio N/P também pode ser observada na Figura 19. De um modo geral, os poliplexos preparados nos rácios N/P 10/1 e 25/1 são as melhores formulações para todas as combinações geradas, sendo que os poliplexos preparados com o homopolímero PDMAEMA, também, apresentam uma expressão superior do gene luciferase para o rácio N/P 10/1.

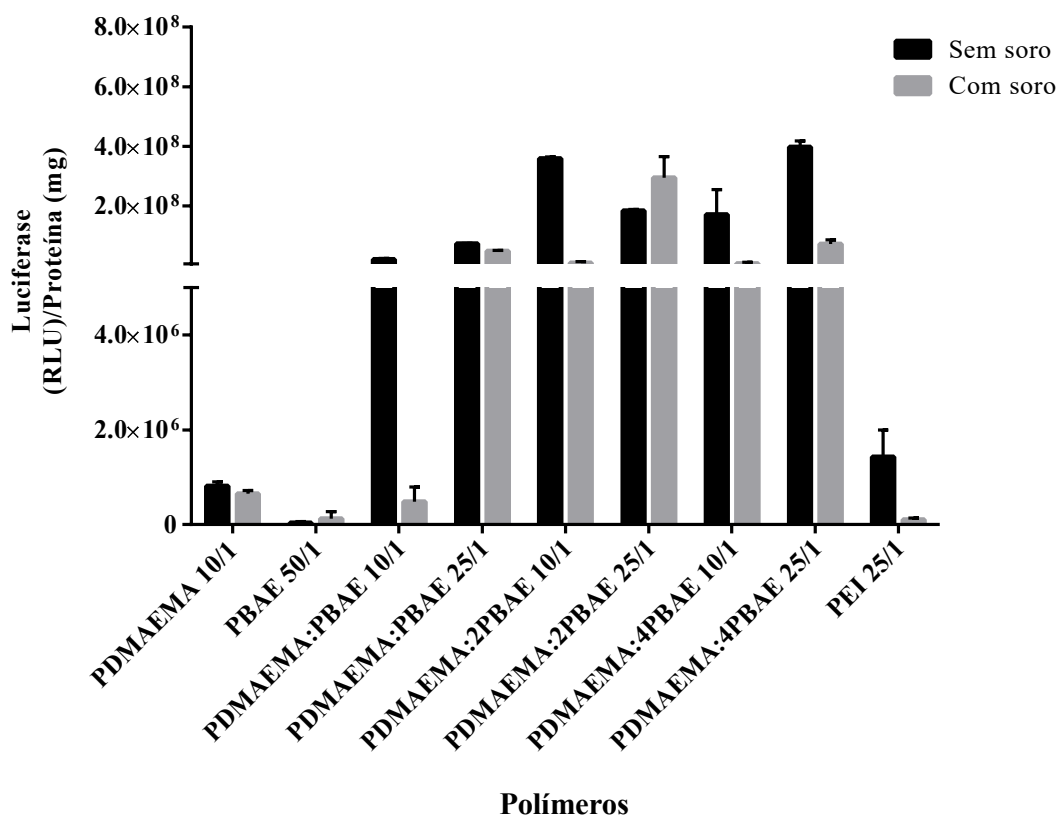


Figura 20- Efeito da presença de soro na atividade biológica dos diferentes poliplexos em células Cos-7. As combinação poliméricas PDMAEMA:PBAE, PDMAEMA:2PBAE, PDMAEMA:4PBAE, 2PDMAEMA:PBAE e 4PDMAEMA:PBAE foram complexados com 1 µg de pCMV.Luc nos rácio N/P 10/1 e 25/1. Como controlo foram preparados poliplexos com o PDMAEMA, o PBAE ou a bPEI, nos rácios de 10/1, 50/1 e 25/1, respetivamente. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem soro, ou meio com 10% FBS e, posteriormente, adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e procedeu-se a um período de incubação de 48h A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteína celular total (média ± desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram que a presença de soro e o rácio N/P condicionam bastante a atividade biológica dos poliplexos testados.

A capacidade de transfecção dos poliplexos baseados no polímero bPEI é negativamente afectada pela presença de soro, uma vez que a expressão do gene luciferase diminui cerca de 15 vezes, face à tranfecção na ausência de soro. Tal como já foi referido anteriormente, a diminuição da expressão do transgene na presença de soro é um efeito comum na transfecção com poliplexos e deve-se, provavelmente, à

diminuição da internalização dos poliplexos, em consequência das interações eletrostáticas estabelecidas entre os polímeros catiónicos e as proteínas plasmáticas, carregadas negativamente. No entanto, a presença de soro mimetiza melhor as condições fisiológicas, pelo que se a transfecção mediada pelos poliplexos for comprometida na sua presença, a sua aplicação *in vivo* será provavelmente limitada.

Os poliplexos preparados com qualquer uma das combinações poliméricas apresentam uma grande diferença de atividade biológica entre os rácios N/P 10/1 e 25/1. De um modo geral, para os poliplexos preparados no rácio 10/1, verifica-se que, na presença de soro, a atividade biológica é bastante inferior à observada na ausência de soro. Apesar de, efectivamente, a presença do soro limitar a eficácia das formulações preparadas no rácio 10/1, a expressão do gene luciferase para esta condição é, ainda assim, muito superior à expressão induzida pelos poliplexos preparados com a bPEI, na mesma condição.

No rácio N/P 25/1, com uma proporção de cargas positivas superior, verifica-se que a presença de soro promove o mesmo nível de expressão para a combinação PDMAEMA:PBAE, um aumento para a combinação PDMAEMA:2PBAE e uma diminuição da expressão para a combinação PDMAEMA:4PBAE. O facto de os rácios N/P mais elevadas se comportarem melhor na presença de soro deve-se, provavelmente, ao aumento da densidade de carga positiva, capaz de neutralizar o efeito promovido pelas proteínas séricas. Como discutido anteriormente, estas proteínas, carregadas negativamente, podem neutralizar e/ou induzir alterações estruturais nos poliplexos catiónicos dificultando a sua internalização celular¹²⁹. O aumento da atividade biológica na presença de soro, pode, também, dever-se à associação de alguns componentes do soro, como por exemplo proteínas, a determinadas formulações de poliplexos que promovem a internalização do nanossistema por endocitose¹²⁴

A diversidade de comportamentos na presença de soro pelas várias combinações poliméricas pode estar associada às diferenças na conformação/estrutura dos poliplexos, na sua estabilidade e na sua interação com as membranas citoplasmáticas¹³⁰. Embora os poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:2PβAE induzam uma maior expressão do transgene, a citotoxicidade desta formulação é bastante elevada (resultados apresentados na secção 3.2.2). Deste modo, a combinação PDMAEMA:4PβAE no rácio 25/1 foi considerada, pela sua relação atividade biológica/citotoxicidade, a melhor formulação, sendo apenas esta utilizada nos ensaios posteriores.

De modo a avaliar a versatilidade da formulação, a atividade biológica dos poliplexos baseados na combinação polimérica PDMAEMA:4P β AE foi testada em três outras linhas celulares. Dada a elevada taxa de mortalidade associada ao cancro da mama, do pâncreas e dos pulmões, foram utilizadas as linhas celulares tumorais humanas MDA-MB-231, MiaPaCA e A549¹³¹. A robustez da formulação foi também avaliada na transfeção de astrócitos humanos normais, reconhecidos como células difíceis de transfetar. A atividade biológica dos poliplexos nas diferentes linhas celulares foi avaliada para o rácio N/P 25/1, sendo utilizado como controlo os poliplexos baseados no polímero bPEI, preparados no mesmo rácio.

Tal como seria de esperar a formulação assume comportamento distintos nas diferentes linhas celulares e, tal como se verificou para a linha celular Cos-7, a presença do soro também influencia a eficácia da transfeção (Figura 21).

Na linha celular A549 os poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:4P β AE induzem níveis de transfeção bastante superiores aos poliplexos baseados no polímero bPEI (Figura 21a). Na presença de soro, a diferença entre a formulação desenvolvida e o polímero controlo é mantida, sendo verificado um aumento de, aproximadamente, 60 vezes dos os níveis de expressão induzidos pelos poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:P β AE, face aos pelos poliplexos baseados na bPEI.

Na linha celular Mia PaCa-2 os poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:4P β AE, induzem níveis de transfeção semelhantes, independentemente da condição sob a qual a transfeção é realizada (presença ou ausência de soro) (Figura 21b). Verifica-se um aumento de, aproximadamente, 45 vezes da expressão do transgene após a transfeção com os poliplexos baseados na combinação, face aos resultados obtidos para o *gold standard*.

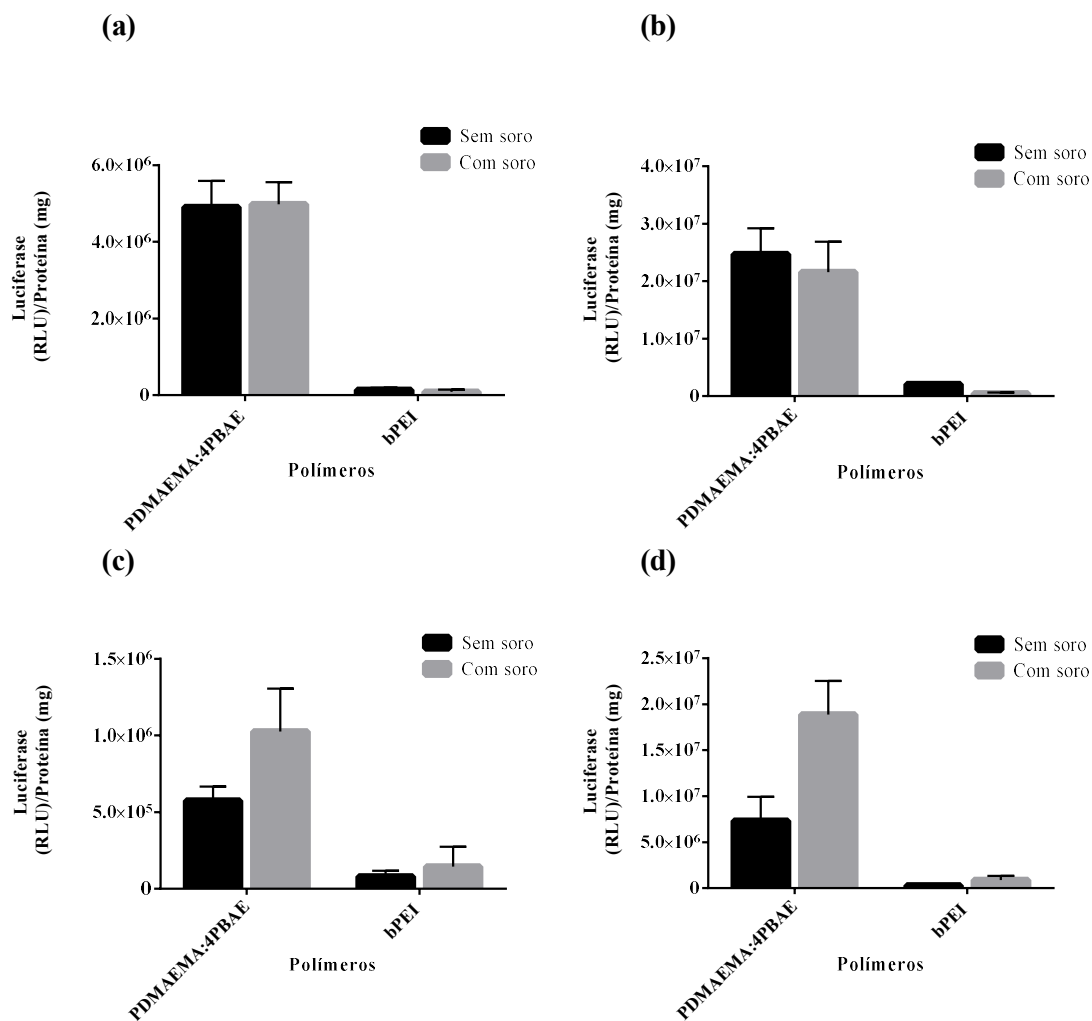


Figura 21 - Efeito da presença de soro na atividade biológica dos diferentes políplexos em células (a) A549, (b) MIA PaCa-2, (c) MDA-MB-231 e (d) Astrócitos humanos. A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE e o polímero bPEI foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc no rácio N/P 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio de cultura, sem FBS ou com 10% de FBS e, posteriormente, adicionaram-se os políplexos. Após 4h de incubação, o meio de cultura foi substituído e procedeu-se a um período de incubação de 48h. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteína celular total (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de três experiências independentes.

