



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Flávia Soraia Cunha Rodrigues

ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS COMBINADAS PARA CARCINOMA
HEPATOCELULAR MEDIADAS POR NANOSSISTEMAS

Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica,
orientada pelo Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca
e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Flávia Soraia Cunha Rodrigues

**ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS COMBINADAS PARA
CARCINOMA HEPATOCELULAR MEDIADAS POR
NANOSSISTEMAS**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Bioquímica orientada pelo Doutor
Henrique Manuel dos Santos Faneca e apresentada ao Departamento de
Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra.**

Agosto de 2019

Este trabalho foi financiado pelos projetos: IF/01007/2015; POCI-01-0145-FEDER-30916; e UID/NEU/04539/2019 [Fundos nacionais – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) e Fundos FEDER, através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização COMPETE 2020].

Agradecimentos

Esta dissertação de mestrado é fruto de um ano de trabalho, que não seria possível sem a ajuda e apoio de muitas pessoas. Como seria de esperar, nem sempre a ciência nos facilita a vida, colocando-nos obstáculos à frente, que por vezes não são fáceis de ultrapassar. As vezes são apenas percalços que nos obriga a lutar e a esforçar mais e, a procurar respostas às quais nem sempre encontramos. Outras vezes, por um simples resultado menos motivador, nos deixa frustrados. E são as pessoas que nos rodeiam e acompanham o processo, que pelas suas palavras e apoio, nos mostram que somos capazes e que acreditam nas nossas capacidades. Foi sem dúvida um trabalho motivador, por vários motivos, mas principalmente pelo nível de conhecimento que sabia que me ia trazer no tema abordado, sendo o mesmo do meu inteiro interesse.

Um agradecimento muito especial ao Doutor Henrique Manuel dos Santos Faneca, meu orientador de tese. Primeiramente por me ter acolhido e me ter dado a oportunidade de realizar a minha dissertação no grupo, sendo a área em que se incidia do meu interesse faz largos anos. Em segundo, por toda a disponibilidade e apoio prestado ao longo deste trabalho, que foi deveras importante, e sem a qual a conclusão deste trabalho não teria sido possível. Sendo eu, uma pessoa muito entusiasta pela investigação, e uma pessoa muito otimista, por vezes é necessário ter alguém que nos diga que as coisas podem não correr bem à primeira. A verdade é que o Doutor Henrique tem a capacidade de nos fazer “descer a terra” e ao mesmo tempo de nos motivar a fazer mais e melhor. Para além disso, ao longo deste ano transmitiu-me imensos conhecimentos e ajudou-me a crescer como investigadora. Por estes motivos e muitos outros, estou-lhe inteiramente grata. E nada será esquecido.

No geral quero agradecer a todo o grupo de Nanossistemas e Estratégias Antitumorais Direcionadas, por todo o apoio prestado ao longo deste ano, e que saibam que desde o mais pequeno pormenor ou a uma ajuda maior, nada seria possível sem a combinação de todas essas “pequenas” coisas, ou pelo menos teria sido mais difícil. Vocês ajudaram a tornar dias difíceis, em dias importantes, ajudaram a tornam cada dia melhor. Ajudaram a tomar algumas decisões mais difíceis, e a tornar tudo isso mais fácil. O nível de conhecimento transmitido foi notório e a minha evolução deve-se a isso mesmo.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas do centro (CNC – Centro de neurociência e biologia celular) que se cruzaram comigo, pessoas dos mais diversos grupos, que foram sempre prestáveis e que demonstraram uma tremenda simpatia para comigo. É fantástico trabalhar num local onde as pessoas se conhecem, e têm a capacidade de quebrar parcialmente aquela barreira trabalho/vida pessoal. Seria impossível enumerar todos. Obrigada!

Ao CNC gostaria de agradecer pelo acolhimento, e pelo seu interesse em alargar o meu conhecimento. Tanto por promover seções em que nós transmitimos ciência à comunidade, como convidando palestrantes para nos transmitir informação e alargar horizontes. Não esquecendo, os meios que disponibilizou para o meu trabalho, desde equipamentos a trabalho realizado por parte das técnicas, trabalho esse que por vezes é desvalorizado por muitos, mas que é indispensável para a realização de uma dissertação de mestrado deste tipo.

A toda a minha família, desde meus primos a meus pais, passando por meus tios e avôs, que apoiaram minhas decisões, que me facilitaram a vida, e me deram a possibilidade de me dedicar aos meus objetivos. Sem dúvida que sem eles, nada disto teria sido possível.

Por último, mas não menos importantes, aos meus amigos. Que apesar de nem sempre presentes fisicamente, sempre estiveram lá para o que precisava e me apoiaram incondicionalmente. Palavras como “Tu és capaz”, “Explica lá melhor o que tu fazes, que parece interessante e eu ainda não percebi.”, “Aconteça o que acontecer, nunca desistas.”. Às vezes é difícil explicar e é necessário recorrer a analogias, mas o interesse genuíno em quererem perceber, tornou tudo mais fácil. Cada conversa de café, cada chamada, todos aqueles quilómetros realizados só para apoiar ou animar, é para guardar! Um pedido de desculpas enorme, pelos meus “hoje estou cansada”, ou, “hoje preciso de ver umas coisas para a tese”. E um obrigado maior ainda, pelo facto de continuarem lá na mesma!

Um obrigado no geral a todas as pessoas que passaram pelo meu caminho ao longo deste ano, e que de uma forma ou de outra, ajudaram a tornar este sonho possível.

Todo o meu empenho e trabalho, dedico a todas as pessoas que já tiveram e/ou têm de batalhar contra esta doença. Dedico em especial a familiares que sofreram com cancro, aos que perderam a batalha, aos que ganharam e aos que ainda vão ganhar. Infelizmente, estas pessoas foram uma fonte de inspiração. Porque há uma diferença muito grande entre conhecer a doença ou conhecer de perto pessoas com a mesma.

Lista de figuras

Figura 1 – Gráficos representativos da incidência e mortalidade dos diferentes tipos de cancro..	1
Figura 2 – Esquema representativo do fígado e dos lóbulos hepáticos, e organização dos hepatócitos.....	4
Figura 3 – Esquema representativo do recetor das asialoglicoproteínas.....	8
Figura 4 – Esquema representativo do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e interação com o ligando EGF	9
Figura 5 – Esquema representativo do recetor do fator de crescimento de hepatócitos (c-MET) e interação com o ligando HGF.....	10
Figura 6 – Recetores e vias inibidas pelo sorafenib	12
Figura 7 – Representação de uma nanopartícula de base inorgânica modificada	14
Figura 8 – Polimerização da policaprolactona (PCL) a partir da caprolactona	16
Figura 9 – Esquema representativo de lipossomas sem (A) e com (B) ligando para conferir especificidade.....	18
Figura 10 – Estrutura química do fármaco em estudo, Sorafenib	25
Figura 11 – Equipamento utilizado na análise de DLS e potencial zeta	27
Figura 12 – Espectrofotómetro UV/VIS usado para leitura das amostras.....	28
Figura 13 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 1.1 e PCL 1.2 (Protocolo 1)	37
Figura 14 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 1.2 e PCL 1.3 (Protocolo 1)	38
Figura 15 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 1.3, PCL 1.4, PCL 1.5, PCL 1.6, PCL 1.7 e PCL 1.8 (Protocolo 1).....	39
Figura 16 – Tamanho e potencial zeta da formulação PCL 1.7 antes e após a centrifugação adicional (Protocolo 1).....	40
Figura 17 – Diferença entre as curvas de distribuição de tamanho das preparações PCL 1.3 e PCL 1.7 (Protocolo 1).....	42
Figura 18 – Tamanho e potencial zeta da formulação PCL 2.1, PCL 2.2 e PCL 2.3 (Protocolo 2)...	44
Figura 19 – Tamanho e potencial zeta da formulação PCL 2.3 e PCL 2.4 (Protocolo 2).....	45
Figura 20 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 2.4, PCL 2.5 e PCL 2.6 (Protocolo 2)	46
Figura 21 – Curva padrão do coumarin-6 determinada por fluorescência.....	48
Figura 22 – Eficiência de encapsulação da sonda fluorescente (coumarin-6)	48
Figura 23 – Eficiência de encapsulação e capacidade de carga de sorafenib	50
Figura 24 – Tamanho e potencial zeta das nanopartículas ao longo do tempo	52
Figura 25 – Índice de polidispersão (PDI) das formulações ao longo do tempo	52
Figura 26 – Tamanho e potencial zeta das nanopartículas ao longo do tempo	53
Figura 27 – Índice de polidispersão (PDI) das formulações ao longo do tempo	53
Figura 28 – Tamanho e potencial zeta de partículas liofilizadas.....	54
Figura 29 – Curva padrão do sorafenib obtida por absorvância.....	55
Figura 30 – Percentagem de fármaco que fica retido nas partículas ao longo do tempo	55
Figura 31 – Acesso do brometo de etídio ao material genético dos complexos	57
Figura 32 – Ensaio de eletroforese em gel de agarose dos complexos incubados com DNase I ativa e inativa.....	58
Figura 33 – Tamanho e potencial zeta dos complexos preparados nas diferentes razões de carga (+/-)	60

Lista de tabelas

Tabela 1 – Proteínas com expressão alterada no carcinoma hepatocelular e suas funções.....	5
Tabela 2 – miARNs com expressão alterada nas células do carcinoma hepatocelular, suas funções e alvos moleculares.....	6
Tabela 3 – Resumo das condições das diferentes formulações (Protocolo 1).....	36
Tabela 4 – Resumo dos valores de Pdl de todas as formulações (Protocolo 1).....	41
Tabela 5 – Resumo das condições das diferentes formulações (Protocolo 2).....	43
Tabela 6 – Resumo dos valores de Pdl de todas as formulações (Protocolo 2).....	47
Tabela 7 – Resumo das condições de armazenamento das diferentes formulações usadas para os ensaios de estabilidade ao longo do tempo	51

Índice

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
LISTA DE SIGLAS	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Carcinoma hepatocelular	1
1.1.1. Fígado e hepatócitos	3
1.1.2. Características genéticas do carcinoma hepatocelular	4
1.1.2.1. Recetores específicos dos hepatócitos e seus ligandos	7
1.1.2.1.1. Recetor das asialoglicoproteínas (ASGP-R)	7
1.1.2.1.2. Recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	8
1.1.2.2. Proteínas alvo de modulação por agentes terapêuticos	9
1.1.2.2.1. Proteína de resistência a múltiplos fármacos (MDR1)	9
1.1.2.2.2. Recetor do fator de crescimento de hepatócito (c-MET)	9
1.1.3. Fármacos usados na quimioterapia do carcinoma hepatocelular	11
1.1.3.1. Sorafenib	11
1.2. Sistemas de transporte	12
1.2.1. Nanopartículas de base inorgânica	14
1.2.2. Nanopartículas de base polimérica	15
1.2.3. Lipossomas	17
1.2.4. Nanopartículas híbridas	18
1.3. Motivação e objetivos	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Reagentes	23
2.2. Produção de partículas de base polimérica	23
2.2.1. Protocolo 1	24
2.2.2. Protocolo 2	24

2.3.	Encapsulação de fármaco ou sonda fluorescente.....	25
2.4.	Caraterização físico-química das partículas	26
2.4.1.	Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)	26
2.4.2.	Quantificação da sonda fluorescente.....	27
2.4.3.	Quantificação do fármaco	28
2.4.4.	Quantificação de amins quaternárias.....	29
2.5.	Estabilidade da suspensão das partículas	30
2.6.	Preparação dos complexos.....	30
2.7.	Caraterização dos complexos.....	31
2.7.1.	Ensaio de intercalação do brometo de etídio	31
2.7.2.	Ensaio de eletroforese em gel de agarose – com DNase I	32
2.7.3.	Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1.	Protocolo 1	35
3.1.1.	Caraterização físico-química das partículas	35
3.2.	Protocolo 2	42
3.2.1.	Caraterização físico-química das partículas	42
3.2.1.1.	Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP).....	44
3.2.1.2.	Eficiência de encapsulação do coumarin-6	47
3.2.1.3.	Eficiência de encapsulação de sorafenib e capacidade de carga das nanopartículas.....	49
3.2.1.4.	Estabilidade da suspensão de partículas ao longo do tempo	50
3.2.1.4.1.	Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)	51
3.2.1.4.2.	Porcentagem de fármaco retido nas nanopartículas	55
3.2.2.	Complexos	56
3.2.2.1.	Ensaio de intercalação do brometo de etídio	56
3.2.2.2.	Ensaio de eletroforese em gel de agarose com DNase I	57
3.2.2.3.	Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP).....	59
4.	CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	61
	BIBLIOGRAFIA	65

Resumo

O carcinoma hepatocelular é o cancro do fígado mais comum, apresentando uma elevada taxa de incidência e mortalidade. Os principais tratamentos para esta neoplasia são muito limitados e apresentam efeitos adversos graves e muito frequentes. Para além disso, apresentam uma taxa de eficiência muito baixa, que justifica a elevada taxa de mortalidade. Deste modo, é necessário arranjar novas alternativas terapêuticas multialvo que sejam mais seguras e mais eficientes, como por exemplo a combinação da quimioterapia com a terapia génica que tem apresentado resultados promissores. Assim, é urgente desenvolver novos nanossistemas com capacidade para transportar e entregar às células alvo vários agentes terapêuticos, como fármacos e material genético, de forma eficiente e segura.

Neste contexto, o principal objetivo deste projeto foi a construção de um sistema de transporte, de base polimérica, capaz de transportar em simultâneo um fármaco com características antitumorais e material genético. Para isso, foi escolhido o polímero policaprolactona, já aprovado pela FDA, para construção do núcleo do nanossistema responsável pela encapsulação e transporte do fármaco, e o surfactante catiónico brometo de hexadeciltrimetilamónio, para a complexação e transporte do material genético.

Neste projeto foram desenvolvidas nanopartículas de base polimérica revestidas por um surfactante catiónico, que apresentaram um diâmetro médio entre os 150 e 180 nm e uma carga superficial positiva. Estas partículas demonstraram ter uma grande capacidade de encapsulação de sorafenib e elevada estabilidade de armazenamento de longo prazo. Além disso, as partículas desenvolvidas mostraram uma elevada capacidade para condensar e proteger o material genético.

Os resultados obtidos neste projeto, mostraram que a formulação desenvolvida se apresenta como promissora para mediar uma estratégia antitumoral combinada, podendo vir a ser uma alternativa à quimioterapia convencional.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular, sistema de transporte, sorafenib, material genético, complexos.

Abstract

Hepatocellular carcinoma is the most common liver cancer and has a high incidence and mortality rate. The main therapeutics options are both limited and associated with severe and frequent side effects. Additionally, the poor efficiency of the treatments explains the high mortality rate. Thus, in order to increase the efficiency and safety of treatments, it is essential to find new multitarget therapeutic approaches such as the combination of chemotherapy with gene therapy, that have shown promising results. In this context, it is urgent to develop new nanosystems with the ability to efficiently and safely deliver different therapeutic agents, including drugs and genetic material, into target cells.

In this regard, the main goal of this project was to develop a polymer-based nanosystem able to simultaneously transport genetic material and an anti-cancer drug. For this purpose, two substances were chosen: the polymer, polycaprolactone, approved by the FDA, to build the core of the nanosystem that encapsulates and carries the drug; and the cationic surfactant, hexadecyltrimethylammonium bromide, to perform the complexation and transport of the genetic material.

In this project, polymer-based nanoparticles coated by a cationic surfactant were developed, presenting a mean diameter between 150 and 180 nm and a positive surface charge. These particles exhibited a great capacity of sorafenib encapsulation and a high long-term storage stability. In addition, the developed particles showed a high capacity to condensate and protect the genetic material.

The results obtained in this project showed that the developed formulation holds great potential to mediate a combined antitumoral strategy, which might constitute an alternative to the conventional chemotherapy.

Keywords: Hepatocellular carcinoma, carrier system, sorafenib, genetic material, complex.

Lista de siglas

ADN – Ácido desoxirribonucleico
ARN – Ácido ribonucleico
AKT – Serina/treonina cinase AKT 1
AKT3 – Serina/treonina cinase AKT 3
ASGP-R – Recetor asialoglicoproteína
BTB – Azul de bromotimol
CCR1 – Recetor de quimiocina C-C tipo 1
c-KIT – Recetor do fator das células estaminais
CMC – Concentração micelar crítica
c-MET = HGFR - Recetor do fator de crescimento de hepatócito
CTAB – Brometo de hexadeciltrimetilamónio
DLC1 – Proteína eliminada no cancro do fígado
DLS – Difusão dinâmica da luz
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNase I – Desoxirribonuclease I
DOPE – Dioleoilfosfatidiletanolamina
DOTAP – [1,2-dioleoil-3-(trimetilamónio)propano]
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico
EGF – Fator de crescimento epidérmico
EPOPC – 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina
ER- α – Recetor de estrogénio- α
ERK – Cinase regulada por sinal extracelular 3
EtBr – Brometo de etídio
FDA – *Food and Drug Administration*
FLT3 – Recetor MFS relacionado da tirosina cinase 3
GFP – Proteína verde fluorescente
IGF-1R – Recetor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
CHC – Carcinoma hepatocelular

HCl – Ácido clorídrico
HGF – Fator de crescimento de hepatócitos
 K_2HPO_4 – Fosfato dipotássio
 KH_2PO_4 – Fosfato monopotássio
Mcl-1 – Sequência de leucemia de células mielóides 1
Mcl-1 – Regulador de apoptose MCL1
MDR1 – Proteína de resistência a múltiplos fármacos
MEK = MAPK1 – Proteína cinase ativada por mitógeno 1
miARN - microARN
NaOH – Hidróxido de sódio
NPs – Nanopartículas
p53 – Supressor tumoral p53
p57-CDKN1C – Inibidor de cinase dependente da ciclina 1C
PAMAM - Poliamidoamina
P β AE – Poli(β -amino éster)PCL – Policaprolactona
Pdl – Índice de polidispersão
PDGFR- β – Recetores de crescimento derivado de plaquetas β
PDMAEMA – poli(metacrilato de etilo-2-dimetilamino)
PEG - Polietilenoglicol
PEI – Polietilenimina
pGFP – Plasmídeo para a proteína verde fluorescente
PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase
PLA – Políácido láctico
PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PTEN – Gene homólogo de fosfatase e tensina
RRM2 – Ribonucleotídeo redutase M2
RTK – Recetores de tirosinas cinases
siARN – ARN de interferência
siARN-c-Met – ARN de interferência contra o mARN c-MET
si-ARN-GFP – ARN de interferência contra o mARN da GFP
shARN – *short hairpin* de ARN
SDS – Dodecil sulfato de sódio
TACE – Quimioembolização transarterial
TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA

TGF – Fator de transformação do crescimento

TRAIL – Ligando indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFRs – Recetores do fator de crescimento endotelial vascular

ZP – Potencial zeta

% CC - % de capacidade de carga

% EE – % de eficiência de encapsulação

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão

λ_{ex} – Comprimento de onda de excitação

1. Introdução

1.1. Carcinoma hepatocelular

O cancro é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. O cancro do fígado é o sexto tipo de cancro mais comum e a quarta causa de morte relacionada com o cancro em todo o mundo, levando à morte de mais de 700 000 pessoas, anualmente, principalmente devido à falta de terapias efetivas (Bray *et al.*, 2018; Ferlay *et al.*, 2019). A taxa de incidência de cancro de fígado está a aumentar mais rapidamente do que nos restantes tipos de cancro, podendo a obesidade e a diabetes ser as principais causas (Zhu *et al.*, 2018). O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das principais neoplasias do fígado, representando cerca de 75 a 85% de todos os tipos de cancro do fígado no mundo (Deng *et al.*, 2015; Obeid *et al.*, 2017; Bray *et al.*, 2018; Daher *et al.*, 2018; El-Shemi *et al.*, 2018; Jeong *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018).

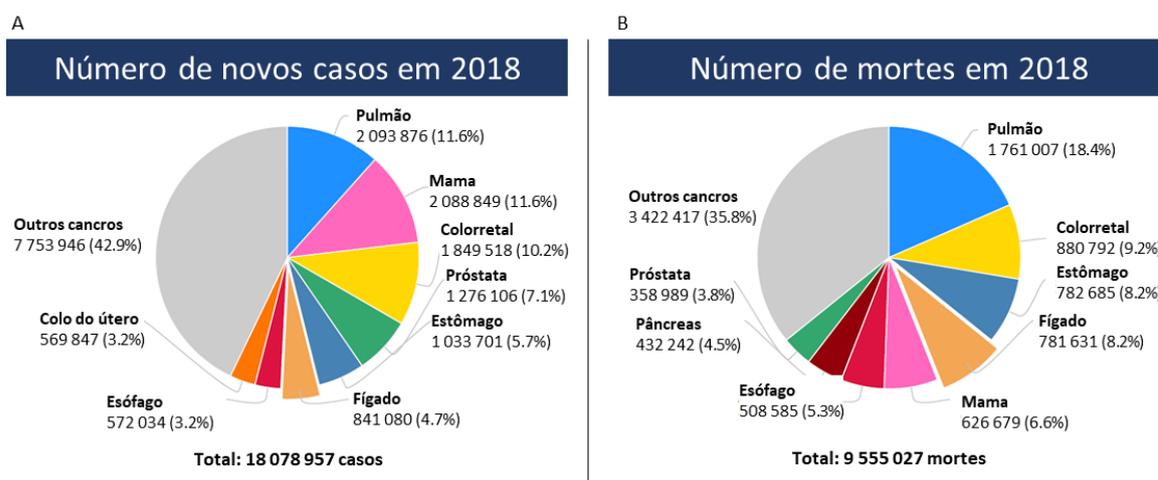


Figura 1 – Gráficos representativos da incidência e mortalidade dos diferentes tipos de cancro. (A) número de novos casos no ano de 2018; (B) número de mortes em 2018 associadas aos diversos tipos de cancro. (Adaptado de (Bray *et al.*, 2018)).

A maior taxa de incidência de cancro do fígado é verificada na Ásia e na África, tendo a Europa e a América uma taxa de incidência mais baixa. Esta diferença geográfica de incidência de cancro do fígado deve-se ao facto de ser um cancro multifatorial, e as diferentes regiões têm diferentes incidências de doenças que promovem o aparecimento deste tipo de cancro. Também existem diferenças entre os géneros, havendo maior taxa de incidência do carcinoma hepatocelular em pessoas do sexo masculino (Jemal *et al.*, 2011; Bray *et al.*, 2018; El-Shemi *et al.*, 2018).

Cerca de 80% dos casos de carcinoma hepatocelular verificam-se em indivíduos que têm cirrose. A cirrose pode ser proveniente de diferentes causas, incluindo infeções crónicas por hepatite B e C, sendo esta a principal causa da elevada taxa de incidência de CHC na Ásia e na África. Na América e na Europa a taxa de incidência da Hepatite B e C é mais baixa, nestes países os principais fatores de risco são: o abuso de álcool, a hemocromatose, a doença hepática gordurosa não alcoólica, o tabagismo, a obesidade e a diabetes (Waller *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Bouattour *et al.*, 2018). Também a exposição a determinadas substâncias, tais como a aflatoxina, podem aumentar a incidência de CHC. O carcinoma hepatocelular apresenta um fenótipo e um perfil genético muito heterogéneo, isso deve-se às mutações, à epigenética, às alterações moleculares que estão envolvidas em várias vias moleculares e ao número elevado de diferentes causas da doença. Em geral, inflamações crónicas e outras doenças no fígado, levam à cirrose hepática que contribui para a formação de hepatócitos malignos (Waller *et al.*, 2015; Bouattour *et al.*, 2018). Após algum crescimento tumoral, as células do interior do tumor recebem pouco oxigénio e nutrientes, levando à libertação de fatores de angiogénese por parte das células tumorais, o que irá promover o processo angiogénico para que as mesmas possam receber o oxigénio e os nutrientes necessários para continuarem a proliferar (Garner *et al.*, 1972; Jemal *et al.*, 2011; Waller *et al.*, 2015; Obeid *et al.*, 2017).

A alta mortalidade do CHC deve-se ao facto de, em estadios iniciais da doença, o doente não apresentar sintomas (assintomático), o que leva a uma deteção da doença já em estadios avançados. Para além disso, os tratamentos atuais têm uma baixa taxa de sucesso. Atualmente, para o tratamento do CHC pode-se recorrer a diferentes tratamentos, dependendo do estadio em que se encontra a doença: recesso cirúrgica do tumor, transplante de fígado, ablação percutânea, quimioembolização transarterial (TACE), radioembolização, quimioterapia e radioterapia. No entanto, estes tratamentos estão associados a múltiplas limitações e têm diversos efeitos secundários graves (principalmente devido à citotoxicidade não específica). A quimioterapia tradicional em muitos casos falha, pois as células do carcinoma hepatocelular têm geralmente alta resistência a estes fármacos e, por outro lado, na presença de metástases a quimioterapia não

consegue eliminá-las (Chi *et al.*, 2016; Obeid *et al.*, 2017; El-Shemi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018). Estudos recentes alertam para o facto de a quimioterapia poder induzir uma cascata alternativa que suporta o crescimento tumoral e a metastização (Chi *et al.*, 2016). Adicionalmente, nos casos em que os tratamentos convencionais têm sucesso, existe uma elevada taxa de recorrência (Xia *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

A descoberta do carcinoma hepatocelular em estadios tardios e na presença de metástases, a baixa taxa de sucesso e os elevados efeitos adversos das terapias atuais tornaram imperativo o estudo de novas terapias alternativas. Abordagens terapêuticas combinatórias, tendo como alvo diferentes mecanismos tumorais, que tenham alta eficiência e alta especificidade terapêutica, podem ser vantajosas para o tratamento do carcinoma hepatocelular (El-Shemi *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2018). A terapia direcionada é considerada uma estratégia promissora, pois oferece uma abordagem com elevada especificidade celular, o que leva a uma diminuição significativa dos efeitos adversos.