Na linha celular MDA-MB-231, a formulação testada apresenta uma expressão do transgene cerca de 7 vezes superior à dos políplexos controlo (Figura 21c). Na presença de soro é possível observar um aumento da atividade biológica para a combinação polimérica. Isto, provavelmente, deve-se ao aumento da viabilidade celular

(resultados apresentados na secção 3.2.2) e/ou ao aumento da internalização dos poliplexos promovida pela associação dos componentes do soro ao nanossistema.

Nos astrócitos humanos normais, os poliplexos baseados em PDMAEMA:4P β AE, na presença de soro, promovem níveis de expressão do transgene, aproximadamente 21 vezes superiores, face aos preparados com a bPEI (Figura 21d).

Nas várias células testadas pode-se constatar que os poliplexos baseado na combinação PDMAEMA:4P β AE, promovem níveis de expressão génica superiores na presença do soro, condição que melhor mimetiza as condições fisiológicas. Para além disso, os resultados também sugerem que a formulação desenvolvida é um agente de transfecção muito mais eficiente do que a bPEI, polímero reconhecido como o *gold standard* dos polímeros catiónicos.

3.2.2. Ensaio de viabilidade celular

Tal como já foi referido anteriormente, a análise da viabilidade celular após o tratamento com os poliplexos é da maior importância, pois a citotoxicidade associada à densidade de carga positiva destes nanossistemas é reportada como uma das maiores limitações à sua implementação na clínica^{21,58,55}.

A viabilidade celular é condicionada pela composição dos poliplexos e pelo rácio N/P em que estes são utilizados (Figura 22). Aumentando a proporção de polímero, verifica-se um aumento da citotoxicidade para todas as formulações, excepto para o P β AE, cujo rácio máximo testado (75/1) apresenta uma viabilidade de 85%. Nos rácios N/P superiores, o aumento da carga superficial dos poliplexos está associado a uma maior agressividade para as membranas celulares, pois as interações eletrostáticas estabelecidas são mais fortes⁵⁵.

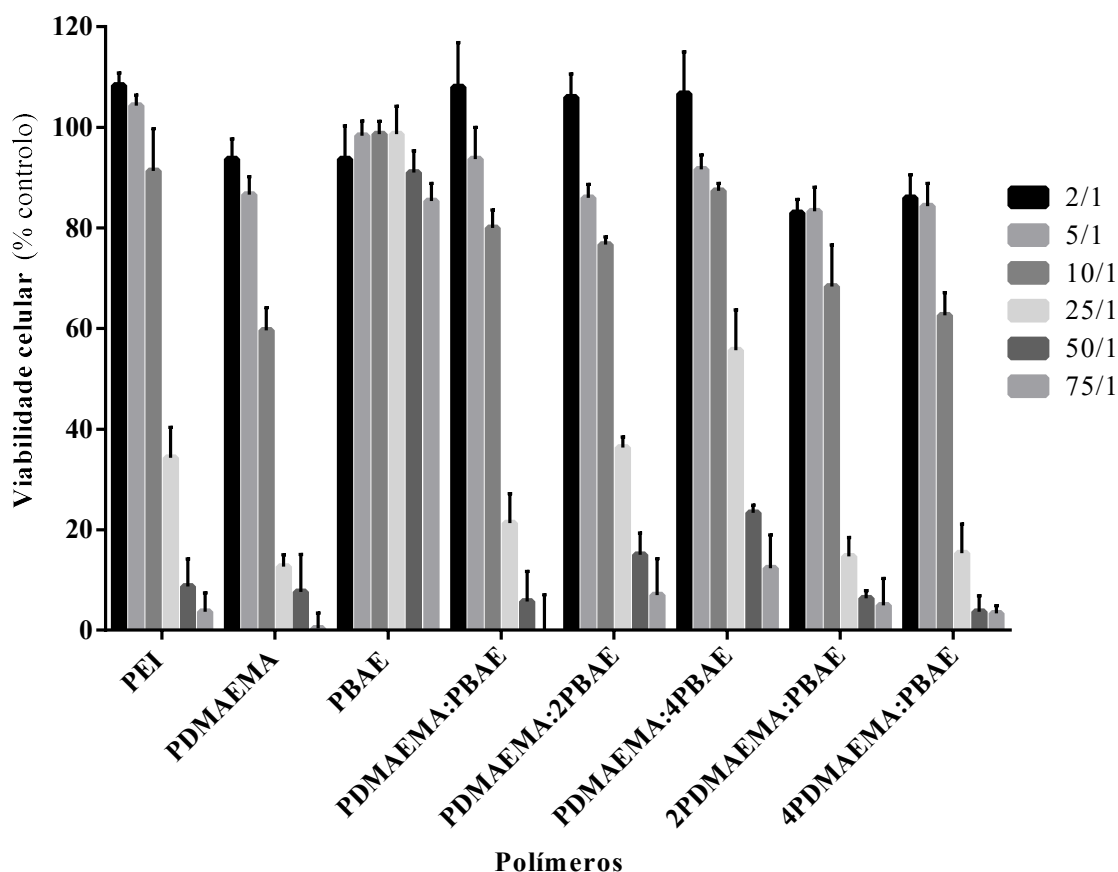


Figura 22- Efeito da composição e do rácio N/P dos políplexos na viabilidade celular na linha COS-7. Os polímeros bPEI, PDMAEMA, PBAE e as combinação poliméricas PDMAEMA:PBAE, PDMAEMA:2PBAE, PDMAEMA:4PBAE, 2PDMAEMA:PBAE e 4PDMAEMA:PBAE foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácio N/P 2/1; 5/1; 10/1; 25/1; 50/1e 75/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio sem FBS e posteriormente adicionaram-se os políplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG com 10% FBS e células foram incubadas 48h. A viabilidade celular foi quantificada através do método de Alamar Blue, tal como está descrito no capítulo dos “Materiais e métodos”, e é expressa em percentagem do controlo positivo (células não transfetadas) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Os políplexos preparados com o homopolímero P β AE, nas condições testadas, são biocompatíveis, uma vez que não é induzida uma citotoxicidade significativa para qualquer um dos rácios N/P estudados. Contrariamente ao P β AE, os políplexos preparados com o PDMAEMA apresentam uma citotoxicidade superior a 90% para os rácios N/P mais elevados. A citotoxicidade de políplexos é, pelo menos em parte, atribuída às interacções electrostáticas que se estabelecem entre o polímero catiónico e

as membranas celulares carregadas negativamente⁵⁵. Estas interações são, principalmente, dependente de dois aspectos: da densidade de carga positiva, e da estrutura do polímero¹³⁰. Ambas as propriedades justificam a diferença na viabilidade celular obtida após o tratamento com os poliplexos baseados nos homopolímeros. O P β AE como tem uma estrutura mais rígida, tem uma maior dificuldade em interagir com a membrana celular. Para além disso, o rearranjo tri-dimensional dos resíduos catiónicos, com maior espaço entre os grupos amina, induzem, muito provavelmente, uma menor citotoxicidade^{113,128,44}. Quanto aos poliplexos preparados com as diferentes combinações dos homopolímeros PDMAEMA e PBAE, verifica-se um aumento da viabilidade celular com o aumento da proporção de PBAE (Figura 22).

Na Figura 23, a viabilidade celular foi analisada após a incubação das células COS-7 com os poliplexos, preparados com as várias combinações poliméricas, os homopolímeros e a PEI, nos rácios N/P 10/1 e 25/1, na presença de soro. Verifica-se um aumento da viabilidade celular na presença de soro, para todas as formulações testadas, à excepção do PBAE, cuja viabilidade é semelhante à obtida na transfecção sem soro. O aumento da viabilidade celular pode ser explicado não só pelas melhores condições de crescimento celular, como também, com a possível redução de toxicidade de alguns poliplexos, promovida pela sua interacção com os componentes do soro. Esta última observação é, particularmente, evidente para poliplexos baseados no bPEI, que são muito menos tóxicos na presença de soro. Estes poliplexos, muito provavelmente, interagem com componentes do soro, que diminuem a sua capacidade de ligação e/ou internalização pelas células alvo, reduzindo, conseqüentemente, tanto a sua citotoxicidade como a sua capacidade de transfecção.

Na presença de soro, as formulações que promovem uma maior expressão do transgene são os poliplexos preparados com as combinações PDMAEMA:2P β AE e PDMAEMA:4P β AE no rácio de 25/1. Analisando a citotoxicidade induzida por cada uma destas formulações, a combinação PDMAEMA:4P β AE destaca-se, claramente, de forma positiva, pois a combinação PDMAEMA:2P β AE induz uma morte celular de cerca de 40%, mesmo na presença de soro. Deste modo, aliando os resultados do ensaio de luminescência com estes resultados de viabilidade celular, a combinação PDMAEMA:4P β AE apresenta-se como a formulação mais promissora, pelo que apenas esta combinação polimérica foi estudada nos ensaios posteriores de avaliação da atividade biológica.