1.1.1. Fígado e hepatócitos

O fígado desempenha inúmeras funções importantes, entre elas: (1) controle da homeostase metabólica, (2) síntese, metabolismo, armazenamento e redistribuição de hidratos de carbonos, proteínas e lípidos e (3) desintoxicação do organismo. Algumas doenças como a diabetes, a obesidade e o cancro resultam de anormalidades no metabolismo hepático (Merzouk *et al.*, 2017).

O carcinoma hepatocelular deriva dos hepatócitos, principais células do fígado. O desenvolvimento do CHC deve-se a uma multiplicação exagerada dos hepatócitos e/ou inibição da apoptose, causada por mutações no genoma destas células. Os hepatócitos representam cerca de 80% das células do fígado, agrupam-se entre si formando os lóbulos hepáticos. Os hepatócitos têm um papel importante na modulação primária da imunidade hepática, são muito versáteis, pois têm tanto funções endócrinas como exócrinas (Ishibashi *et al.*, 2009; Merzouk *et al.*, 2017).

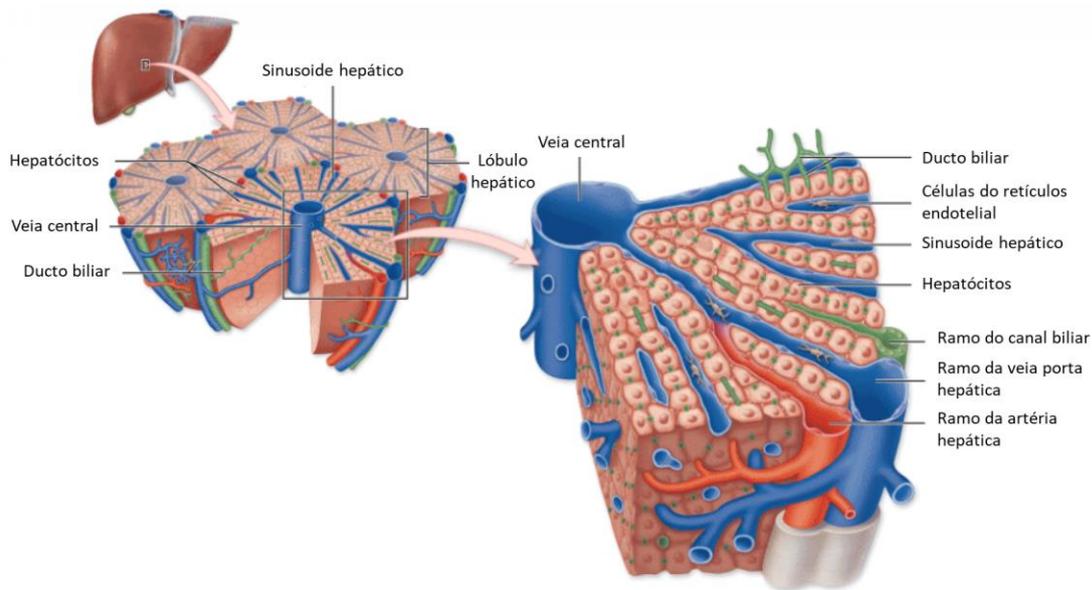


Figura 2 – Esquema representativo do fígado e dos lóbulos hepáticos, e organização dos hepatócitos. (Adaptado de: <https://www.rock-cafe.info/suggest/liver-sinusoids-anatomy-6c69766572.html>)

1.1.2. Características genéticas do carcinoma hepatocelular

O nível de expressão de cada gene depende das necessidades da célula e varia consoante o tecido. Nas células tumorais temos genes que estão inativos ou com baixa expressão, quando comparados com células normais. Estes genes codificam para proteínas supressoras tumorais ou indutoras da apoptose (Faloppi *et al.*, 2011). Por outro lado, os genes sobre-expressos, são genes associados à proliferação celular, à angiogénese, também em alguns casos, genes associados à quimiorresistência (Nishida *et al.*, 2006; Faloppi *et al.*, 2011). Resumidamente, genes responsáveis por todas as funções necessárias para inibir a morte das células tumorais e promover o crescimento celular (Tabela 1). Desta forma, as células tumorais arranjam mecanismos que inibem as vias apoptóticas, mas também mecanismos que promovem a sua proliferação e que as tornam resistentes à quimioterapia. Esta resistência deve-se a proteínas membranares que bombeiam os fármacos para o exterior da célula (bombas de efluxo).

Tabela 1 – Proteínas com expressão alterada no carcinoma hepatocelular e suas funções

Expressão	Proteína	Função	Artigo
Elevada	MDR	Confere resistência à quimioterapia	(Xue <i>et al.</i> , 2017)
	RRM2	Confere resistência à quimioterapia	(Gao <i>et al.</i> , 2013)
	c-Met	Promove a proliferação celular, a motilidade, a diferenciação, a invasão tumoral e a angiogênese	(Bouattour <i>et al.</i> , 2018)
	EGFR	Promove a proliferação celular, a sobrevivência e a migração	(Liu <i>et al.</i> , 2018)
	VEGF	Promove a progressão do tumor e angiogênese	(Tang, 2001)
	IGF-1R	Resistência à apoptose, promove proliferação celular, diferenciação, angiogênese e metástase	(Akiel <i>et al.</i> , 2014)
	CCR1	Promove invasão tumoral	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
	Mcl-1	Fator anti-apoptótico	(Su <i>et al.</i> , 2009)
	ER- α	Promove progressão celular e inibe a apoptose	(Jiang <i>et al.</i> , 2015)
Baixa	p53	Supressor tumoral	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
	DLC1	Supressor tumoral	(Tang, 2001)
	TRAIL	Induz apoptose e previne metástases	(El-Shemi <i>et al.</i> , 2018)

Abreviaturas: MDR (Proteína de resistência a múltiplos fármacos); RRM2 (Ribonucleotídeo redutase M2); c-Met (Recetor do fator de crescimento de hepatócito); EGFR (Recetor do fator de crescimento epidérmico); VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular); IGF-1R (Recetor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1); CCR1 (Recetor de quimiocina C-C tipo 1); Mcl-1 (Sequência de leucemia de células mielóides 1); ER- α (Recetor de estrogénio- α); p53 (Supressor tumoral p53); DLC1 (Proteína eliminada no cancro do fígado); TRAIL (Ligando indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral).

A expressão destas proteínas pode ser modulada com recurso a fármacos ou à introdução de material genético exógeno nas células tumorais (terapia génica). Os microARNs (miARN) são reguladores celulares importantes envolvidos na carcinogénese. Os miARNs são pequenas sequências de ácido ribonucleico (ARN) endógeno, não codificante, com importante função na regulação da expressão génica pós-transcricional, ou seja, o miARN liga-se ao ARN mensageiro (mARN) de forma a impedir a expressão de determinada proteína. Nas células tumorais, certos miARNs são sobre-expressos para impedir a produção de determinadas proteínas, o contrário também acontece, uma diminuição de determinados miARNs para um aumento da expressão de

uma proteína, por exemplo importante para a proliferação celular (Tabela 2) (Dogini *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016).

Tabela 2 – miARNs com expressão alterada nas células do carcinoma hepatocelular, suas funções e alvos moleculares.

Expressão	miARN	Função	Alvos / Artigo
Elevada	miR-21	Inibe apoptose do tumor, promove a proliferação, a angiogénese e a metastização, promove a resistência à quimioterapia	<i>PTEN</i> (Li <i>et al.</i> , 2018)
	miR-221	Promove a progressão do tumor	<i>p57-CDKN1C</i> (Pineau <i>et al.</i> , 2010)
	miR-222	Confere resistência à quimioterapia	<i>PI3K</i> e <i>AKT</i> (Liu <i>et al.</i> , 2014)
Baixa	miR-34	Supressor tumoral	<i>p53</i> (Ling <i>et al.</i> , 2013)
	miR-122	Inibe a proliferação celular, a diferenciação, a apoptose e a carcinogénese	<i>AKT3</i> (Nassirpour <i>et al.</i> , 2013)
	miR-101	Inibe o crescimento tumoral	<i>Mcl-1</i> (Su <i>et al.</i> , 2009)
	miR-497	Supressor tumoral	<i>IGF-1R</i> (Ding <i>et al.</i> , 2016)
	miR-181	Supressor tumoral e inibidor da angiogénese	<i>c-MET</i> (Korhan <i>et al.</i> , 2014)

Abreviaturas: *PTEN* (Gene homólogo de fosfatase e tensina); *p57-CDKN1C* (Inibidor de cinase dependente da ciclina 1C); *PI3K* (Fosfatidilinositol-3-cinase); *AKT* (Serina/treonina cinase AKT 1); *p53* (Supressor tumoral p53); *AKT3* (Serina/treonina cinase AKT 3); *Mcl-1* (Regulador de apoptose MCL1); *IGF-1R* (Recetor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1); *c-MET* (Recetor do fator de crescimento de hepatócito).

Através da terapia génica podemos optar por inibir os oncogenes ativos ou fatores angiogénicos, através do silenciamento génico com recurso a oligonucleótidos, siARN ou shARN, ou ativar os genes supressores do tumor, por exemplo com a inserção de um plasmídeo na célula que codifica uma proteína específica, ou através da introdução de oligonucleótidos contra os miARNs responsáveis pela inibição da expressão das proteínas em causa (Passadouro *et al.*, 2014). Para além disso, esta estratégia terapêutica pode ser direcionada para as células tumorais, através da incorporação de ligandos específicos, nos sistemas de transporte e entrega de material genético, para recetores sobre-expressos nestas células. Estes sistemas de transporte podem transportar material genético e/ou fármacos, permitindo assim aplicar estratégias direcionadas e também combinadas.

1.1.2.1. Recetores específicos dos hepatócitos e seus ligandos

Os hepatócitos possuem um recetor que não é expresso nas restantes células do organismo, o recetor das asialoglicoproteínas (ASGP-R). Para além disso, este recetor está sobre-expresso nos hepatócitos cancerígenos, o que torna a terapia direcionada tão promissora para o tratamento do CHC, sendo por isso o recetor mais estudado nesta neoplasia (D'Souza & Devarajan, 2015; Yang *et al.*, 2018). Existe também alguns recetores presentes em diferentes células e que estão sobre-expressos em vários tumores sólidos, como por exemplo, o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Podendo este também ter interesse para o direcionamento dos sistemas de transporte (Klutz *et al.*, 2011).

1.1.2.1.1. Recetor das asialoglicoproteínas (ASGP-R)

O recetor das asialoglicoproteínas (ASGP-R) foi descoberto por Ashwell e Morell (Breitfeld *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 2017). Trata-se de um complexo hétero-oligomérico composto por dois tipos de subunidades homólogas e por quatro domínios: um domínio citoplasmático, um domínio transmembranar, um segmento extracelular e um domínio de reconhecimento de hidratos de carbono (Figura 3). Este recetor pertence à família das lectinas tipo C e é dependente de cálcio (D'Souza & Devarajan, 2015; Huang *et al.*, 2017). Estes recetores reconhecem especificamente as asialoglicoproteínas, estas têm resíduos de galactose e N-acetilgalactosamina nos seus terminais. Um dos ligandos mais específicos para o ASGP-R é a asialofetuína, uma glicoproteína de 48 kD, que deriva da fetuína. O uso desta glicoproteína num sistema de transporte aumenta a especificidade e facilita a internalização do mesmo na célula (Breitfeld *et al.*, 1985; Spiess, 1990; Farinha *et al.*, 2014; D'Souza & Devarajan, 2015).

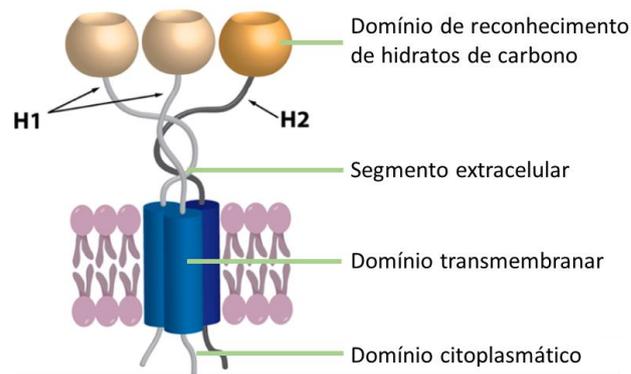


Figura 3 – Esquema representativo do recetor das asialoglicoproteínas. (Adaptado de: (Huang *et al.*, 2017).