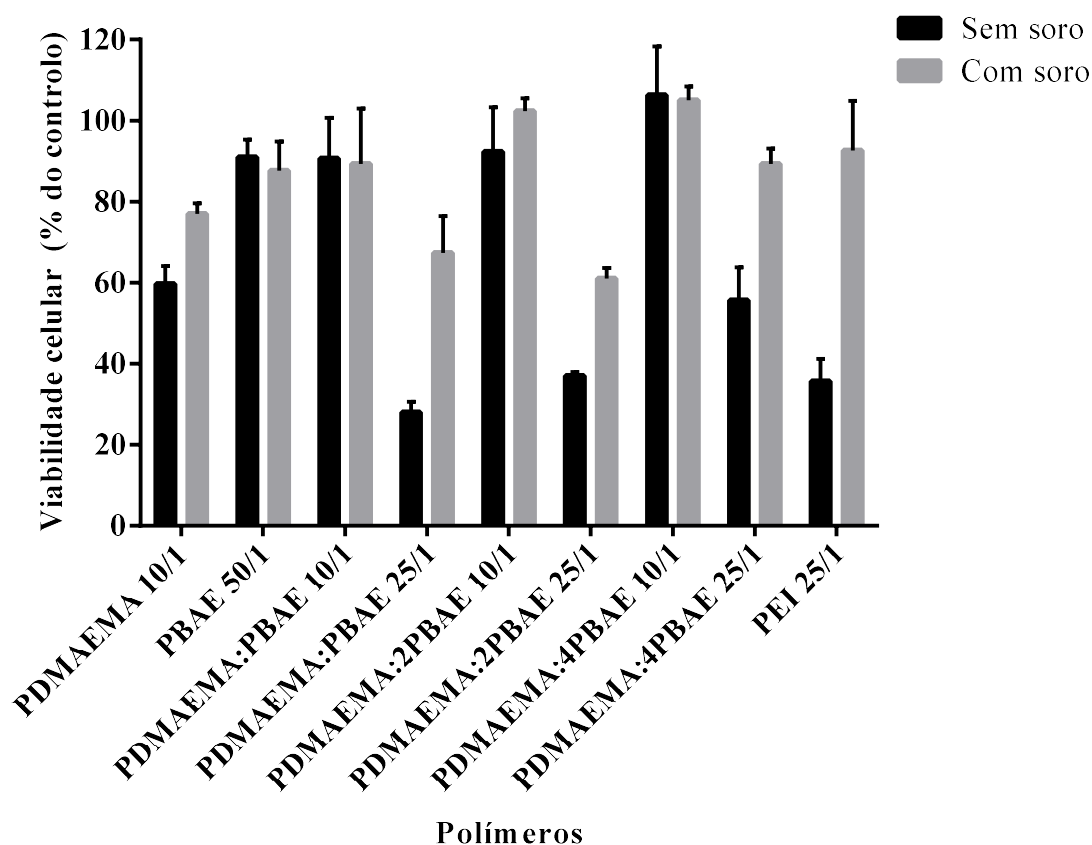


Figura 23– Efeito da presença de soro na viabilidade das células Cos-7, após o tratamento com os diferentes poliplexos. As combinação poliméricas PDMAEMA:PBAE, PDMAEMA:2PBAE, PDMAEMA:4PBAE, 2PDMAEMA:PBAE e 4PDMAEMA:PBAE foram complexados com 1 μ g de pCMV.Luc nos rácio N/P 10/1 e 25/1. Como controlo foram preparados poliplexos com o PDMAEMA, o PBAE ou a bPEI, nos rácios de 10/1, 50/1 e 25/1, respetivamente. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio com, ou sem, 10% FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h. A viabilidade celular foi quantificada através do método de Alamar Blue, tal como está descrito no capítulo dos “Materiais e métodos”, e é expressa em percentagem do controlo positivo (células não transfetadas) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de pelo menos três experiências independentes.

Na Figura 24, a viabilidade celular foi analisada após a incubação das células A549, MIA PaCa-2, MDA-MB-231 e astrócitos humanos normais com os poliplexos, preparados com a combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE e bPEI, nos rácios N/P 25/1. Tal como para a atividade biológica, os níveis de viabilidade celular após a incubação com os poliplexos preparados com a combinação PDMAEMA:4PBAE,

também dependem da linha celular. Tal como se verificou para linha celular Cos-7, a viabilidade celular após o tratamento com ambos os poliplexos é superior na presença de soro. Na ausência de soro, verifica-se que a formulação desenvolvida é muito menos tóxica do que os poliplexos preparados com o polímero bPEI em todas as células, excepto nas MDA-MB-231. Na presença de soro, os poliplexos baseados na combinação polimérica apresentam uma viabilidade celular bastante aceitável, sendo superior à dos poliplexos controlo nas células MIA-PaCa-2 e nos astrócitos humanos normais.

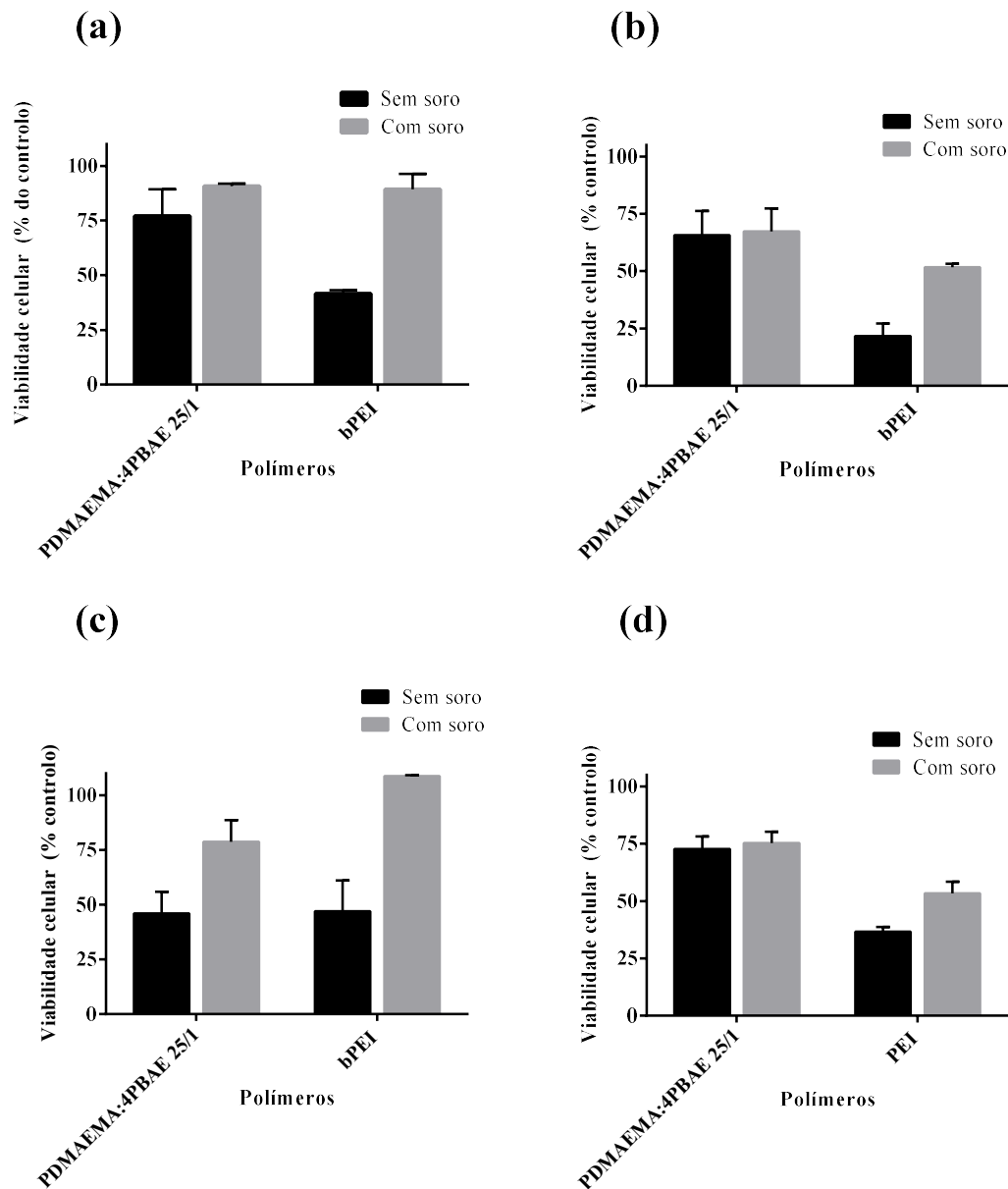


Figura 24-Viabilidade das células (a) A549, (b) MIA PaCa-2, (c) MDA-MB-231 e (d) astrócitos, após o tratamento com os diferentes poliplexos. A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE foi complexada com 1 μ g de pCMV.Luc no rácio N/P 25/1. Como controlo foram preparados poliplexos com o polímero bPEI, no rácios de 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio com 10% FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h A viabilidade celular foi quantificada através do método de Alamar Blue, tal como está descrito no capítulo dos “Materiais e métodos”, e é expressa em percentagem do controlo positivo (células não transfetadas) (média \pm desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de três experiências independentes.

3.2.3. Eficiência da transfeção in vitro – Citometria de fluxo

Foram realizados ensaios de citometria de fluxo para avaliar a eficiência da formulação desenvolvida. Nestes ensaios as células foram transfectadas com os poliplexos preparados com o plasmídeo que contém o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP).

Foram testadas quatro formulações: os poliplexos baseados no polímero bPEI, preparados no rácio 25/1; os poliplexos baseado nos homopolímeros PDMAEMA e P β AE e na combinação PDMAEMA:4P β AE, preparados nos rácios para os quais apresentam níveis superiores de expressão do gene luciferase, 10/1, 50/1 e 25/1, respectivamente. A eficiência da transfeção foi avaliada somente na linha celular COS-7 (Figura 25).

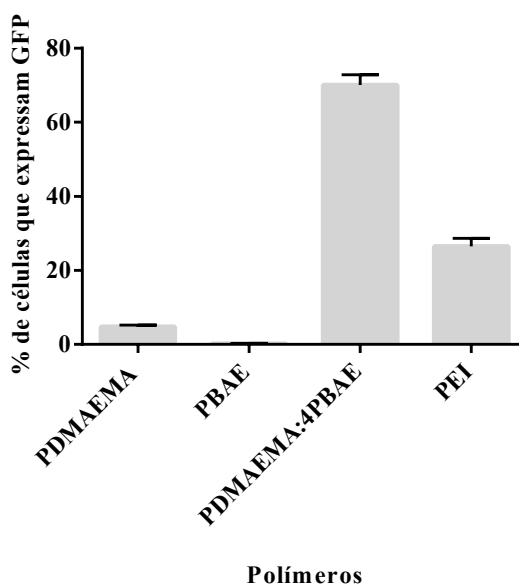


Figura 25 – Efeito da composição dos poliplexos na expressão da proteína verde fluorescente, avaliada por citometria de fluxo, na presença de soro em células cos-7. A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE foi complexada com 4 μ g de pCMV-GFP no rácio N/P 25/1. Como controlo foram preparados poliplexos com o PDMAEMA, o PBAE ou a bPEI, nos rácios de 10/1, 50/1 e 25/1, respectivamente. As células foram incubadas com 1 mL de meio com 10% FBS e posteriormente adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h. Os resultados são expressos em percentagem de células que expressam GFP. Os resultados são representativos de apenas uma experiência.

Os poliplexos baseados na combinação polimérica PDMAEMA:4P β AE, preparados no rácio N/P 25/1, induzem a expressão do gene repórter em, aproximadamente, 70% das células. Já os poliplexos baseados nos homopolímeros, PDMAEMA e P β AE, promovem a transfeção de menos de 10% das células. Assim, uma vez que a percentagem de células transfetadas com a combinação polimérica é sete vezes superior, face à obtida para os homopolímero, verifica-se um efeito sinérgico também no que diz respeito à percentagem de células transfetadas. Para além disso, constatou-se também que a formulação desenvolvida promove a transfeção de uma percentagem de células 3 vezes superior à obtida com os poliplexos baseados na bPEI. Assim, estes resultados sugerem que os poliplexos preparados com a formulação desenvolvida são um agente de transfeção bastante melhor que os poliplexos preparados com o reagente de transfeção *standard*, não só pela superioridade nos níveis de expressão, como também, pela capacidade de transfectar muito mais células.

3.2.4. Estudo das vias endocíticas envolvidas na internalização dos poliplexos

Para a optimização de um sistema de transporte e entrega do material genético é imprescindível avaliar o mecanismo pelo qual esse nanossistema é internalizado, uma vez que a via de internalização dos poliplexos afecta a cinética, o seu processamento intracelular e, conseqüentemente, a eficácia da transfeção⁸⁶.

A endocitose é o principal mecanismo de internalização de vetores não virais. Esta pode classificar-se em fagocitose, processo restrito a células especializadas, no qual ocorre a internalização de partículas com diâmetros na ordem dos μ m, e em pinocitose¹³². A pinocitose é subdividida em macropinocitose, endocitose dependente de clatrin, endocitose dependente de caveolinas, e endocitose independente de clatrin e caveolinas¹³².