1.1.2.1.2. Recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) foi descrito como sobre-expresso em células do carcinoma hepatocelular e em outros tumores sólidos. O EGFR pertence a uma família de quatro recetores e é composto por três domínios: um domínio extracelular para a ligação do ligando; um domínio transmembranar; e um domínio intracelular com atividade de tirosina cinase para a transdução de sinal. Existem vários ligandos naturais para este recetor, tais como: o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de transformação do crescimento (TGF). A ligação destas moléculas ao EGFR promove a dimerização do recetor, que ativa a tirosina cinase e leva à ativação de uma cascata de sinalização, importante para as células tumorais (Figura 4). A ativação deste recetor, promove a migração celular, a maturação, a diferenciação, a metastização, a angiogénese e a inibição da apoptose. Para contornar o problema da ativação deste recetor, foram realizados alguns estudos para produzir péptidos sintéticos que se liguem a este recetor sem o ativar e assim poderem ser usados como ligandos de direcionamento para alguns tumores, como é o caso do carcinoma hepatocelular (Hu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018). Alguns dos péptidos sintéticos que têm sido estudados para o recetor do EGF e que não o ativam são: GE7 (sequência: NPVVG YIGERPQYRDL), HA20 (sequência: GLFEAIAEFIEGGWEGLEG) e GE11 (sequência: YHWYGYTPQNVI) (Lee *et al.*, 2001; Klutz *et al.*, 2011).

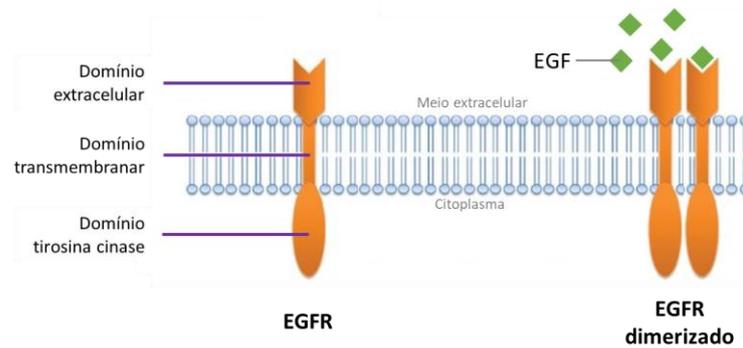


Figura 4 – Esquema representativo do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e interação com o ligando EGF. (Adaptado de: (Araki *et al.*, 2012)).

1.1.2.2. Proteínas alvo de modulação por agentes terapêuticos

1.1.2.2.1. Proteína de resistência a múltiplos fármacos (MDR1)

A proteína MDR1, também conhecida como proteína de resistência a múltiplos fármacos, faz parte de uma superfamília de transportadores de cassete de ligação a ATP (ABC). A proteína MDR1 é um recetor membranar responsável pela resistência do CHC à quimioterapia, pois a sua principal função é funcionar como bomba de efluxo, diminuindo a acumulação de fármaco no interior destas células. Alguns estudos provam que diminuir ou inibir a expressão desta proteína aumenta a eficácia de alguns fármacos quimioterápicos (Zou *et al.*, 2017; Cao & Yin, 2019).

1.1.2.2.2. Recetor do fator de crescimento de hepatócito (c-MET)

A proteína recetora c-MET, também conhecida como recetor do fator de crescimento de hepatócito (HGFR), é um recetor de tirosina cinase altamente expresso nas células do carcinoma hepatocelular. O ligando conhecido para este recetor é o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) que, ao ligar-se, induz dimerização e ativação do c-MET, que vai desempenhar um papel importante na proliferação celular, na invasão tumoral e na sobrevivência da célula (Figura 5)

(Bouattour *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018). Está descrito em alguns estudos que este recetor quando sobre-expresso deixa de depender da ligação do HGF para se ativar (Korhan *et al.*, 2014).

Este alvo molecular tem vindo a ser considerado como um alvo promissor para estratégias de terapia génica contra o CHC e alguns estudos mostram que a redução da expressão da proteína c-MET inibe o crescimento tumoral (Yang *et al.*, 2018). O miR-181 é um dos exemplos de miARN que pode ser usado na terapia génica contra o CHC, ele liga-se especificamente ao mRNA do c-MET de forma a diminuir a expressão do recetor. A sobre-expressão do miR-181 demonstrou suprimir o recetor tanto na forma dependente como independente do ligando HGF. Nas células do carcinoma hepatocelular, este miARN encontra-se pouco regulado, e em alguns casos inexistente. A perda deste miR durante a hepatocarcinogénese traduz-se num fenótipo de CHC agressivo e, a um mau prognóstico (Korhan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018). Outro estudo demonstrou que este recetor quando sobre-expresso, ativa vias que conferem resistência à terapia com o sorafenib, no carcinoma hepatocelular. Ou seja, diminuindo a expressão do recetor, por exemplo com um miR e, a administração do fármaco, sorafenib, parece ter um efeito sinérgico, podendo ser uma abordagem promissora para o tratamento do carcinoma hepatocelular. Para além disso, este recetor quando sobre-expresso, também demonstrou aumentar a resistência das células à radioterapia (Korhan *et al.*, 2014; Bouattour *et al.*, 2018).

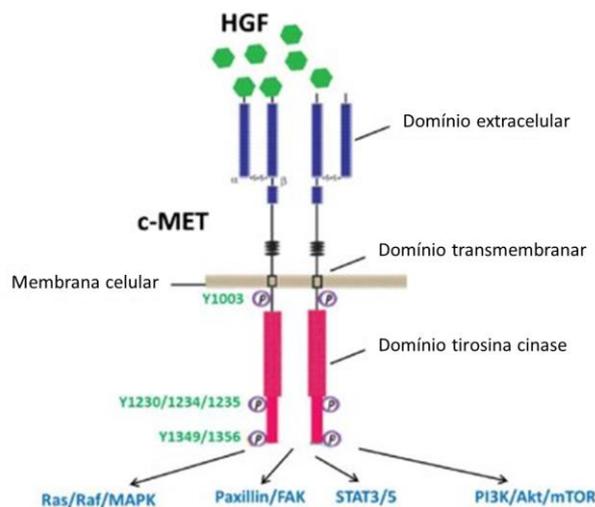


Figura 5 – Esquema representativo do recetor do fator de crescimento de hepatócitos (c-MET) e interação com o ligando HGF. (Adaptado de: (Lam *et al.*, 2016)).

1.1.3. Fármacos usados na quimioterapia do carcinoma hepatocelular

A quimioterapia convencional tem baixa taxa de sucesso no carcinoma hepatocelular, principalmente devido à resistência destas células aos fármacos usados. Por outro lado, também não consegue eliminar as metástases. Além disso, quando existe sucesso com este tratamento, verifica-se uma elevada taxa de recorrência (El-Shemi *et al.*, 2018; Mao *et al.*, 2018). Existem diversos fármacos, aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), para o tratamento do carcinoma hepatocelular, de importante referir o sorafenib, pois é um fármaco de primeira linha e de particular interesse para este trabalho (Deng *et al.*, 2015; Chi *et al.*, 2016; Daher *et al.*, 2018; Lohitesh *et al.*, 2018).

1.1.3.1. Sorafenib

O sorafenib (tosilato de sorafenib) é um fármaco usado no tratamento de diversos tumores, incluindo o carcinoma hepatocelular, e é um inibidor de múltiplos recetores tirosina cinase (RTK), tais como: recetores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFRs), recetores de crescimento derivado de plaquetas β (PDGFR- β), recetor do fator das células estaminais (c-KIT) e recetor MFS relacionado da tirosina cinase 3 (FLT3). Para além disso, inibe uma cinase serina/treonina, denominada RAF, que está envolvida na via MAPK/ERK, responsável pela angiogénese, proliferação, sobrevivência e metastização (Liu *et al.*, 2006; Lacouture *et al.*, 2008). Alguns estudos mostraram que o sorafenib tem a capacidade de bloquear diversos recetores e inibir algumas vias de sinalização, conseguindo diminuir a angiogénese e a proliferação celular e, ainda induzir a apoptose, através da indução da caspase 3 e através da diminuição de determinadas proteínas anti-apoptóticas. Devido aos diversos alvos em que este fármaco atua, dado as características do mesmo, este fármaco demonstrou ter efeito antitumoral e antiangiogénico (Liu *et al.*, 2006; Lacouture *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2015).

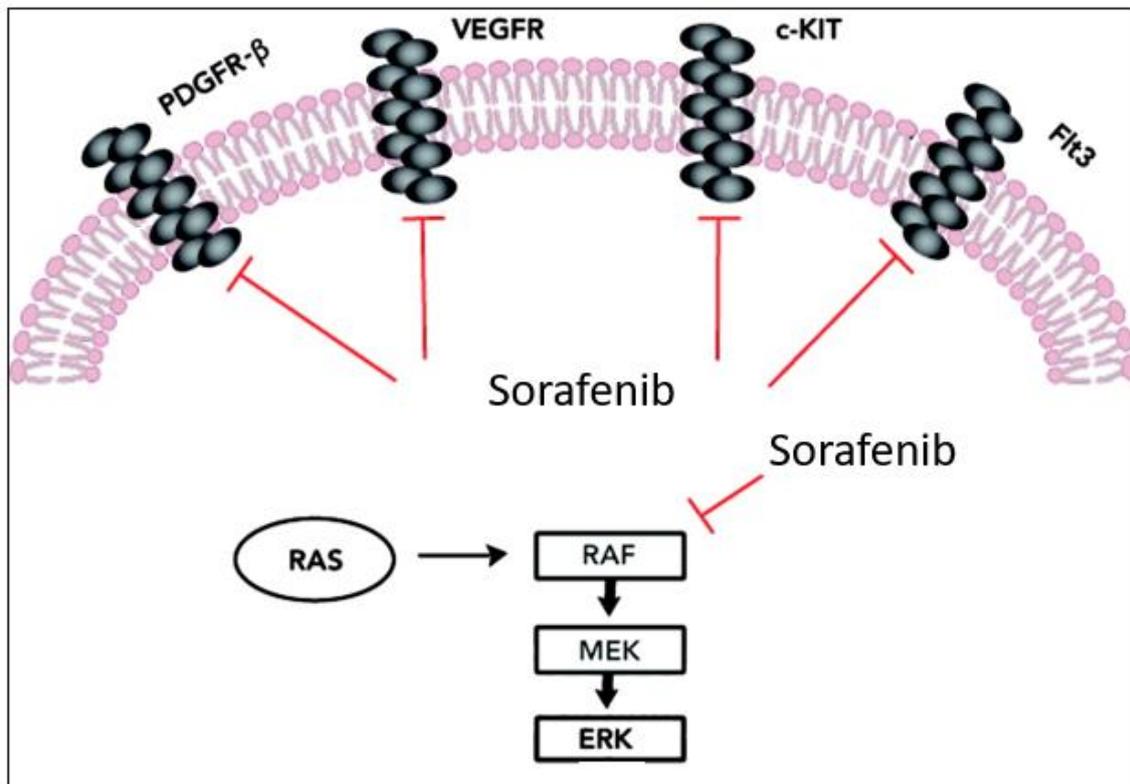


Figura 6 – Recetores e vias inibidas pelo sorafenib. PDGFR- β : recetores de crescimento derivado de plaquetas β ; VEGFRs: recetores do fator de crescimento endotelial vascular; c-KIT: recetor do fator das células estaminais; FLT3: recetor MFS relacionado da tirosina cinase 3; RAF: proteína cinase serina/treonina; MEK = MAPK1: proteína cinase ativada por mitógeno 1; ERK: cinase regulada por sinal extracelular 3 (Adaptado de: (Lacouture *et al.*, 2008)).

1.2. Sistemas de transporte

Como referido anteriormente, a quimioterapia tem inúmeros efeitos adversos graves associados à falta de especificidade e às concentrações elevadas de fármaco a administrar para obtenção de algum efeito terapêutico. Para colmatar este problema, surgiram os sistemas de transporte que têm a capacidade de transportar fármaco e/ou material genético até às células alvo. A eficiência da terapia está dependente da entrega eficiente e seletiva dos agentes terapêuticos às células alvo, sendo as características do sistema de transporte muito importantes para a sua eficiência. Por outro lado, é importante que não seja citotóxico (Somia & Verma, 2000; Schepelmann *et al.*, 2008; Al-Allaf *et al.*, 2010).

Os sistemas de transporte apresentam inúmeras vantagens, nomeadamente a entrega do agente terapêutico de forma específica às células alvo, recorrendo a um ligando com especificidade para determinado recetor, o que permite um aumento da eficiência e, conseqüentemente, a administração de concentrações de fármaco mais baixas do que na quimioterapia convencional, contribuindo assim também para a diminuição dos efeitos secundários. Permite também, quando assim é desejado, a libertação de fármaco ao longo do tempo de forma controlada. Adicionalmente, é graças ao uso dos sistemas de transporte que é possível a entrega de material genético às células, pois, caso contrário, seria degradado pelas nucleases dos fluídos biológicos aquando da sua administração ao doente e, mesmo que não fosse completamente degradado, teria dificuldade em chegar ao tecido alvo devido à falta de elementos que lhe confirmam especificidade. Além disso, teria dificuldade em passar através das membranas celulares, devido às suas características físico-químicas nomeadamente tamanho e carga (Tani *et al.*, 2011; Ginn *et al.*, 2018).