De modo a determinar qual a via endocítica envolvida na internalização dos poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:4P β AE, a atividade biológica desses nanossistema foi avaliada na presença de vários inibidores: a amilorida, que inibe a macropinocitose através da inibição da bomba de prótons Na⁺/H⁺; a filipina que bloqueia a endocitose mediada por caveolinas através do sequestro de colesterol da membrana citoplásmica e a clorpromazina, que inibe o processamento intracelular das clatrin e, conseqüentemente, a endocitose mediada por clatrin^{101,133} (Tabela 7).

Tabela 7– Inibidores de endocitose e respectivas vias de atuação.

Inibidor	Macropinocitose	Endocitose dependente de clatrin	Endocitose dependente de caveolinas
Amilorida	x		
Filipina			x
Clorpromazina		x	

Pelos resultados apresentados na Figura 26, pode-se verificar que a incubação das células com a solução 200 μ M de clorpromazina, induz uma diminuição acentuada, próxima de 90%, da expressão do gene luciferase. Por outro lado, a incubação das células com a filipina e com a amilorida, na gama de concentrações testada, não alterou a expressão do transgene. Assim, pode inferir-se que a via dependente de caveolinas e a macropinocitose, não estão, significativamente, envolvidas na internalização deste nanossistema, nas células Cos-7. Deste modo, os resultados apontam que os políplexos baseados na combinação PDMAEMA:4PBAE são, maioritariamente, internalizados por endocitose dependente de clatrin, uma via clássica de internalização de nanopartículas com um diâmetro médio inferior a 200 nm⁸⁴. O processo de endocitose dependente de clatrin caracteriza-se pela formação de uma vesícula revestida por clatrin, com um diâmetro médio de 100 a 200 nm, que leva à formação de endossomas que, posteriormente, se fundem com o lisossoma⁸⁸. Portanto, a eficácia da transfeção, após a internalização por esta via endocítica, deve-se à capacidade de escape da via endolisossomal dos políplexos, provavelmente, através do mecanismo de “esponja de prótons”. A protonação dos grupos amina do segmento catiónico do PDMAEMA na combinação PDMAEMA:4P β AE, ao evitar a acidificação da vesícula, promove o aumento da osmolaridade (devido ao influxo de iões cloreto) e, conseqüentemente, induz o seu rebentamento osmótico, com a libertação dos políplexos no citoplasma. Para além disso, a carga superficial positiva dos complexos pode induzir a destabilização das membranas endossomais, promovendo a libertação dos políplexos no citoplasma⁹⁴.

A maioria dos estudos sobre a internalização de vetores de entrega de material genético provém da utilização de inibidores químicos⁸⁴. Embora, alguns destes sejam considerados específicos para algumas das vias descritas, a sua utilização interfere com processos essenciais do metabolismo celular. Por exemplo, a utilização de inibidores da

endocitose dependente de clatrina, tais como a clorpromazina, pode prejudicar alguns processos mediados por receptores¹⁰¹. Já a utilização da filipina, em concentrações elevadas, afeta todos os processos associados às jangadas lipídicas, podendo comprometer a integridade da membrana citoplasmática¹⁰¹. Perante isto, em paralelo aos ensaios de quantificação da inibição do gene repórter, foi avaliada a citotoxicidade destes inibidores nas diferentes concentrações (Figura 27), tendo sido definido como concentração máxima de fármaco a concentração que induzia a morte a cerca de 50% das células. Deste modo, pode constatar-se, que a ausência de efeito (inibição da atividade biológica) após a incubação com a filipina ou com a amilorida não se deve a uma concentração insuficiente. Para além disso, verificou-se que a clorpromazina, mesmo na concentração mais baixa (75 μ M), para a qual não apresenta qualquer efeito, promove já alguma citotoxicidade, face às células incubadas somente com os poliplexos.

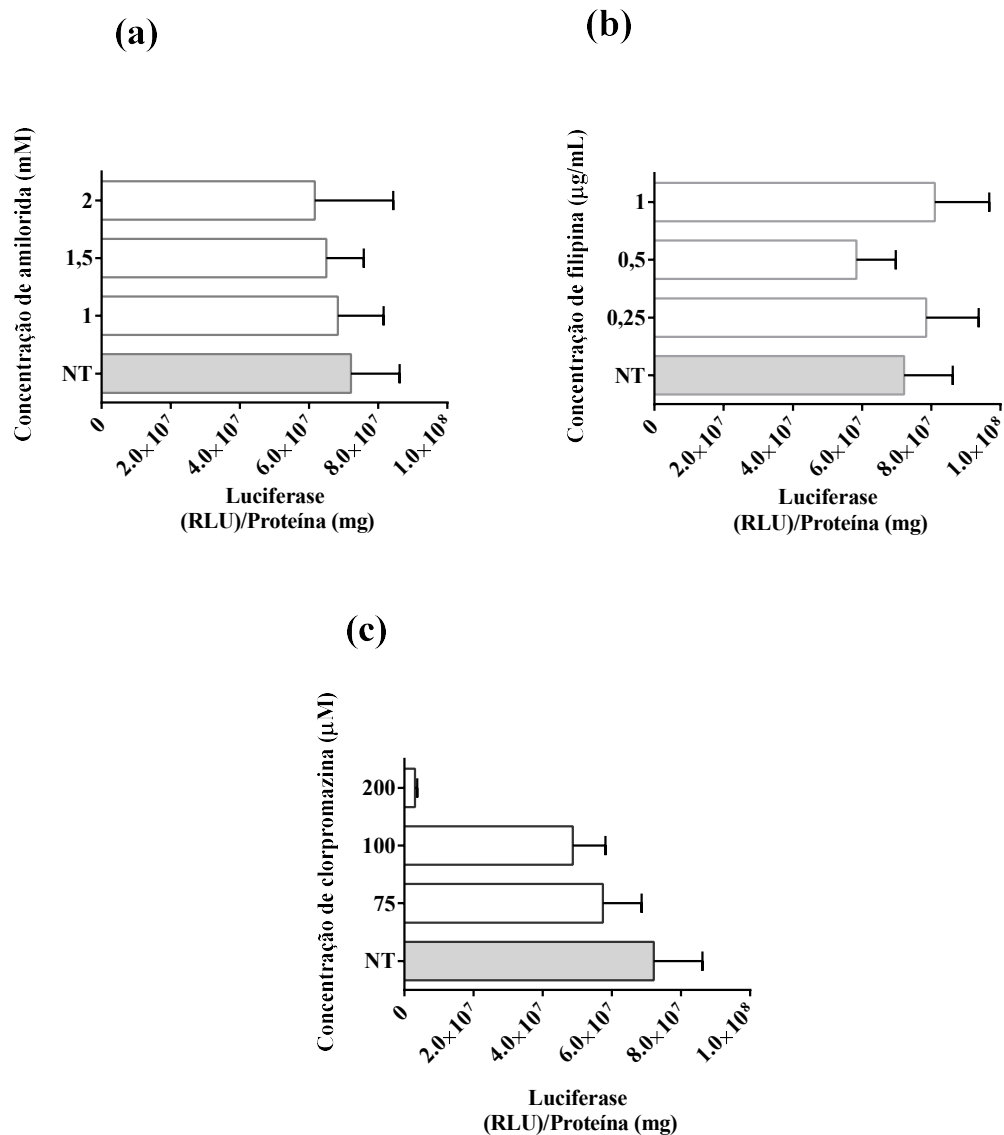


Figura 26 - Efeito dos inibidores de endocitose na expressão do gene luciferase nas células Cos-7, após a transfeção com os poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:4PBAE. A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE foi complexados com 1 µg de pCMV.Luc no rácio N/P 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio com 10% de FBS e tratadas com os inibidores: (a) amilorida (1-2 mM) (b) filipina (0,25-1 µg/mL) e (c) clorpromazina (75-200 µM), ou não tratadas (NT). Após um período de incubação de 1h com os fármacos, adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h. O nível de expressão génica foi avaliado tal como está descrito na secção de “Materias e métodos”. A atividade biológica é expressa em RLU (unidades relativas de luz) de luciferase por miligrama de proteína celular total (média ± desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes

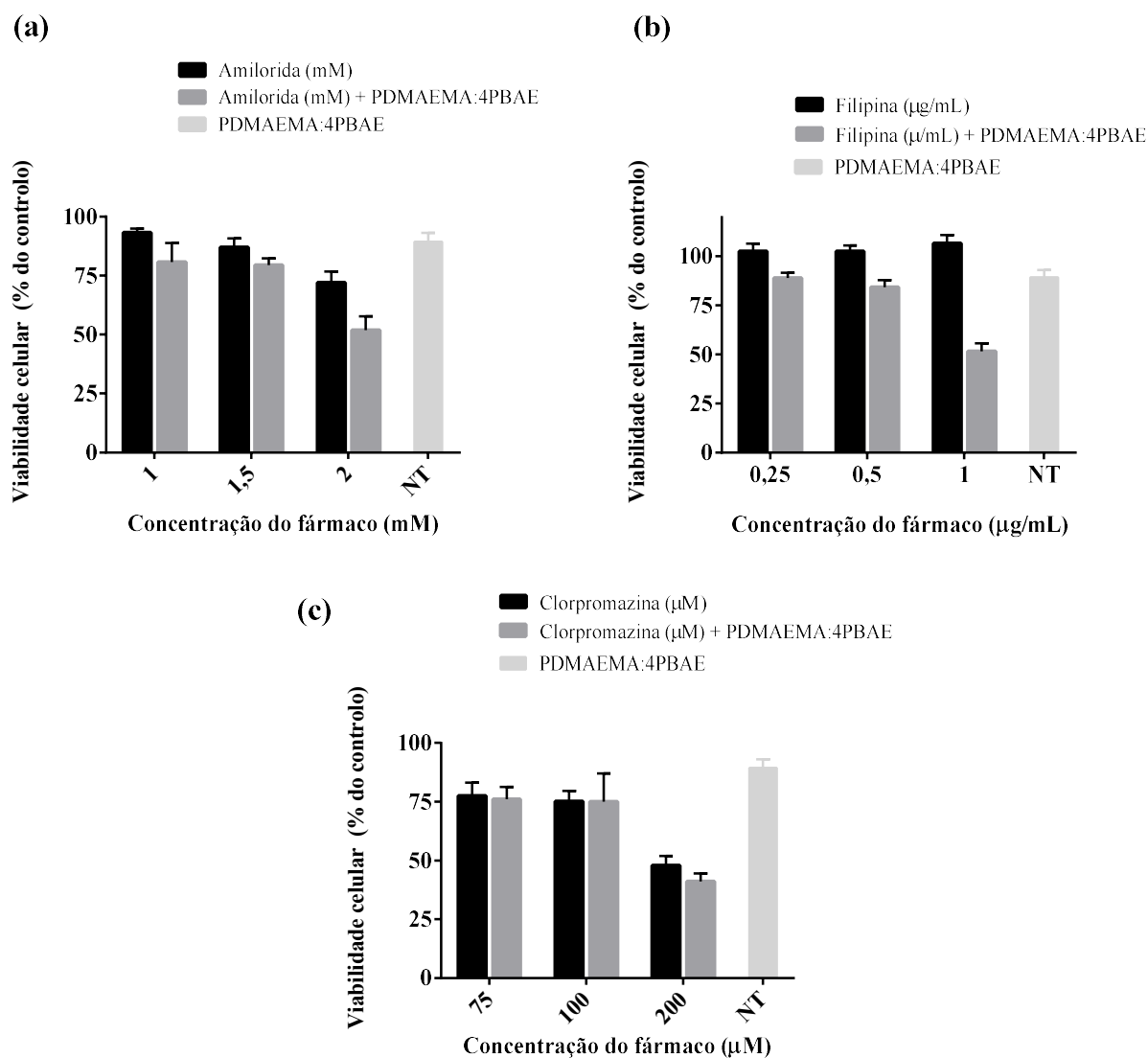


Figura 27– Efeito dos inibidores de endocitose na viabilidade das células Cos-7, após a transfeção com os poliplexos baseados na combinação PDMAEMA:4PBAE. A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE foi complexados com 1 µg de pCMV.Luc no rácio N/P 25/1. As células foram incubadas com 0,3 mL de meio com 10% de FBS e tratadas com os inibidores: (a) amilorida (1-2 mM), (b) filipina (0,25-1 µg/mL) e (c) clorpromazina (75-200 µM), ou não tratadas (NT). Após um período de incubação de 1h com os fármacos, adicionaram-se os poliplexos. Após 4h de incubação, o meio foi substituído por DMEM-HG completo e as células foram incubadas 48h. A viabilidade celular foi quantificada através do método de Alamar Blue, tal como está descrito no capítulo dos “Materiais e métodos”, e é expressa em percentagem do controlo positivo (células não transfetadas) (média ± desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

3.2.5. Caracterização físico-química dos poliplexos

A análise das características físico-químicas das nanopartículas é muito importante, uma vez que são avaliados parâmetros essenciais ao seu sucesso *in vitro* e *in vivo*. A análise do tamanho e da carga superficial dos poliplexos é crucial para correlacionar as suas propriedades físico-químicas com a sua capacidade de transfecção e, conseqüentemente, para conceber novos e eficientes nanosistemas de entrega de genes⁵⁸.

3.2.5.1. Tamanho e potencial zeta dos poliplexos

O tamanho de partícula pode ser determinado através da técnica de difusão dinâmica da luz (DLS), uma técnica que se baseia na análise do espalhamento de luz promovida pelas partículas.

Nas medições do DLS, presentes na Figura 28a, pode-se verificar que a combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE, preparada no rácio N/P 25/1, tem a capacidade de condensar o pDNA em nanopoliplexos (130 nm). Este diâmetro médio possibilita a internalização celular dos poliplexos através de endocitose dependente de clatrina, tal como foi sugerido anteriormente⁸⁴. Para além disso, o tamanho destes poliplexos possibilita a sua aplicação em estratégias de terapia génica antitumorais, nas quais se realiza o *targeting* passivo do vetor, beneficiando-se do efeito de permeação e retenção melhorada¹³⁴.

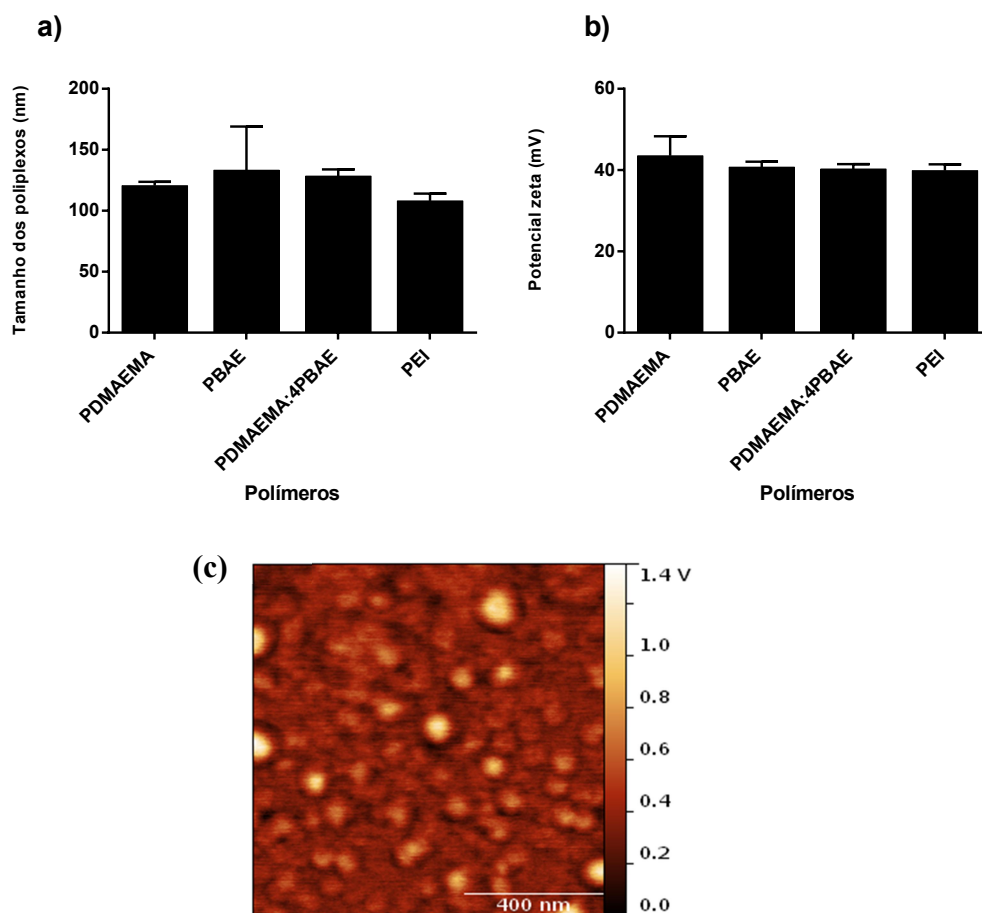


Figura 28- Caracterização físico-química e morfológica dos políplexos: (a) Tamanho, (b) potencial zeta e (c) microscopia de força atômica (AFM) . A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE foi complexada com 1 μ g de pCMV.GFP no rácio N/P 25/1. Como controlo foram preparados políplexos com o PDMAEMA, o PBAE ou a bPEI, nos rácios de 10/1, 50/1 e 25/1, respetivamente. Os resultados do tamanho das partículas é expresso em nanómetros (média \pm desvio padrão) e do potencial zeta em mv (média \pm desvio padrão). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Os homopolímeros PDMAEMA e PBAE geram políplexos com tamanhos idênticos, aos dos políplexos preparados com a combinação de polímeros, o que leva a crer que o não é o tamanho que justifica os diferentes níveis de citotoxicidade e capacidade de transfecção. A heterogenidade dos políplexos, resultante da agregação multimolecular que ocorre durante o seu processo de formação, é uma característica típica dos nanossistemas de base polimérica, que se reflete no índice de polidispersão, variando estes entre 0,2 a 0,4 para as formulações desenvolvidas.

Na Figura 28b, é apresentado o potencial zeta dos políplexos baseados na combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE, bem como nos homopolímeros e no

polímero controlo, preparados nos rácios para os quais apresentavam maior atividade biológica. Todos os poliplexos preparados apresentam um potencial zeta positivo, que oscila entre os +39 mV e os +43 mV, demonstrando assim que a superfície do nanossistema é formada pelo polímero catiónico. A carga superficial positiva dos poliplexos permite que estes estabeleçam interações eletrostáticas com a membrana citoplasmática que promovem a sua internalização¹³⁵. Para além disso, tal como foi referido anteriormente, a eficácia da transfeção pode estar também associada à libertação dos poliplexos no citoplasma, após a destabilização das membranas endossomais, promovida pela carga superficial positiva dos complexos⁹⁴.

Tal como se constatou na medição dos tamanhos, os poliplexos preparados com os homopolímeros PDMAEMA e PBAE têm um potencial zeta muito semelhante, de aproximadamente +40 mV. Assim, pode-se inferir que, relativamente às formulações estudadas, a composição polimérica, a estrutura do polímero e a conformação adquirida no processo de *self-assembly* dos poliplexos são os principais fatores responsáveis pelo desempenho destes nanossistemas quanto à atividade biológica e citotoxicidade.

A caracterização morfológica dos poliplexos baseados na combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE, através da técnica de microscopia de força atómica revelou que os poliplexos têm uma estrutura aproximadamente esférica e um diâmetro médio pequeno (Figura 28c).

Correlacionando estes resultados com os obtidos nos estudos de atividade biológica, pode-se concluir que os poliplexos com o nível de expressão do transgene superior têm uma carga superficial positiva e um tamanho médio de 130 nm, que facilita a interação com as células alvo, incrementando a internalização celular e, conseqüentemente, promovendo uma elevada atividade biológica.

3.2.5.2. Condensação do DNA

A condensação do DNA é um processo crucial para garantir que a transfeção, com sistemas de transporte e entrega de material genético de base polimérica, seja bem sucedida⁵⁸. Os polímeros catiónicos têm a capacidade de condensar e proteger o DNA em estruturas compactas, através das interações eletrostáticas estabelecidas entre os grupos fosfato do DNA e os grupos amina do polímero.

Os políplexos resultantes da complexação do material genético com a bPEI, com os homopolímeros PDMAEMA e PBAE, bem como com as diferentes combinações destes, foram preparados em seis rácios N/P (do 2/1 a 75/1). A condensação do DNA foi, posteriormente, avaliada num ensaio de intercalação de brometo etídeo.

Na Figura 29, verifica-se a diminuição da fluorescência do brometo de etídeo com o aumento do rácio N/P. O aumento da quantidade polímero traduz-se num aumento da densidade de carga positiva, que aumenta o nível de interação com as cargas negativas do DNA, com consequente elevado grau de condensação e proteção do DNA.

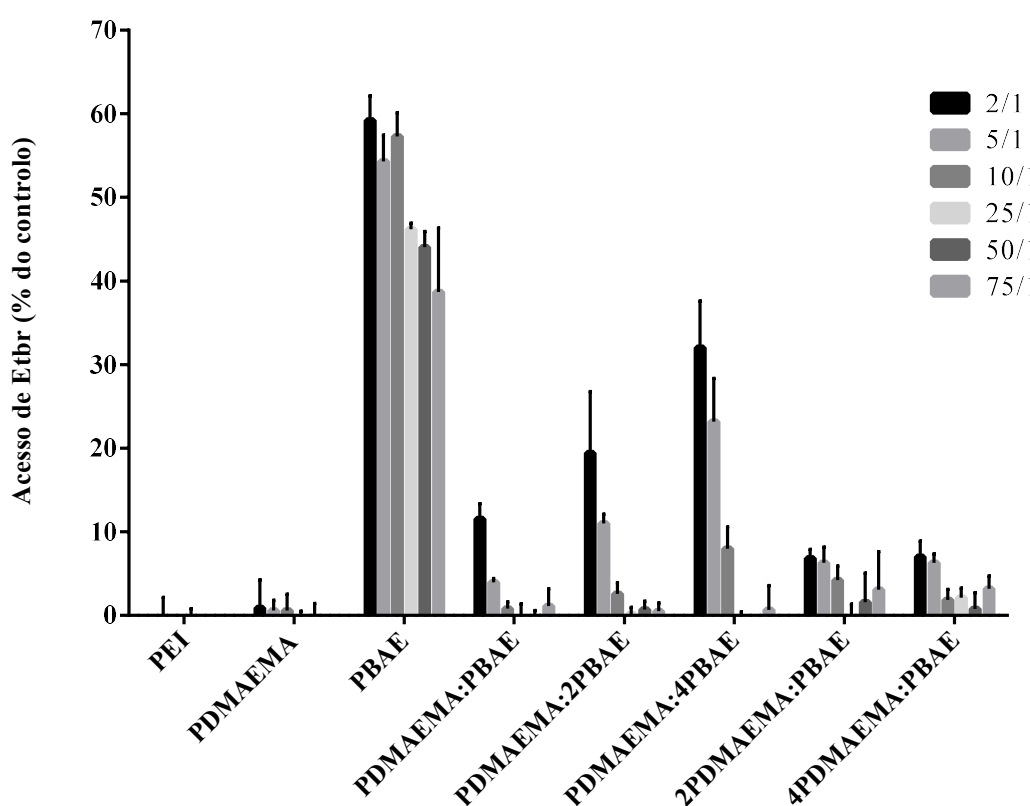


Figura 29- Acessibilidade do brometo de etídeo ao DNA dos diferentes políplexos preparados em vários rácios polímero/DNA N/P. Os políplexos preparados com os diversos polímeros e suas combinações e 1µg de DNA foram incubados com o Brometo de Etídeo, tal como é descrito nos Materiais e Métodos. A quantidade de DNA disponível para interagir com a sonda foi calculada subtraindo os valores da fluorescência residual aos obtidos para as amostras e expressos como percentagem do controlo. O controlo corresponde a DNA livre na mesma quantidade que o associado aos complexos (100% de acessibilidade do EtBr). Os dados são expressos como acesso do EtBr (% do controlo) (média ± desvio padrão, obtidos de triplicados). Os resultados são representativos de duas experiências independentes.