Os sistemas de transporte, por si só, não possuem especificidade para as células alvo, podendo ser internalizados por outras células. Para colmatar esta limitação, os sistemas de transporte são revestidos com ligandos específicos para determinados recetores presentes na superfície das células alvo. Estes ligandos podem ser proteínas, pequenas sequências peptídicas, anticorpos, açúcares, entres outros. Nas células tumorais alguns recetores encontram-se sobre-expressos. Quando recorremos a ligando para conferir especificidade, estamos a desenvolver uma estratégia de direcionamento ativo. Por outro lado, quando o sistema de transporte não é modificado com a introdução de um ligando que confira especificidade está apenas sujeito ao direcionamento passivo, devido ao efeito de permeabilidade e retenção melhorada (EPR). Com o crescimento do tumor, o seu interior fica sujeito à necrose devido à dificuldade de receber nutrientes e oxigénio. Para colmatar esse défice, as células tumorais ativam mecanismo de angiogénese. Desta forma, são formados novos vasos sanguíneos, que por vezes são mais frágeis, e a membrana dos mesmos é também mais permeável a partículas de maiores dimensões, quando comparado com os vasos sanguíneos que alimentam as células normais. Sabe-se que, partículas com dimensões superiores a 100-500 nm passam nesses capilares. Adicionalmente, existe ausência de drenagem linfática normal. São estas características que suportam a afirmação de que, os tumores têm grande capacidade de retenção de partículas que se encontram na circulação sanguínea, tornando o direcionamento passivo também uma alternativa a explorar para o tratamento de tumores (Iyer *et al.*, 2006; Petros & DeSimone, 2010; Cheng *et al.*, 2015; Attia *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2019).

Existem diferentes tipos de sistemas de transporte, como sejam os sistemas de base inorgânica, os de base polimérica e os de base lipídica. As principais características pretendidas nos sistemas de transporte são: capacidade de proteção do agente terapêutico; produção simples e reprodutível à escala industrial; não ser imunogénico; não ser tóxico; e ser específico para as células alvo (Somia & Verma, 2000; Al-Allaf *et al.*, 2010; Nayerossadat *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016).

1.2.1. Nanopartículas de base inorgânica

As nanopartículas (NPs) inorgânicas são compostas por materiais metálicos e semimetálicos, podendo ser modificadas por forma a adquirirem determinadas funcionalidades e especificidades. As nanopartículas inorgânicas possuem capacidade para libertar o material genético e/ou fármaco de forma controlada e são biocompatíveis (Liong *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2017). Estas nanopartículas podem ter na sua composição, por exemplo, óxido de ferro que através de um campo magnético externo pode permitir direcionar as nanopartículas para a zona do tecido alvo (Yang *et al.*, 2018). Por outro lado, podem ser nanopartículas semicondutoras que tenham a capacidade de emitir fluorescência, quando excitadas, e assim permitir acompanhar o seu percurso, ou apenas localizá-las para confirmar se atingiram as células-alvo (Liong *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2017).

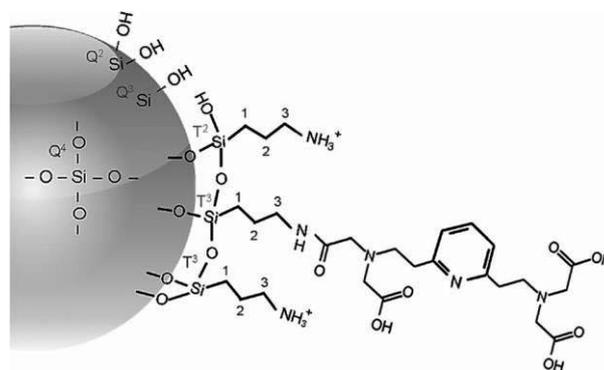


Figura 7 – Representação de uma nanopartícula de base inorgânica modificada. (Pinho *et al.*, 2012).

1.2.2. Nanopartículas de base polimérica

No que diz respeito ao transporte e entrega de material genético, as nanopartículas poliméricas são geralmente compostas por polímeros catiónicos, isto porque pretende-se que o material genético complexe com o polímero formando um políplexo. O material genético tem cargas negativas, provenientes dos grupos fosfato, que estabelecem interações eletrostáticas com as cargas positivas dos grupos amina dos polímeros. Os polímeros catiónicos podem ser subdivididos: polímeros naturais e polímeros sintéticos (Li & Huang, 2000; Choi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Existe uma panóplia de polímeros com diferentes características, o que permite obter uma grande diversidade de nanopartículas com propriedades distintas, tais como, diferentes características físico-químicas, estabilidade em fluidos fisiológicos e a possibilidade de controlar a velocidade de libertação do agente terapêutico. No entanto têm alguma citotoxicidade, e também baixa eficiência de transfeção quando comparado com sistemas de transporte virais, a elevada taxa de transfeção dos sistemas de transporte virais está associada à capacidade inerente que os vírus têm de infetar células (Yi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2014; Banik *et al.*, 2016). Dos polímeros catiónicos existentes, a polietilenimina (PEI) é a mais usada, sendo este considerado o nanossistema polimérico mais eficiente (Li & Huang, 2000; Choi *et al.*, 2014). No entanto, existem outros também muito comuns, nomeadamente: poliamidoamina (PAMAM), quitosano, poli(metacrilato de etilo-2-dimetilamino) (PDMAEMA) e poli(β -amino éster) (P β AE) (Chen *et al.*, 2016; Santo *et al.*, 2017). Por vezes, adiciona-se um monómero hidrofílico ao polímero para reduzir a citotoxicidade e aumentar a biodisponibilidade, diminuindo a interação do nanossistema com proteínas plasmáticas que têm carga negativa, sendo o polietilenoglicol (PEG) o mais usado (Stuart *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2008).

Para além de nanopartículas com capacidade de transporte e entrega de material genético, podem ser obtidas nanopartículas com capacidade de transportar e entregar diversos outros agentes terapêuticos, como por exemplo: fármacos, pró-fármacos, proteínas e fármaco em simultâneo com material genético. O transporte de fármaco pode ser realizado com o mesmo aprisionado nas nanopartículas, ou sendo conjugado com o polímero, ligando o fármaco covalentemente ao polímero (Yi *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2014; Banik *et al.*, 2016). Para o transporte de fármacos, geralmente são usados polímeros hidrofóbicos que, ao formar as partículas, têm a capacidade de aprisionar fármacos hidrofóbicos (Banik *et al.*, 2016). É possível também o transporte de fármacos hidrofílicos, mas para tal ser possível, é necessário conjugar um polímero hidrofóbico com um polímero hidrofílico, geralmente o polímero hidrofílico usado é o PEG. Outra alteração necessária é a adição de um surfactante de carga oposta ao do fármaco, que ao

ligarem-se, electrostaticamente, formem um complexo hidrofóbico, e só posteriormente é que este complexo é encapsulado. No entanto, em nanopartículas poliméricas, a eficiência de encapsulação de fármacos hidrofílicos é inferior à de fármacos hidrofóbicos. Nos fármacos hidrofílicos, a libertação de fármaco ao longo do tempo é mais difícil de controlar pois, a libertação do mesmo é muito rápida, e o tempo de armazenamento também é limitado (Poudel *et al.*, 2016).

Um dos objetivos deste trabalho é a encapsulação de um fármaco hidrofóbico recorrendo a nanopartículas poliméricas produzidas através de um polímero hidrofóbico, a policaprolactona (PCL). A policaprolactona é obtida através de uma reação de polimerização da caprolactona com recurso a um catalisador, sendo um poliéster (Figura 8). Este polímero já demonstrou ser biodegradável em condições fisiológicas. Para além disso, demonstrou ter baixa imunogenicidade e citotoxicidade, e que as suas propriedades físico-químicas e mecânicas podem ser adaptadas consoante a finalidade do mesmo (Enayati *et al.*, 2010; Banik *et al.*, 2016). *In vitro* este polímero pode ser degradado na presença da enzima lípase (Chawla & Amiji, 2002). Devido às suas diversas propriedades, já foi aprovado pela FDA para aplicações biomédicas, inclusive já é usado na clínica sobre a forma de pequenos implantes, fios de sutura, entre outros (Banik *et al.*, 2016). Como sistema de transporte, este polímero tem sido estudado para o transporte tanto de fármacos como de material genético. No entanto, poucos são os estudos sobre o transporte de ambos os agentes terapêuticos em simultâneo, estando pouco explorado até ao momento. As metodologias usadas para a produção de nanopartículas de PCL geralmente produz nanopartículas com baixa capacidade de carga de fármaco (Chawla & Amiji, 2002; Enayati *et al.*, 2010; Banik *et al.*, 2016).

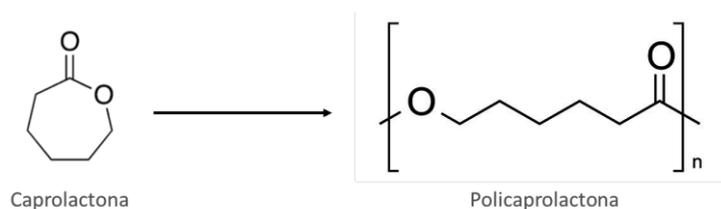


Figura 8 – Polimerização da policaprolactona (PCL) a partir da caprolactona.

1.2.3. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas de bicamada lipídica, com diferentes diâmetros que, podem transportar material genético e/ou fármacos. A superfície dos lipossomas pode ser modificada de forma a ter determinadas moléculas que vão interagir com as proteínas de superfície das células alvo, conferindo assim especificidade. Existe uma grande diversidade destes nanossistemas, podendo ser construídos com lípidos sintéticos e/ou naturais, geralmente fosfolípidos (Magalhães *et al.*, 2014; Bozzuto & Molinari, 2015). Os fosfolípidos são moléculas anfifílicas que possuem um grupo polar (hidrofílico) e uma cadeia apolar (hidrofóbica) (Li & Huang, 2000; Perrie *et al.*, 2001). Os lipossomas subdividem-se em lipossomas catiónicos e lipossomas sensíveis a pH. Na maior parte dos casos, os lipossomas utilizados no transporte de material genético são lipossomas catiónicos. Estes têm a capacidade de complexar o material genético, levando à formação de nanoestruturas designadas de lipoplexos, e têm a função de proteger o material genético da degradação enzimática e de entregá-lo de forma eficiente às células alvo (Yi *et al.*, 2000). As principais vantagens destes sistemas de transporte são a grande versatilidade e capacidade de transporte de material genético, a elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, e a baixa citotoxicidade. No entanto, apresentam baixa eficiência de transfeção quando comparado com sistemas de transporte virais, e a possibilidade de formação de agregados após interação com proteínas plasmáticas (Yi *et al.*, 2000; Bozzuto & Molinari, 2015).

Para construir um lipossoma catiónico é utilizado, na maior parte dos casos, um lípido catiónico e um lípido auxiliar. Como lípidos catiónicos, mais usados, temos o DOTAP [1,2-dioleoil-3-(trimetilamónio)propano] e o EPOPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina), tendo este último menor citotoxicidade (Faneca *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2014). Como lípidos auxiliares, mais usados, temos o DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) e o colesterol, estando o colesterol associado a uma maior capacidade de transfeção dos lipoplexos (Kim *et al.*, 2015; Chiang *et al.*, 2018).

Por forma a aumentar a eficiência e especificidade dos lipoplexos tem sido utilizadas diferentes estratégias como a associação de proteínas, péptido ou anticorpos que se ligam a um recetor, sobre-expresso ou expresso especificamente nas células alvo, resultando numa maior capacidade de transfeção e direcionamento do material genético para as células (Farinha *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017).

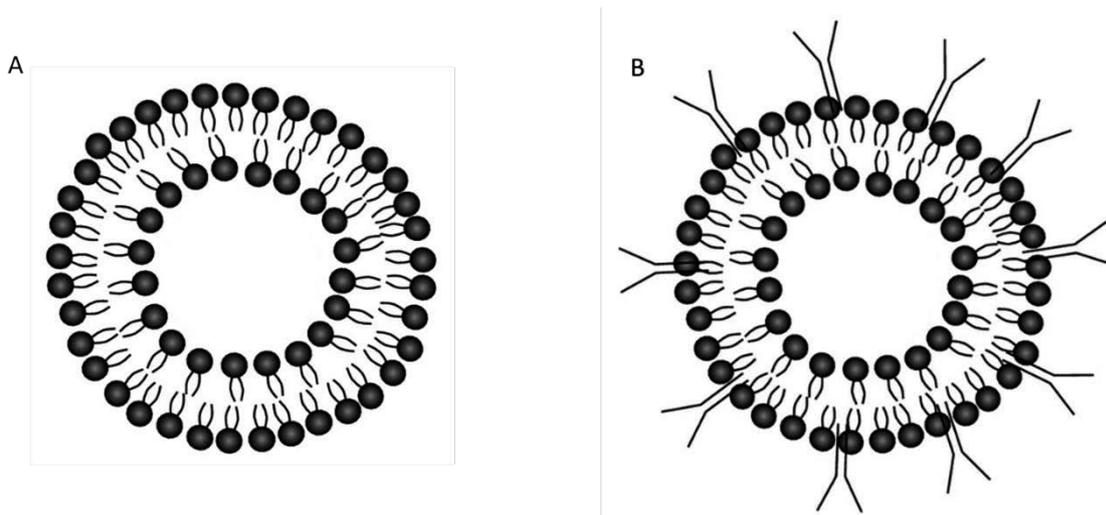


Figura 9 – Esquema representativo de lipossomas sem (A) e com (B) ligando para conferir especificidade. (Spuch & Navarro, 2011).

1.2.4. Nanopartículas híbridas

Em 2007, Al-Jamal e Kostarelos apresentaram um novo conceito de sistemas de transporte, as nanopartículas híbridas (Al-Jamal & Kostarelos, 2007). Estas surgem numa tentativa de eliminar as limitações das nanopartículas inorgânicas e orgânicas, combinando as vantagens das duas. Várias combinações são possíveis, sendo que o objetivo é sempre melhorar as propriedades do sistema de transporte final, como mais comuns temos as nanopartículas polímero-lípido. Em alguns estudos, realizaram a ligação de um polímero a um lípido para posteriormente criar o sistema de transporte. Noutros estudos, é construído um sistema de transporte com um núcleo polimérico (nanopartícula polimérica), que é revestido por uma bicamada lipídica. Sendo que a escolha dos lípidos a usar depende da função do sistema de transporte, a superfície da bicamada lipídica pode ser modificada para melhorar as propriedades do sistema de transporte final. Desta forma, obtém-se uma nanopartícula com maior estabilidade física, maior biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixa citotoxicidade e imunogenicidade. Para além disso, apresentam uma maior eficiência de entrega e maior capacidade de libertação controlada (Al-Jamal & Kostarelos, 2011; Hadinoto *et al.*, 2013; Bozzuto & Molinari, 2015).

Na última abordagem de nanopartículas híbridas apresentada no parágrafo anterior, a parte polimérica é normalmente constituída por PLGA [poli(ácido lático-co-ácido glicólico)], por PCL

(policaprolactona) ou por PLA (poliácido láctico) (Enayati *et al.*, 2010; Banik *et al.*, 2016). A carga do núcleo polimérico pode ser modificada para ser positiva e assim permitir a interação com o material genético. Complexar material genético com o núcleo polimérico pode não proteger completamente os ácidos nucleicos da degradação enzimática, sendo usada a bicamada lipídica para aumentar a proteção do mesmo (Al-Jamal & Kostarelos, 2011; Hadinoto *et al.*, 2013). Esta bicamada lipídica é normalmente constituída por DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamónio-propano), colesterol, entre outros (Faneca *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2015; Chiang *et al.*, 2018). Por último, a nanopartícula híbrida pode ser modificada por forma a inserir-se um ligando que confira especificidade para as células-alvo (Hadinoto *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2013).

1.3. Motivação e objetivos

O cancro do fígado é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo e a quarta com maior mortalidade. Como é assintomático, em estadios iniciais, leva a um diagnóstico tardio, onde os tratamentos atuais não têm uma resposta satisfatória. Deste modo, é fundamental encontrar estratégias alternativas, tais como as mediadas por nanossistemas que sejam capazes de transportar e entregar de forma eficiente fármaco e material genético às células alvo, minimizando os efeitos adversos associados aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia convencional. Os recursos a estes sistemas de transporte têm demonstrado elevado potencial, no entanto apresentam ainda algumas limitações que estão relacionadas principalmente com a baixa eficiência de entrega dos agentes terapêuticos.

Como referido anteriormente, já existem sistemas de transporte de base polimérica que transportam eficientemente fármacos, no entanto a sua capacidade de carga é baixa, sendo importante o melhoramento desta característica. Até ao momento é uma das limitações dos sistemas de base polimérica para o transporte de fármaco. Existe também políplexos, sistemas de transporte de base polimérica com a capacidade de complexar material genético e protegê-lo. O transporte destes dois agentes terapêuticos, fármaco e material genético em simultâneo, não está muito explorado. No entanto, os estudos *in vitro* demonstram que a combinação destes agentes terapêuticos leva a uma maior eficiência antitumoral, do que quando administrados em separado, pois conseguem atuar em diferentes vias de sinalização em simultâneo, aproveitando o efeito sinérgico.

Pretende-se com este trabalho desenvolver um nanossistema, de base polimérica, capaz de transportar em simultâneo fármaco e material genético até às células alvo, de forma a poder ser usado para mediar uma estratégia terapêutica combinada contra o carcinoma hepatocelular. Desta forma, avaliaram-se algumas propriedades físico-químicas, deste sistema, e a sua capacidade de condensação e proteção do material genético. Mais concretamente, será usado um polímero hidrofóbico, a policaprolactona (PCL), que já demonstrou ser biocompatível e ter a capacidade de encapsular fármacos hidrofóbicos, no entanto pretende-se aumentar a capacidade de carga de fármacos, comparando com a literatura existente. O fármaco usado neste estudo será o sorafenib, que é um fármaco de primeira linha no tratamento do carcinoma hepatocelular. Para concluir o projeto, pretende-se que este sistema também transporte material genético. Para tal, é importante que a superfície desta nanopartícula tenha carga positiva, para complexar com o material genético, desta forma a nanopartícula será revestida por um surfactante catiónico, o

CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamónio). Com uma carga superficial positiva, é espectável a complexação do material genético, no entanto é necessário realizar ensaios para avaliar se o material genético fica protegido e se o fármaco fica retido no interior das nanopartículas. Será usado um plasmídeo para a proteína verde fluorescente (pGFP). Serão realizados vários ensaios no sentido de avaliar as dimensões das partículas, a carga superficial, a capacidade de encapsular fármaco, a estabilidade das mesmas e, também serão realizados ensaios no sentido de avaliar a complexação e proteção do material genético.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes

Os seguintes compostos foram adquiridos à Sigma-Aldrich: a agarose, o azul de bromotimol (BTB), o coumarin-6 (C6, $\geq 98\%$), a desoxirribonuclease I (DNase I, ≥ 2000 unidades/mg proteína), a policaprolactona (PCL, peso molecular: $\sim 14\ 000$), o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, $\geq 99\%$), o ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico dihidratado (EDTA potássio, $\geq 98\%$), brometo de etídio (EtBr) e o fosfato monopotássico (KH_2PO_4 , $\geq 99\%$). O brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, $\geq 98\%$), o fosfato dipotássio (K_2HPO_4 , $\geq 99\%$) e D-(+)-glucose e o ácido bórico foram adquiridos à Merck. A acetona foi comprada à Acros organics. O hidróxido de sódio (NaOH, $\geq 98\%$) foi adquirido à PanReac AppliChem ITW Reagents. Os seguintes reagentes foram obtidos através da ThermoFisher: etanol absoluto, dimetilsulfóxido (DMSO, $\geq 99,7\%$), ácido clorídrico (HCl, 37%), e tris-base ($\geq 99\%$). A água ultrapura usada foi obtida através do sistema de purificação Milli-Q (Millipore). O fármaco usado, tosilato de sorafenib, foi gentilmente cedido pela Bayer (Bay 54-9085; Bayer).

2.2. Produção de partículas de base polimérica

A produção das partículas foi realizada através da adaptação do método de nanoprecipitação descrito por Barichello e colaboradores (Barichello *et al.*, 1999). Resumindo, o polímero é dissolvido num solvente orgânico, sendo hidrofóbico quando é feita a difusão desta solução numa solução aquosa, o polímero precipita e formam-se nanopartículas. O surfactante é adicionado numa concentração inicial superior à concentração micelar crítica (CMC). Este surfactante pode ser adicionado na fase aquosa (protocolo 1) ou na fase orgânica juntamente com o polímero (protocolo 2). Este método é adequado para encapsular fármacos hidrofóbicos, adicionando os mesmos ao solvente orgânico.

Neste projeto, o polímero usado foi a policaprolactona (PCL), o surfactante foi o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) e o fármaco foi o sorafenib.

2.2.1. Protocolo 1

A PCL foi dissolvida em acetona e etanol, na proporção 85:15, a uma concentração de 2,5 mg/mL de polímero. Foi injetada gota a gota 2 mL desta solução numa solução aquosa de CTAB a 8% (m/v), num rácio fase orgânica/fase aquosa de 1:5. Este processo foi realizado num balão, em banho de água a 37°C, sobre agitação magnética (1500 rpm), com tempos de agitação diferentes (entre 4 a 24 horas), para evaporação do solvente orgânico. No final desse tempo, realizou-se uma centrifugação a 2000 g, durante 5 minutos, numa centrífuga de eppendorfs (Eppendorf™ centrifuge 5810R, Eppendorf™, DE), para eliminação dos agregados. O sobrenadante recolhido foi centrifugado durante 1 hora, a diferentes forças centrífugas (entre 9000 e 40 000 g) (Centrifuge avanti J-26 XPI, Beckman Coulter Inc, CA, USA), para otimização da recolha das partículas. No final da centrifugação, foi descartado o sobrenadante (eliminando o surfactante que se encontrava em excesso) e aproveitado o *pellet*, que foi posteriormente ressuscitado em 5 mL de água ultrapura. Tendo sido realizado também o *scale-up*, mantendo-se todas as concentrações e rácios, no entanto os volumes das soluções foi o dobro, 4 mL da fase orgânica e 20 mL da solução aquosa.

Todas as alterações do protocolo, nomeadamente tempos de agitação e diferentes forças centrífugas, realizadas durante o desenvolvimento das nanopartículas, foram efetuadas tendo em consideração os resultados obtidos na caracterização físico-química das mesmas.

2.2.2. Protocolo 2

A PCL foi dissolvida em acetona e etanol, na proporção 1:1, em duas concentrações diferentes de polímero (17 mg/mL ou 10 mg/mL) e, posteriormente foi adicionado o CTAB num rácio de polímero/CTAB de 17:3. Foi injetada gota a gota 2 mL desta solução em água, num rácio fase orgânica/fase aquosa de 1:10. Este processo foi realizado num balão, em banho de água a 37°C, sobre agitação magnética (500 rpm), com tempos de agitação diferentes (entre 16 e 24 horas), para evaporação do solvente orgânico. Após o término do tempo de agitação, em algumas formulações, testaram-se diferentes condições de centrifugação (entre 25 000 g e 100 000 g,

durante 30 minutos), para recolha das partículas de forma a obter uma amostra o mais homogênea possível e eliminar o surfactante em excesso, caso existisse.

Todas as alterações do protocolo, nomeadamente tempos de agitação, diferentes condições de centrifugação e a concentração de polímero na fase orgânica, realizadas durante o desenvolvimento das nanopartículas, foram efetuadas tendo em consideração os resultados obtidos na caracterização físico-química das mesmas.

2.3. Encapsulação de fármaco ou sonda fluorescente

O fármaco utilizado neste projeto foi o sorafenib. Este está descrito como sendo um fármaco hidrofóbico, tendo como tal sido adicionado à fase orgânica. Foi preparada uma solução de concentração conhecida de fármaco em etanol. Quando foi preparada a fase orgânica, adicionou-se o polímero, a acetona e a solução de etanol com o fármaco dissolvido. O restante protocolo de produção das nanopartículas manteve-se como descrito anteriormente. Aquando da precipitação do polímero, o fármaco fica retido no interior da partícula polimérica devido às suas propriedades hidrofóbicas. O rácio de massa polímero/fármaco utilizado foi 10:1.

Em fases iniciais do projeto, durante o desenvolvimento da formulação, foi usada a sonda fluorescente coumarin-6. Trata-se de um composto químico hidrofóbico, que foi utilizado para mimetizar o carregamento do fármaco, tendo também a vantagem de ser fácil de quantificar.

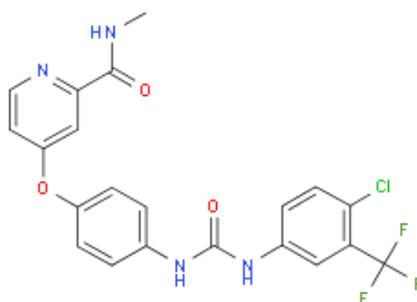


Figura 10 – Estrutura química do fármaco em estudo, Sorafenib.

2.4. Caracterização físico-química das partículas

2.4.1. Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

O diâmetro médio e o potencial zeta das diferentes formulações de nanopartículas foram determinados utilizando um Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., UK), com recurso a uma célula indicada para os parâmetros desejados (DTS1070, Malvern Instruments Ltd., UK). A distribuição do tamanho das partículas, o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas (z-médio), o índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta (ZP) foram determinados com o software Zetasizer.