Assim como nos ensaios de atividade biológica, os dois homopolímeros testados comportam-se de forma bastante distinta. Enquanto que o homopolímero PDMAEMA garante a condensação e proteção do material genético, tal como o polímero bPEI, o homopolímero PBAE não têm essa capacidade, permitindo o acesso da sonda a mais de 50% do ADN, mesmo para o rácio mais elevado dos poliplexos. Esta incapacidade de condensação do PBAE pode estar relacionada com a rigidez da sua estrutura química e com o arranjo tridimensional dos resíduos catiónicos, com mais espaço entre os grupos amina e logo, menor densidade de carga positiva e menor capacidade de condensação do ADN. A reduzida capacidade de proteção destes poliplexos, observada para todos os rácios N/P, pode ser a causa do insucesso deste polímero como vetor de terapia génica, pois, possivelmente, este liberta o material genético demasiado cedo, promovendo a sua degradação antes de alcançar o núcleo.

Assim, tal como seria de esperar, a acessibilidade do EtBr ao DNA dos poliplexos preparados com as várias combinações poliméricas é condicionada pela proporção do PBAE. Nos rácios N/P inferiores, quanto maior a proporção de PBAE na combinação polimérica maior é a percentagem de acesso do EtBr ao ADN. Contudo, a melhor formulação desenvolvida, os poliplexos baseados na combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE preparados no rácio de 25/1, garantem, muito provavelmente, a proteção total do material genético, pois o acesso do EtBr ao ADN é nulo.

De modo a complementar os resultados obtidos no ensaio de intercalação de brometo de etídio realizou-se um ensaio de electroforese em gel de agarose, que permite inferir o grau de complexação do ADN nos poliplexos. Esta técnica baseia-se no princípio de que o ADN, carregado negativamente, migra para o eletrodo positivo. Por outro lado, o ADN complexado nos poliplexos não se moverá e a intensidade das bandas será menor.

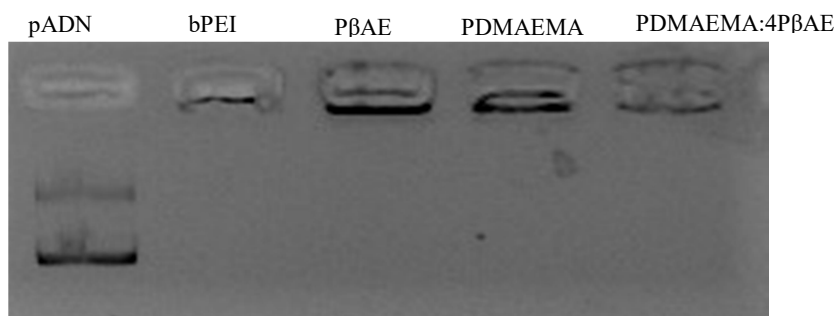


Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose para os diferentes políplexos. A combinação polimérica PDMAEMA:4PBAE foi complexada com 1 µg de pCMV-Luc no rácio N/P 25/1. Como controlo foram preparados políplexos com o PDMAEMA, o PBAE e a bPEI, nos rácios de 10/1, 50/1 e 25/1, respetivamente. Adicionalmente, utilizou-se também como controlo o ADN livre. A eletroforese decorreu tal como está descrito no capítulo dos “Materiais e métodos”.

Os resultados observados na Figura 30 são concordantes com os dados obtidos no ensaio de intercalação de EtBr. Os complexos poliméricos baseados na combinação PDMAEMA:4PBAE, que bloquearem totalmente o acesso do EtBr ao ADN (Figura 29), apresentam uma elevada capacidade de complexar/condensar o material genético, uma vez que não a migração das bandas e que a sua intensidade é muito inferior à intensidade das bandas controlo (ADN livre).

4. *Conclusão e Perspetivas Futuras*

4.1. Conclusão

A terapia génica é uma estratégia terapêutica bastante promissora que tem como objetivo prevenir, tratar ou eliminar as causas de uma patologia, através da transferência de material genético para uma população específica de células. Esta modalidade terapêutica tem sido aplicada em diversas patologias, desde doenças monogénicas a doenças poligénicas, tais como o cancro ou doenças neurodegenerativas. No entanto, o desenvolvimento de um sistema de transporte e entrega de material genético seguro e eficaz continua a ser um dos principais desafios para a sua implementação clínica.

Os vetores não-virais surgiram como uma alternativa aos vetores virais, destacando-se pela sua segurança e versatilidade. Todavia, esta classe de vetores carece ainda de algumas características que são cruciais para a sua afirmação definitiva como sistemas de transporte e entrega de material genético, nomeadamente, níveis de eficácia de transfecção semelhantes aos obtidos com vetores virais. A versatilidade, a variedade de métodos de síntese disponíveis e a facilidade de funcionalização química são características que, ao permitirem a optimização da relação estrutura/atividade, enaltecem os sistemas de base polimérica como vetores de terapia génica. Neste contexto, no presente trabalho avaliou-se o potencial de vários polímeros, de famílias químicas diversas, como sistemas de transporte e entrega de material genético.

A capacidade de transporte e entrega de material genético dos poliplexos baseados no poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PAMA) e no copolímero em bloco polietilenoglicol-poli(metacrilato de 2-aminoetil) (PEG-b-PAMA), foi avaliada nas células Cos-7, sendo possível retirar as seguintes conclusões:

Primeiramente, pode-se concluir que a atividade biológica destes poliplexos depende da sua composição polimérica, da razão de carga em que são preparados e das condições sob as quais é realizada a transfecção.

Na ausência de soro, apenas os polímeros de maior grau de polimerização, o copolímero PEG-b-PAMA₂₈₉₀₀ e o homopolímero PAMA₁₇₄₀₀, demonstraram ter a capacidade de formar poliplexos que promovem a internalização e entrega eficiente do plasmídeo no núcleo. Assim, para as formulações testadas, pode-se constatar que a atividade biológica é promovida pelos poliplexos baseados em polímeros de maior peso molecular. Sob esta condição, somente os poliplexos preparados nas razões de carga 5/1 e 10/1 garantiram uma expressão significativa do transgene.

Na presença de soro, os poliplexos preparados com copolímeros mediarão a entrega do material genético de um modo muito mais eficaz do que os poliplexos baseados nos homopolímeros correspondentes. Para além disso, constatou-se que a capacidade de transporte e entrega de material genético dos poliplexos baseados nos copolímeros PEG-*b*-PAMA é incrementada pela presença de soro, contrariamente ao verificado para os poliplexos preparados com os homopolímeros. Para a melhor formulação, os poliplexos preparados com o copolímero PEG-*b*-PAMA₂₈₉₀₀ no rácio 25/1, demonstrou-se que na presença de soro a sua capacidade de transfeção é, aproximadamente, 130 vezes superior à dos poliplexos baseados no polímero bPEI, aceite como o *gold standard*. Deste modo, pode-se concluir que, para potenciais aplicações *in vivo*, a copolimerização com o polietilenoglicol é absolutamente crucial para o desempenho destes nanossistemas.

Relativamente à citotoxicidade destes nanossistemas, constatou-se que o aumento da razão de carga dos poliplexos e do peso molecular dos polímeros induz níveis superiores de toxicidade. Embora a copolimerização com o polietilenoglicol promova a biocompatibilidade, a melhor formulação, os poliplexos preparados com o copolímero PEG-*b*-PAMA₂₈₉₀₀ no rácio 25/1, apresenta uma citotoxicidade relativamente elevada, induzindo a morte de mais de 30% das células, mesmo na presença de soro.

Os resultados obtidos permitem também concluir que os poliplexos formados com os diversos polímeros testados garantem a proteção do ADN, sendo a complexação incrementada pela copolimerização com o polietilenoglicol.

Embora o copolímero PEG-*b*-PAMA₂₈₉₀₀ promova a condensação do material genético em poliplexos capazes de mediar a entrega do material genético de forma bastante mais eficaz do que os preparados com o polímero aceite como padrão (bPEI), apresenta uma grande limitação: a elevada citotoxicidade induzida pelos nanossistemas resultantes.

Sendo a citotoxicidade uma das principais limitações à aplicação de polímeros catiónicos como vetores de entrega de material genético, optou-se por avaliar o potencial da combinação dos polímeros PDMAEMA e P β AE, uma vez que estão descritos como sendo polímeros com capacidade de transporte e entrega de material genético e, no caso do último, com elevada biocompatibilidade. As várias formulações de poliplexos desenvolvidas foram submetidas a diferentes estudos, tendo sido

avaliados diversos parâmetros, nomeadamente a sua atividade biológica, a citotoxicidade, os mecanismos de internalização celular, o tamanho das partículas, a carga superficial e a condensação/proteção do ADN. A avaliação deste parâmetros, e, consequentemente, da capacidade de transporte e entrega de material genético dos poliplexos baseados nos polímeros P β AE e PDMAEMA, permitiu retirar as seguintes conclusões:

Embora todas as combinações poliméricas testadas tenham a capacidade de mediar a transferência de genes, a atividade biológica dos poliplexos é dependente da combinação e da razão de carga N/P dos poliplexos, sendo a eficácia de transfecção superior para os poliplexos preparados nos rácios 10/1 e 25/1, para todas as combinações.

A viabilidade celular, determinada após incubação com os poliplexos, é também dependente da quantidade relativa de polímero presente no nanossistema e da proporção de cada um dos homopolímeros, sendo que as razões de carga N/P maiores e os poliplexos preparados com combinações com maior proporção de PDMAEMA apresentam níveis de citotoxicidade superiores.

Constatou-se ainda que os nanossistemas preparados com ambas as combinações, PDMAEMA:2P β AE e PDMAEMA:4P β AE, apresentam uma capacidade de transfecção superior à dos poliplexos baseados nas combinações poliméricas com maior proporção de PDMAEMA. No entanto, os poliplexos preparados com a combinação PDMAEMA:4P β AE na razão de carga N/P 25/1 foram considerados, pela sua relação atividade biológica/citotoxicidade, a melhor formulação. Esta formulação apresenta uma elevada capacidade de transfecção, mesmo na presença de soro, sendo, aproximadamente, 700, 60, 7, 20 e 45 vezes superior à obtida com os poliplexos baseados na bPEI, nas células Cos-7, A549, MDA-MB-231, MIA-PaCa-2 e astrócitos humanos normais, respetivamente.