O tamanho das partículas foi analisado por difusão dinâmica da luz (DLS), método baseado no movimento browniano das partículas em suspensão num líquido, movimento este que provoca uma dispersão da luz com diferentes intensidades, quando sobre a amostra incide um feixe de luz. Através da análise dessas intensidades, é possível medir a velocidade de movimento das partículas e, por conseguinte, o seu tamanho. A intensidade da difusão da luz é detetada usando um detetador de fotodiodo (Fankhauser, 2010; Bozzuto & Molinari, 2015). A medição foi realizada com as partículas suspensas em água a pH 7, a 25°C e a um ângulo de dispersão oposto de 173°C.

O potencial zeta é uma medida da carga de superfície de uma partícula, sendo suscetível aos tipos de iões em solução e às suas concentrações. A medição do potencial zeta baseia-se na mobilidade eletroforética das partículas resultante da aplicação de um campo elétrico. A carga de superfície é determinada medindo a velocidade do movimento das partículas por um laser de eletroforese doppler que está acoplado ao equipamento referido anteriormente, sendo depois aplicado o modelo Smoluchowski (Ankerhold *et al.*, 2005; Zholkovskij *et al.*, 2007). A medição foi realizada com as partículas suspensas em água a pH 7 e a 25°C.

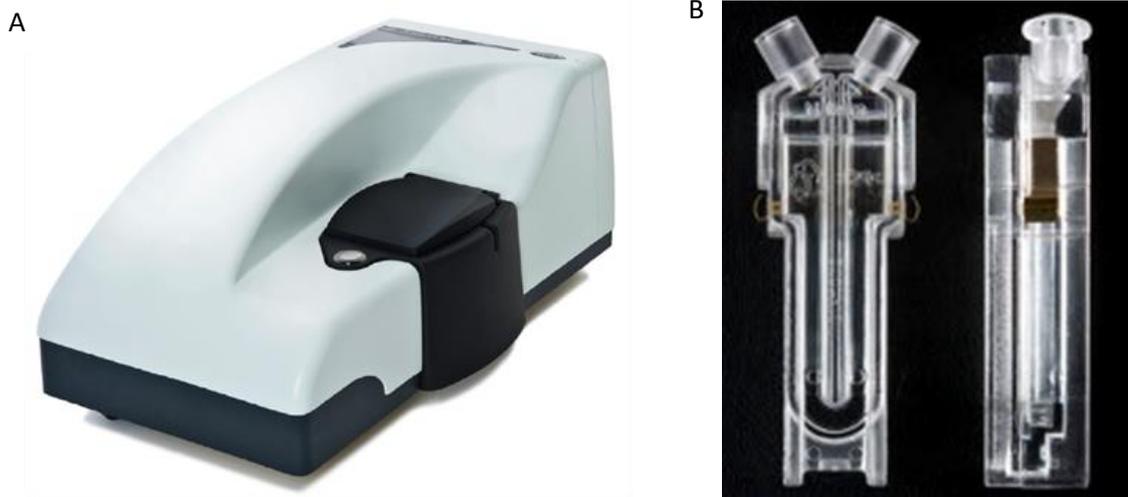


Figura 11 – Equipamento utilizado na análise de DLS e potencial zeta. (A) Equipamento de medição de DLS e ZP (Zetasizer ZS, Malvern Instruments Ltd., UK); (B) Célula para medição de DLS e ZP (DTS1070, Malvern Instruments Ltd., UK).

2.4.2. Quantificação da sonda fluorescente

A quantificação do coumarin-6 foi realizada através do método de fluorimetria. Esta técnica tem por base a incidência de um feixe de luz, a um comprimento de onda específico (comprimento de onda de excitação – λ_{ex}), de forma a absorver energia suficiente para excitar a molécula. Esta energia é posteriormente libertada e detetada a fluorescência a um comprimento de onda também específico e superior ao anterior (comprimento de onda de emissão – λ_{em}) (Marshall & Johnsen, 2017). Para tal, realizou-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de coumarin-6 em DMSO (0; 0,0244; 0,0488; 0,0977; 0,1953; 0,3906; 0,7813; 1,5625; 3,125; 6,25 $\mu\text{g/mL}$), pipetou-se 100 μL das soluções de concentração conhecida, para realização da curva padrão, e das amostras pretendidas para uma placa de 96 poços, adequada para fluorescência, e efetuou-se a leitura num fluorímetro (Fluorimeter SpectraMax Gemini EM Molecular Devices, CA, USA). Partindo de valores da literatura, realizou-se um espectro de excitação e outro de emissão, para aferir os melhores comprimentos de onda a usar, tendo-se determinado para os ensaios de quantificação do coumarin-6 o λ_{ex} de 470 nm e λ_{em} de 510 nm.

Para avaliar a eficiência de encapsulação da sonda (% EE), a suspensão de partículas foi centrifugada para recolha do *pellet* que foi liofilizado e ressuspenso em DMSO, para posterior

quantificação da sonda encapsulada pelas nanopartículas. A fórmula matemática usada, para obtenção do valor pretendido foi a seguinte:

$$(1) \% EE = \frac{\text{massa de sonda encapsulada}}{\text{massa de sonda adicionada}} \times 100$$

2.4.3. Quantificação do fármaco

A quantificação do fármaco foi realizada através do método de espectrofotometria. Esta técnica baseia-se na quantificação da luz absorvida pela amostra (absorvância) após a incidência de um feixe luz a um determinado comprimento de onda. Tendo em consideração que o composto químico apresenta grupos aromáticos na sua composição, realizou-se um espectro de absorção que incluía a zona dos ultravioletas (UV), para aferir o comprimento de onda mais adequado.

Para a quantificação do fármaco, recorreu-se a um espectrofotómetro (Spectrophotometer Spectramax plus 384, Molecular Devices, CA, USA) e a placas de 96 poços, adequadas para leitura na zona dos UV. Realizou-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de sorafenib em DMSO (0; 0,391; 0,781; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/mL), pipetou-se 100 µL das soluções de concentração conhecida, para realização da curva padrão, e das amostras pretendidas, e fez-se a leitura a um comprimento de onda de 275 nm.



Figura 12 – Espectrofotómetro UV/VIS usado para leitura das amostras (Spectrophotometer Spectramax plus 384, Molecular Devices, CA, USA).

Para avaliar a eficiência de encapsulação (% EE) e a capacidade de carga (% CC) foi necessário centrifugar a suspensão de partículas, após a última centrifugação, as partículas foram liofilizadas para se obter a massa e para a quantificação de fármaco encapsulado. As fórmulas matemáticas usadas, para obtenção dos valores pretendidos foram as seguintes:

$$(1) \% EE = \frac{\text{massa de fármaco encapsulado}}{\text{massa de fármaco adicionado}} \times 100$$

$$(2) \% CC = \frac{\text{massa de fármaco encapsulado}}{\text{massa de partículas carregadas}} \times 100$$

2.4.4. Quantificação de aminas quaternárias

A quantificação de aminas quaternárias do CTAB existente à superfície das partículas, permite obter o número de moles de cargas positivas à superfície das NPs, valor importante para definir os rácios para a complexação com o material genético. Este valor foi determinado pela quantificação de CTAB no sobrenadante, através do método de Lowry modificado (Lowry, 1979). Esta metodologia tem como base a interação iónica entre as aminas quaternárias e o azul de bromotimol a pH controlado (Lowry, 1979; El-Khateeb & Abdel-Moety, 1988; Gossmann *et al.*, 2015).

Preparou-se uma curva padrão de concentrações conhecidas de CTAB em água: 0, 25, 50, 100 e 200 µL/mL. A 160 µL de amostra ou curva foram adicionados 25 µL de NaOH (1 M) e colocou-se a incubar, durante 15 minutos a 60°C, sobre agitação. Depois adicionou-se 25 µL de HCl (1 M), 140 µL da solução de azul de bromotimol (600 µg/mL em etanol) e 1650 µL de tampão fosfato a pH 7,5 (0,25 M de iões fosfato: 0,125 M de K₂HPO₄ e 0,125 M de KH₂PO₄), fez-se vórtex da solução e colocou-se a agitar num agitador rotativo, durante 1 hora, à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à quantificação do azul de bromotimol que estava em excesso e não reagiu. Para tal, fez-se uma centrifugação a 13 800 rpm durante 10 minutos (20 000 g; Centrifuge 5417R Eppendorf; rotor de ângulo fixo F-45-30-11, Eppendorf™, DE), recolheu-se o sobrenadante, e realizou-se a leitura das absorvâncias a 610 nm, num espectrofotómetro (Spectrophotometer

Spectramax plus 384, Molecular Devices, CA, USA) (Lowry, 1979; El-Khateeb & Abdel-Moety, 1988; Gossmann *et al.*, 2015). A adição da solução tampão permite que a reação ocorra a pH 7.5, onde o indicador de pH é azul e forma um complexo laranja, quando reage com as aminas quaternárias. Este complexo é eliminado durante a centrifugação.

2.5. Estabilidade da suspensão das partículas

A estabilidade das partículas foi analisada ao longo do tempo com base em quatro parâmetros diferentes: o diâmetro médio hidrodinâmico, o índice de polidispersão (PDI), o potencial zeta e a quantidade de fármaco encapsulado. Após obtidas as partículas, a suspensão foi aliqüotada e armazenada em duas condições diferentes: a -20°C e a 4°C. As aliqüotas continham o volume desejado para cada ponto da leitura, esta questão é mais crítica nas amostras que estão congeladas, pois pretendia-se evitar descongelar a amostra na totalidade, desta forma apenas eram descongelados os *ependorfs* necessários para os diferentes ensaios desse dia. Os diferentes parâmetros foram avaliados, utilizando as metodologias descritas nos pontos anteriores, nos tempos: 0 (após a obtenção das partículas), 7, 15, 30 e 60 dias.

Para além da avaliação da estabilidade da suspensão das partículas, também foi realizada a liofilização das mesmas. Após o término do tempo de evaporação, aliqüotou-se, congelou-se a -80°C, colocou-se no liofilizador que está a -54°C e ligou-se o vácuo, a liofilização decorreu durante 16 horas. A liofilização baseia-se na eliminação do solvente através da sublimação do mesmo, recorrendo a temperaturas e pressões baixas.

2.6. Preparação dos complexos

Preparou-se uma solução de plasmídeo de ADN, que contém o gene que codifica para a proteína verde fluorescente (pGFP), e determinou-se a sua concentração utilizando o NanoDrop (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometers, ThermoFisher, DE).

As nanopartículas foram diluídas em água Milli-Q, a diferentes concentrações, de acordo com as razões de carga partículas/pADN (+/-) pretendidas, e adicionou-se 1 µg de pGFP, de forma a manter constante a quantidade e concentração de ADN na mistura. Após a adição do plasmídeo,

as amostras foram gentilmente homogeneizadas/agitadas e incubadas à temperatura ambiente, durante 15 minutos, para permitir a formação dos complexos. Os diferentes ensaios foram realizados imediatamente a seguir.

Neste estudo testou-se as seguintes razões de carga [partículas/ADN (+/-)]: 1/2, 2/1, 4/1, 8/1, 10/1 e 25/1.

2.7. Caracterização dos complexos

2.7.1. Ensaio de intercalação do brometo de etídio

A condensação e proteção do material genético conferida pelos complexos formados foi analisada através do ensaio de intercalação do brometo de etídio (EtBr). O EtBr é uma molécula catiónica monovalente com a capacidade de intercalar com o material genético. Ao fazê-lo, emite muito mais fluorescência, podendo avaliar-se a condensação/proteção do material genético conferida pelos complexos através da quantificação da fluorescência emitida.

Preparou-se os complexos como referido no ponto 2.6, pipetou-se 100 µL de cada amostra em triplicado para uma placa de 96 poços preta, adicionou-se 100 µL de uma solução de EtBr a 800 nM, de forma a que o EtBr no poço esteja a uma concentração de 400 nM, tendo cada poço 0,5 µg de ADN. Deixou-se incubar durante 10 minutos e mediu-se a fluorescência no fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, CA, USA) utilizando o λ_{ex} de 518 nm e λ_{em} de 605 nm. Como branco, ou seja, para medir a fluorescência residual do EtBr foi adicionado, em vez de amostra, 100 µL da água Milli-Q usada para preparar os complexos. O valor de fluorescência máximo é correspondente ao ADN livre (0,5 µg de ADN), pois desta forma o ADN está completamente acessível ao EtBr, considerando-se este como o controlo (100%). Os resultados são apresentados em termos de percentagem de acesso do EtBr ao controlo (ADN livre), após subtração do valor de fluorescência residual aos valores obtidos para as amostras e controlo.

2.7.2. Ensaio de eletroforese em gel de agarose – com DNase I

Para avaliar o grau de proteção e condensação do ADN conferida pelos complexos, recorreu-se também a um ensaio de eletroforese em gel de agarose com digestão com a DNase I. Neste caso, após a preparação dos complexos, estes foram incubados com DNase I ativa e inativa, de forma a perceber se o material genético nos complexos estava ou não protegido da degradação enzimática.