A eficácia e robustez da capacidade de transporte e entrega de material genético dos poliplexos preparados com a combinação PDMAEMA:4P β AE no rácio 25/1 foi também comprovada no ensaio de citometria de fluxo, no qual se verificou que estes poliplexos promovem a transfecção de uma percentagem de células 3 vezes superior à obtida com os poliplexos baseados no polímero bPEI. Pelos resultados obtidos, pode-se também concluir que estes novos nanossistemas são maioritariamente internalizados por endocitose dependente de clatrina.

Relativamente às características físico-químicas, os poliplexos preparados com a combinação PDMAEMA:4P β AE apresentam propriedades adequadas à sua aplicação *in vivo*, nomeadamente uma boa condensação do ADN, que garante a proteção do material genético, e um diâmetro médio reduzido de, aproximadamente, 130 nm. É ainda notório que, embora a carga superficial destes poliplexos seja positiva, estes sistemas tenham a capacidade de mediar a entrega do material genético de forma eficiente na presença de soro com uma citotoxicidade muito reduzida.

A combinação dos polímeros PDMAEMA e P β AE é uma estratégia muito promissora, com um enorme potencial para possíveis aplicações terapêuticas, que para além de promover a formação de poliplexos com uma atividade biológica muito superior à dos poliplexos baseados no polímero *gold standard*, se destaca pela reduzida toxicidade e pela simplicidade de preparação.

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho permitem concluir que a capacidade de transporte e entrega de material genético dos vetores de base polimérica é condicionada por um conjunto de fatores: a composição polimérica, a estrutura do polímero, a conformação adquirida no processo de *self-assembly* dos poliplexos, a razão de carga N/P dos poliplexos, e as suas características físico-químicas. Estes factores condicionam amplamente a capacidade dos nanossistemas para ultrapassar as várias barreiras associadas ao processo de transporte e entrega de material genético.

4.2. Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos com os políplexos preparados com a combinação PDMAEMA:4P β AE demonstraram que esta formulação poderá ser um vetor bastante eficaz para mediar estratégias terapêuticas. Contudo, tendo em conta que os resultados observados *in vitro* e o desempenho dos nanossistemas registado *in vivo* nem sempre se correlacionam de forma linear, deveriam ser, ainda, realizados os seguintes estudos para clarificar o potencial desta formulação:

- De modo a compreender o potencial comportamento da formulação *in vivo* deverão ser avaliadas as suas características físico-químicas na presença de soro, nomeadamente, o tamanho e carga superficial, e analisadas as interações estabelecidas com os componentes do soro.
- Será importante determinar a estabilidade dos políplexos a longo prazo, analisando a sua atividade biológica e as suas propriedades físico-químicas, a fim de avaliar o potencial dos nanossistemas para serem armazenados para aplicações *in vivo*.
- Será também interessante melhorar as características da formulação, por exemplo, promover a especificidade para um determinado tecido, através da conjugação de um ligando à superfície do políplexo, e incrementar a biodisponibilidade e biocompatibilidade do nanossistema, através da incorporação de um polímero hidrofílico, como o polietilenoglicol.
- O desempenho da formulação deverá também ser analisada *in vivo*, num modelo animal de cancro. Numa primeira fase esta avaliação estará focada na atividade biológica promovida pela formulação, após ser administrada por via intravenosa ou injeção intratumoral, e, posteriormente, estará centrada na análise da sua capacidade para mediar a aplicação de estratégias antitumorais de terapia génica.

5. *Bibliografia*

5. Bibliografia

1. Mulligan, R. C. The basic science of gene therapy. *Science* **260**, 926–932 (1993).
2. Mountain, A. Gene therapy: The first decade. *Trends Biotechnol.* **18**, 119–128 (2000).
3. Bank, A. Arthur Bank. *BioEssays* **18**, 999–1007 (1996).
4. Nayerossadat, N., Ali, P. & Maedeh, T. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* **1**, 27 (2012).
5. Number of Gene Therapy Clinical Trials Approves Worldwide 1989-2016. <http://www.wiley.com//legacy/wileychi/genmed/clinical/> (accessed 22/06/2016).
6. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **4**, 346–358 (2003).
7. Blaese, R. M. *et al.* T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475–480 (1995).
8. Henricson, M. & Nyquist, E. Industrial Strength C++. 224 (1997).
9. Raper, S. E. *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**, 148–158 (2003).
10. Hacein-Bey Abina, S. *et al.* A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255–256 (2003).
11. Al-Dosari, M. S. & Gao, X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *AAPS J.* **11**, 671–681 (2009).
12. Foldvari, M. *et al.* Non-viral gene therapy: Gains and challenges of non-invasive administration methods. *J. Control. Release* (2015). doi:10.1016/j.jconrel.2015.12.012

13. Li, Y., Li, B., Li, C.-J. & Li, L.-J. Key points of basic theories and clinical practice in rAd-p53 (GendicineTM) gene therapy for solid malignant tumors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15**, 437–454 (2015).
14. Gaudet, D. *et al.* Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther.* **20**, 361–9 (2013).
15. Johnson, D., Puzanov, I. & Kelley, M. Advanced Melanoma. *Immunotherapy* **7**, 611–619 (2015).
16. Kim, Y., Zhang, C., Cho, C., Cho, M. & Jiang, H. in *Novel gene therapy approaches* 376–396 (2013).
17. Scholz, C. & Wagner, E. Therapeutic plasmid DNA versus siRNA delivery: Common and different tasks for synthetic carriers. *J. Control. Release* **161**, 554–565 (2012).
18. Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* **11 Suppl 1**, S10–S17 (2004).
19. Sakurai, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Nakagawa, S. & Mizuguchi, H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int. J. Pharm.* **354**, 9–15 (2008).
20. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
21. Chen, J., Guo, Z., Tian, H. & Chen, X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **3**, 16023 (2016).
22. Group, N. P. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious. **7**, 33–40 (2001).
23. Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L. & Pistello, M. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* **36**, 1–22 (2013).

24. Danthinne, X. & Imperiale, M. J. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* **7**, 1707–1714 (2000).
25. Alonso-Padilla, J. *et al.* Development of novel adenoviral vectors to overcome challenges observed with HAdV-5 based constructs. *Mol. Ther.* **24**, 6–16 (2015).
26. Gaj, T., Epstein, B. E. & Schaffer, D. V. Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications. *Mol. Ther.* **24**, 1–7 (2015).
27. Persons, D. A. Lentiviral vector gene therapy: effective and safe? *Mol. Ther.* **18**, 861–2 (2010).
28. Blessing, D. & Déglon, N. Adeno-associated virus and lentivirus vectors: a refined toolkit for the central nervous system. *Curr. Opin. Virol.* **21**, 61–66 (2016).
29. Epstein, a L. Progress and prospects: biological properties and technological advances of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors. *Gene Ther.* **16**, 709–715 (2009).
30. Warner, S. G. *et al.* Oncolytic herpes simplex virus kills stem-like tumor-initiating colon cancer cells. *Mol. Ther. oncolytics* **3**, 16013 (2016).
31. Waehler, R., Russell, S. J. & Curiel, D. T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 573–587 (2007).
32. Kotterman, M. A. & Schaffer, D. V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 445–51 (2014).
33. Mehier-Humbert, S. & Guy, R. H. Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 733–753 (2005).
34. Lambricht, L. *et al.* Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5247**, 17425247.2016.1121990 (2015).

35. Bodles-Brakhop, A. M., Heller, R. & Draghia-Akli, R. Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments. *Mol. Ther.* **17**, 585–92 (2009).
36. Liu, Y., Yan, J., Santangelo, P. J. & Prausnitz, M. R. DNA uptake, intracellular trafficking and gene transfection after ultrasound exposure. *J. Control. Release* (2016). doi:10.1016/j.jconrel.2016.05.013
37. Tomizawa, M. *et al.* Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J. Methodol.* **3**, 39–44 (2013).
38. Herweijer, H. & Wolff, J. A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther.* **10**, 453–8 (2003).
39. Pelgrift, R. Y. & Friedman, A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1803–1815 (2013).
40. Rodzinski, A. *et al.* Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles. *Nat. Publ. Gr.* 1–14 (2016). doi:10.1038/srep20867
41. Hariharan, S. *et al.* Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: A potential oral delivery system for hormone therapy. *Pharm. Res.* **23**, 184–195 (2006).
42. Bernocchi, B. *et al.* Mechanisms allowing protein delivery in nasal mucosa using NPL nanoparticles. *J. Control. Release* **232**, 42–50 (2016).
43. Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K. & Tokatlian, T. Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chem. Rev.* **115**, 11109–11146 (2015).
44. Cordeiro, R. A. *et al.* Novel cationic triblock copolymer of poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-block-poly(??-amino ester)-

- block-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]: A promising non-viral gene delivery system. *Macromol. Biosci.* **15**, 215–228 (2015).
45. Choi, Y. S., Lee, M. Y., David, A. E. & Park, Y. S. Nanoparticles for gene delivery: therapeutic and toxic effects. *Mol. Cell. Toxicol.* **10**, 1–8 (2014).
 46. Banik, B. L., Fattahi, P. & Brown, J. L. Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 271–299 (2016).
 47. Pensado, A., Seijo, B. & Sanchez, A. Current strategies for DNA therapy based on lipid nanocarriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 1721–31 (2014).
 48. Tamanoi, F. & Zink, J. I. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. **2**, 889–896 (2008).
 49. Hadinoto, K., Sundaresan, A. & Cheow, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 427–443 (2013).
 50. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
 51. Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 581–93 (2005).
 52. Li, L., Wei, Y. & Gong, C. Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* **11**, 739–770 (2015).
 53. Mandal, B. *et al.* Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **9**, 474–491 (2013).
 54. 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* **24**, 1121–31 (2003).

55. Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S. & Yan, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J. Control. Release* **114**, 100–109 (2006).
56. Moghimi, S. M. *et al.* A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/therapy. *Mol. Ther.* **11**, 990–995 (2005).
57. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
58. Aied, A., Greiser, U., Pandit, A. & Wang, W. Polymer gene delivery: Overcoming the obstacles. *Drug Discov. Today* **18**, 1090–1098 (2013).
59. Choi, H. S. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165–70 (2007).
60. Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A. & Seymour, L. W. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* **6**, 643–650 (1999).
61. Ogris, M., Brunner, S., Schüller, S., Kircheis, R. & Wagner, E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.* **6**, 595–605 (1999).
62. Mishra, S., Webster, P. & Davis, M. E. PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 97–111 (2004).
63. Zauner, W., Ogris, M. & Wagner, E. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **30**, 97–113 (1998).
64. Han, S. Development of Biomaterials for Gene Therapy. *Mol. Ther.*

- 2, 302–317 (2000).
65. Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7297–301 (1995).
 66. Kircheis, R., Wightman, L. & Wagner, E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 341–358 (2001).
 67. Guang Liu, W. & De Yao, K. Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection. *J. Control. Release* **83**, 1–11 (2002).
 68. Strand, S. P. *et al.* Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials* **31**, 975–987 (2010).
 69. Lebre, F., Borchard, G., Faneca, H., Pedroso De Lima, M. C. & Borges, O. Intranasal Administration of Novel Chitosan Nanoparticle/DNA Complexes Induces Antibody Response to Hepatitis B Surface Antigen in Mice. *Mol. Pharm.* **13**, 472–482 (2016).
 70. Agarwal, S., Zhang, Y., Maji, S. & Greiner, A. PDMAEMA based gene delivery materials. *Mater. Today* **15**, 388–393 (2012).
 71. Samsonova, O., Pfeiffer, C., Hellmund, M., Merkel, O. M. & Kissel, T. Low molecular weight pDMAEMA-block-pHEMA block-copolymers synthesized via RAFT-polymerization: Potential non-viral gene delivery agents. *Polymers (Basel)*. **3**, 693–718 (2011).
 72. Lynn, D. M. & Langer, R. Degradable Poly (beta-amino esters): Synthesis , Characterization , and Self-Assembly with Plasmid DNA. *J Am Chem Soc* **122**, 10761–10768 (2000).
 73. Segovia, N., Dosta, P., Cascante, A., Ramos, V. & Borrós, S. Oligopeptide-terminated poly(β -amino ester)s for highly efficient

- gene delivery and intracellular localization. *Acta Biomater.* **10**, 2147–2158 (2014).
74. Belting, M. & Wittrup, A. Macromolecular Drug Delivery. *Drug Deliv.* **480**, 1–10 (2009).
 75. Lynn, D. M., Anderson, D. G., Putnam, D. & Langer, R. Accelerated Discovery of Synthetic Transfection Vectors : Parallel Synthesis and Screening of a Degradable Polymer Library. 8155–8156 (2001).
 76. Zugates, G. T. *et al.* Rapid optimization of gene delivery by parallel end-modification of poly(beta-amino ester)s. *Mol. Ther.* **15**, 1306–1312 (2007).
 77. Naidoo, A., Naidoo, K., Yende-zuma, N. & Gengiah, T. N. NIH Public Access. **19**, 161–169 (2015).
 78. Anderson, D. G., Akinc, A., Hossain, N. & Langer, R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly(??-amino esters). *Mol. Ther.* **11**, 426–434 (2005).
 79. Gao, Y. *et al.* Highly Branched Poly (β -amino esters) for Non-Viral Gene Delivery : High Transfection Efficiency and Low Toxicity Achieved by Increasing Molecular Weight. (2016). doi:10.1021/acs.biomac.6b01120
 80. Farinha, D., Pedroso de Lima, M. C. & Faneca, H. Specific and efficient gene delivery mediated by an asialofetuin-associated nanosystem. *Int. J. Pharm.* **473**, 366–374 (2014).
 81. He, Q., Johnston, J., Zeitlinger, J., City, K. & City, K. Targeted polymeric nanoparticles for cancer gene therapy Jayoung. *J Drug Target.* **33**, 395–401 (2015).
 82. Medina-Kauwe, L. K., Xie, J. & Hamm-Alvarez, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* **12**, 1734–51 (2005).
 83. Douglas, K. L., Piccirillo, C. A. & Tabrizian, M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine

- transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 676–687 (2008).
84. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–69 (2004).
 85. Wattiaux, R., Laurent, N., Wattiaux-De Coninck, S. & Jadot, M. Endosomes, lysosomes: Their implication in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **41**, 201–208 (2000).
 86. Khalil, I. a, Kogure, K., Akita, H. & Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **58**, 32–45 (2006).
 87. Mislick, K. a & Baldeschwieler, J. D. Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 12349–12354 (1996).
 88. McMahon, H. T. & Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517–533 (2011).
 89. Yang, S. & May, S. Release of cationic polymer-DNA complexes from the endosome: A theoretical investigation of the proton sponge hypothesis. *J. Chem. Phys.* **129**, (2008).
 90. Suh, J., Wirtz, D. & Hanes, J. Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 3878–3882 (2003).
 91. Erbacher, P., Roche, A. C., 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 - Biomembr.* **1324**, 27–36 (1997).
 92. Schaffer, D. V., Fidelman, N. A., Dan, N. & Lauffenburger, D. A.

- Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 598–606 (2000).
93. Dinçer, S., Türk, M. & Pişkin, E. Intelligent polymers as nonviral vectors. *Gene Ther.* **12 Suppl 1**, S139–S145 (2005).
 94. Shim, M. S. & Kwon, Y. J. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **64**, 1046–1059 (2012).
 95. Liu, J. *et al.* Reduction biodegradable brushed PDMAEMA derivatives synthesized by atom transfer radical polymerization and click chemistry for gene delivery. *Acta Biomater.* **9**, 7758–7766 (2013).
 96. Brunner, S. *et al.* Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther.* **7**, 401–407 (2000).
 97. Hu, Q. *et al.* Intracellular pathways and nuclear localization signal peptide-mediated gene transfection by cationic polymeric nanovectors. *Biomaterials* **33**, 1135–1145 (2012).
 98. Hamidi, M., Shahbazi, M. A. & Rostamizadeh, K. Copolymers: Efficient Carriers for Intelligent Nanoparticulate Drug Targeting and Gene Therapy. *Macromol. Biosci.* **12**, 144–164 (2012).
 99. C. Cheng, A.J. Convertine, P.S. Stayton, and J. D. B. Multifunctional triblock copolymers for intracellular messenger RNA delivery. *Biomaterials* **28**, 6868–6876 (2012).
 100. Faneca, H., Faustino, A. & Pedroso de Lima, M. C. Synergistic antitumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by albumin-associated cationic liposomes. *J. Control. Release* **126**, 175–184 (2008).
 101. Vercauteren, D. *et al.* The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol. Ther.* **18**, 561–569 (2010).

102. Wiethoff, C. M. & Middaugh, C. R. *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. **65**,
103. Sitterberg, J., Özcetin, A., Ehrhardt, C. & Bakowsky, U. Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **74**, 2–13 (2010).
104. Matyjaszewski, K. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules* **45**, 4015–4039 (2012).
105. Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T. & Göpferich, A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**, 247–266 (2005).
106. Kunath, K. *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* **89**, 113–125 (2003).
107. Layman, J. M., Ramirez, S. M., Green, M. D. & Long, T. E. Influence of Polycation Molecular Weight on Poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate) -Mediated DNA Delivery In Vitro. *Biomacromolecules* **10**, 1244–1252 (2009).
108. Akinc, A., Anderson, D. G., Lynn, D. M. & Langer, R. Synthesis of poly(beta-amino ester)s optimized for highly effective gene delivery. *Bioconjug. Chem.* **14**, 979–88 (2003).
109. Jones, N. A. *et al.* Polymer chemical structure is a key determinant of physicochemical and colloidal properties of polymer-DNA complexes for gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1517**, 1–18 (2000).
110. Yang, J. P. & Huang, L. Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to

- DNA. *Gene Ther.* **4**, 950–960 (1997).
111. Faneca, H., Simões, S. & Pedroso de Lima, M. C. Association of albumin or protamine to lipoplexes: Enhancement of transfection and resistance to serum. *J. Gene Med.* **6**, 681–692 (2004).
 112. Malek, A., Czubayko, F. & Aigner, A. PEG grafting of polyethylenimine (PEI) exerts different effects on DNA transfection and siRNA-induced gene targeting efficacy. *J. Drug Target.* **16**, 124–39 (2008).
 113. Kim, Jayoung; Kang, Yechan; Tzeng, Stephany Y.; Green, J. J. Synthesis and application of poly(ethylene glycol)-co-poly(β -amino ester) copolymers for small cell lung cancer gene therapy. *Acta Biomater.* (2016). doi:10.1016/j.actbio.2016.05.040
 114. Deshpande, M. C. *et al.* The effect of poly(ethylene glycol) molecular architecture on cellular interaction and uptake of DNA complexes. *J. Control. Release* **97**, 143–156 (2004).
 115. Lo, C. W. *et al.* Synergistic Effect of PEI and PDMAEMA on Transgene Expression in Vitro. *Langmuir* **31**, 6130–6136 (2015).
 116. Cai, J. *et al.* Quantitative study of effects of free cationic chains on gene transfection in different intracellular stages. *J. Control. Release* **238**, 71–79 (2016).
 117. Hoffman, A. S. The early days of PEG and PEGylation (1970s–1990s). *Acta Biomater.* (2016). doi:10.1016/j.actbio.2016.05.029
 118. Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J. & Ensign, L. M. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99**, 28–51 (2016).
 119. Namgung, R., Kim, J., Singha, K., Kim, C. H. & Kim, W. J. Synergistic effect of low cytotoxic linear polyethylenimine and multiarm polyethylene glycol: Study of physicochemical properties and in vitro gene transfection. *Mol. Pharm.* **6**, 1826–1835 (2009).

120. Cai, J. *et al.* Effect of chain length on cytotoxicity and endocytosis of cationic polymers. *Macromolecules* **44**, 2050–2057 (2011).
121. Uchida, S. *et al.* PEGylated Polyplex With Optimized PEG Shielding Enhances Gene Introduction in Lungs by Minimizing Inflammatory Responses. *Mol. Ther.* **20**, 1196–203 (2012).
122. Duarte, S., Faneca, H. & Lima, M. C. P. De. Folate-associated lipoplexes mediate efficient gene delivery and potent antitumoral activity in vitro and in vivo. *Int. J. Pharm.* **423**, 365–377 (2012).
123. Crisostomo, J., Coelho, J. F. J. & Seica, R. *Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment. Drug Delivery Systems: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalised Treatment Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine* **4**, (2013).
124. Magalhães, M., Farinha, D., de Lima, M. C. P. & Faneca, H. Increased gene delivery efficiency and specificity of a lipid-based nanosystem incorporating a glycolipid. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4979–4989 (2014).
125. Faneca, H., Simões, S. & Pedroso de Lima, M. C. Association of albumin or protamine to lipoplexes: Enhancement of transfection and resistance to serum. *J. Gene Med.* **6**, 681–692 (2004).
126. Verbaan, F. *et al.* Intravenous fate of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **20**, 419–427 (2003).
127. Synatschke, C. V., Schallon, A., Jérôme, V., Freitag, R. & Müller, A. H. E. Influence of polymer architecture and molecular weight of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) polycations on transfection efficiency and cell viability in gene delivery. *Biomacromolecules* **12**, 4247–4255 (2011).
128. Cordeiro, R. A. *et al.* High transfection efficiency promoted by tailor-

- made cationic tri-block copolymer-based nanoparticles. *Acta Biomater.* (2016). doi:10.1016/j.actbio.2016.10.015
129. Yue, Y. & Wu, C. Progress and perspectives in developing polymeric vectors for in vitro gene delivery. *Biomater. Sci.* 152–170 (2013). doi:10.1039/c2bm00030j
130. Rinkenauer, A. C., Schubert, S., Traeger, A. & Schubert, U. S. The influence of polymer architecture on in vitro pDNA transfection. *J. Mater. Chem. B* **3**, 7477–7493 (2015).
131. Smittenaar, C. R., Petersen, K. A., Stewart, K. & Moitt, N. Cancer incidence and mortality projections in the UK until 2035. *Br. J. Cancer* **115**, 1147–1155 (2016).
132. El-Sayed, A. & Harashima, H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* **21**, 1118–30 (2013).
133. Hu, W. *et al.* Redox and pH dual responsive poly(amidoamine) dendrimer-poly(ethylene glycol) conjugates for intracellular delivery of doxorubicin. *Acta Biomater.* **36**, 241–253 (2016).
134. Hatakeyama, H., Akita, H. & Harashima, H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 152–160 (2011).
135. Bishop, C. J., Kozielski, K. L. & Green, J. J. Exploring the role of polymer structure on intracellular nucleic acid delivery via polymeric nanoparticles. *J. Control. Release* **219**, 488–499 (2015).