Preparou-se um gel de agarose de 1% (m/v), num volume de 90 mL de TBE (89 mM tris-base, 89 mM ácido bórico e 2,5 mM EDTA a pH a 8.6). A mistura foi aquecida até uma completa dissolução da agarose, deixou-se arrefecer ligeiramente e adicionou-se 9 µL de uma solução de EtBr a 1% (m/v), com o intuito de se obter um gel com uma concentração final de EtBr de 1 µg/mL. Homogeneizou-se bem a mistura e verteu-se para um suporte apropriado para fazer o gel com os poços desejados, deixou-se arrefecer até ficar completamente solidificado e colocou-se numa tina de eletroforese com a solução de TBE a cobrir todo o gel. Aliquotou-se 20 µL de cada condição preparada previamente, incluindo de ADN livre na mesma concentração, e adicionou-se 5 µL do *loading buffer* [15% (v/v) de Ficol 400, 0.05% (m/v) de azul bromofenol, 11% (m/v) de SDS e 0,1 M de EDTA a pH 7,8]. Desta mistura, adicionou-se 20 µL de cada amostra ao poço correspondente e deixou-se correr o gel a uma diferença de potencial de 80 V, durante 45 minutos. A análise do gel foi efetuada no equipamento Geldoc (Bio-Rad, USA), recorrendo-se ao software QuantityOne (Bio-Rad, USA).

Para realizar este ensaio, os complexos foram preparados nas diferentes razões de carga e, após os 15 minutos de incubação, aliquotou-se 100 µL de cada condição e submeteu-se ao tratamento com DNase I (10 U/µg de ADN) durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a enzima foi inativada com uma solução de EDTA potássio a 0.5 M (1 mL/U de DNase I). O mesmo procedimento foi realizado com ADN livre. Em paralelo, fez-se a incubação dos complexos com a DNase I previamente inativada. Foram estas amostras que foram usadas depois para adicionar o *loading buffer* e fazer o carregamento dos poços no gel.

2.7.3. Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

Preparou-se os complexos e, após a incubação de 15 minutos, adicionou-se 800 µL de água Milli-Q a pH 7 para se obter volume suficiente para a realização do ensaio. O ensaio, na sua totalidade, encontra-se descrito no ponto 2.4.1 [Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)].

3. Resultados e discussão

Nesta secção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo deste projeto. Começando pela caracterização físico-química das partículas, não carregadas e carregadas, e sua estabilidade ao longo do tempo. Posteriormente, serão apresentados os resultados referentes à capacidade de proteção do material genético conferida pelas nanopartículas.

Esta secção do trabalho será dividida em duas partes pois foram realizados dois procedimentos diferentes para a produção das partículas. Deste modo serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao Protocolo 1 e posteriormente ao Protocolo 2.

3.1. Protocolo 1

3.1.1. Caracterização físico-química das partículas

Como referido anteriormente, a produção das nanopartículas realizou-se através da adaptação do método de nanoprecipitação descrito por Barichello e colaboradores para o polímero em estudo, pois os autores usaram o polímero PLGA no seu trabalho e, por isso, foram necessárias algumas otimizações do protocolo (Barichello *et al.*, 1999). Entre as diferentes formulações, as modificações realizadas tiveram em conta os resultados obtidos para o diâmetro médio e potencial zeta.

Para a produção das nanopartículas foram preparadas duas soluções: a fase aquosa, que continha 8% (m/v) de CTAB, e a fase orgânica, que continha uma concentração de polímero de 2,5 mg/mL. Nas primeiras duas formulações, usou-se 10 mL da solução aquosa e adicionou-se 2 mL da fase orgânica, ambas foram realizadas em duplicado. Para as formulações seguintes, realizou-se um aumento de escala para o dobro, com o intuito de no final se obter o dobro da massa de partículas. As condições usadas na preparação das diferentes formulações estão apresentadas na Tabela 3.

Em duas formulações independentes, realizou-se uma centrifugação adicional, de forma a adicionar uma lavagem às partículas e remover o excesso de surfactante ainda existente.

Tabela 3 – Resumo das condições das diferentes formulações (Protocolo 1).

Formulação	Fase aquosa		Fase orgânica				Tempo de evaporação	Centrifugações	
	% (m/v) CTAB	Volume (mL)	[PCL] (mg/mL)	m (PCL) (mg)	Volume (mL)	Coumarin-6 ou Sorafenib		1ª centrifugação	2ª centrifugação
PCL 1.1	8	10	2,5	5	2	-	4 horas	2000 g x 5 min	9000 g x 1 h
PCL 1.2	8	10	2,5	5	2	-	4 horas	2000 g x 5 min	20 000 g x 1 h
PCL 1.3	8	20	2,5	10	4	-	4 horas	2000 g x 5 min	20 000 g x 1 h
PCL 1.4	8	20	2,5	10	4	Sorafenib	4 horas	2000 g x 5 min	20 000 g x 1 h
PCL 1.5	8	20	2,5	10	4	-	4 horas	2000 g x 5 min	40 000 g x 1 h
PCL 1.6	8	20	2,5	10	4	-	16 horas	2000 g x 5 min	25 000 g x 1 h
PCL 1.7	8	20	2,5	10	4	-	24 horas	2000 g x 5 min	25 000 g x 1 h
PCL 1.8	8	20	2,5	10	4	Coumarin-6	24 horas	2000 g x 5 min	25 000 g x 1 h

Relativamente à primeira formulação (PCL 1.1), verificou-se que as partículas apresentavam um tamanho hidrodinâmico médio de aproximadamente 150 nm, com uma carga superficial manifestamente positiva (superior a +50 mV). No entanto, aquando da recolha das partículas, percebeu-se que a força centrífuga usada não tinha sido suficiente, pois o sobrenadante ainda continha partículas. Para aumentar a quantidade de partículas recolhidas, na segunda preparação (PCL 1.2) aumentou-se a força centrífuga da 2ª centrifugação, resultando numa redução do tamanho médio hidrodinâmico das nanopartículas. Esta observação pode ser explicada pelo facto de na formulação anterior (PCL 1.1) algumas partículas mais pequenas não terem sedimentado, pois apresentam uma massa diferente e necessitam de sofrer uma força centrífuga superior para serem recolhidas. Na segunda formulação (PCL 1.2) obteve-se partículas com um diâmetro médio de 125 nm e potencial zeta de +50 mV (Figura 13).

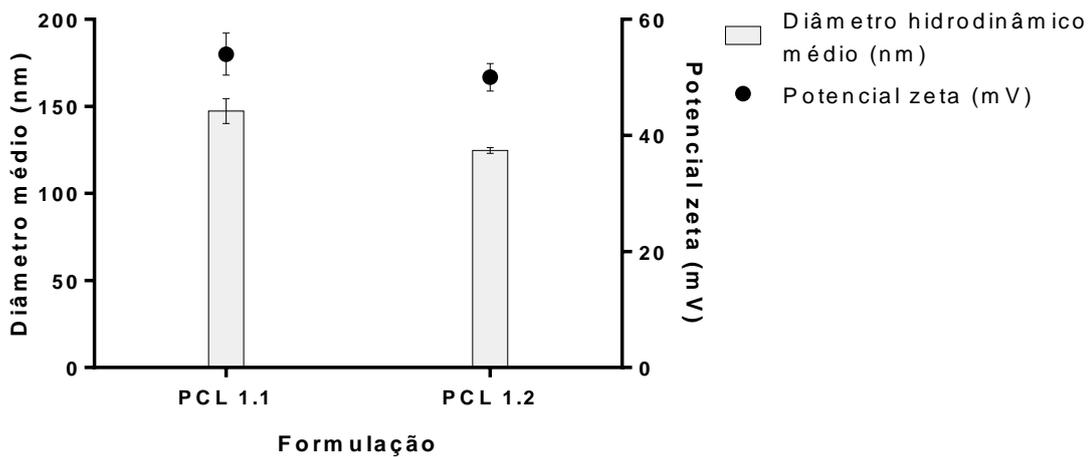


Figura 13 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 1.1 e PCL 1.2 (Protocolo 1). Estas formulações foram preparadas nas mesmas condições com a exceção da última centrifugação, que na formulação PCL 1.2 foi realizada com uma força centrífuga superior. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Tendo em conta que estas formulações foram desenvolvidas para transportar fármaco e material genético, considerou-se que o tamanho e o potencial zeta das mesmas era adequado. Por forma a diminuir o número de sínteses a realizar, para se obter uma quantidade suficiente de partículas, realizou-se um aumento de escala, neste caso para o dobro, para aumentar a massa de partículas produzidas em cada formulação. Analisando os resultados apresentados na Figura 14, verifica-se que aumentando a escala se obtêm partículas com as mesmas dimensões e com um potencial zeta ligeiramente superior (+60 mV). Tendo em conta o tamanho e a carga superficial obtidos, foi

produzida uma quarta formulação desta vez com fármaco (PCL 1.4). Desta forma foi possível verificar se a incorporação do fármaco alterava as características físico-químicas da formulação e, por outro lado, analisar a eficiência de encapsulação e a capacidade de carga das nanopartículas.

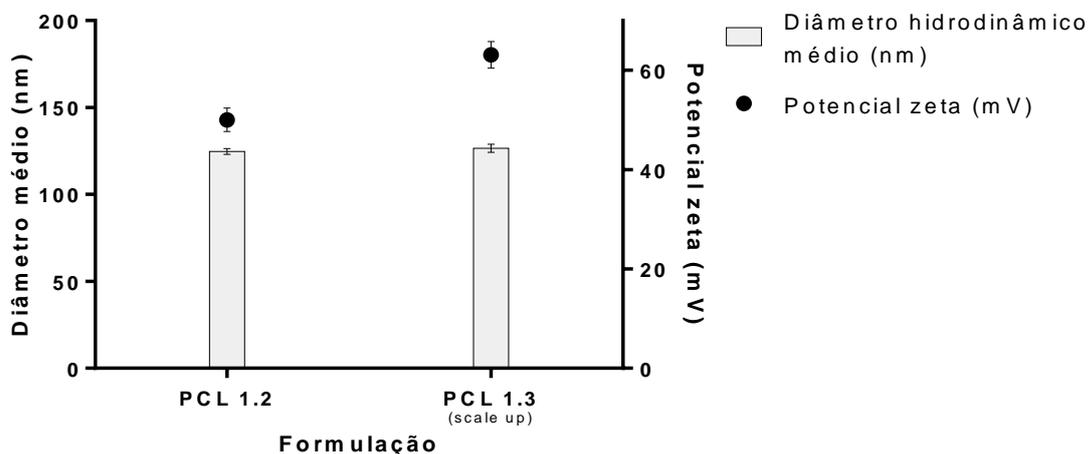


Figura 14 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 1.2 e PCL 1.3 (Protocolo 1). Estas formulações foram preparadas nas mesmas condições, no entanto, a formulação PCL 1.3 corresponde a um aumento da escala para o dobro, de forma a obter-se mais partículas por cada síntese. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

A formulação PCL 1.3 e PCL 1.4 são semelhantes, a única diferença é que na formulação PCL 1.4 foi adicionado fármaco à fase orgânica para proceder à sua encapsulação. Os resultados apresentados no gráfico permitem verificar que tanto o diâmetro médio como o potencial zeta se mantêm constantes, não sendo alterados com a encapsulação do fármaco (Figura 15). No entanto, quando foi quantificado o fármaco encapsulado, verificou-se que o valor era muito baixo, aproximadamente 4,5% de EE, o que não era expectável, uma vez que está descrito que o método de nanoprecipitação apresenta boa eficiência de encapsulação de fármacos hidrofóbicos, que é o caso do fármaco usado (Neves *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015).

Adicionalmente, aquando da recolha das nanopartículas destas duas formulações, a eficiência de recolha foi reduzida, possivelmente devido à sedimentação incompleta que levou à eliminação de partículas aquando do descarte do sobrenadante, tendo-se produzido as formulações PCL 1.5 e PCL 1.6 onde se aplicaram duas forças centrífugas diferentes. Relativamente à formulação PCL 1.5, não são apresentados resultados, uma vez que a força centrífuga foi excessiva, tendo resultado na formação de agregados de partículas que impossibilitaram a sua análise. Após a produção da

formulação PCL 1.5 e antes de avançar para a PCL 1.6, percebeu-se que o solvente orgânico adicionado à solução não tinha sido completamente evaporado, nas formulações anteriores, e que podia ser uma das hipóteses para a baixa encapsulação de fármaco, sendo a outra hipótese o facto de haver micelas na fase aquosa e o fármaco ficar retido nas mesmas. Deste modo, considerou-se importante aumentar o tempo de evaporação para 16 horas que, até ao momento, tinha sido sempre de 4 horas. Na formulação PCL 1.6, foi aumentado o tempo de evaporação para as 16 horas e fez-se uma centrifugação de 25 000 g, ligeiramente superior às primeiras (20 000 g), tendo-se obtido resultados de diâmetro médio semelhantes, mas um potencial zeta inferior ao obtido com as formulações PCL 1.3 e PCL 1.4. Este resultado pode ser devido a uma melhor separação entre o *pellet* e o sobrenadante, removendo-se assim com maior eficiência o surfactante (que confere carga positiva às partículas). Mesmo com esta alteração de protocolo verificou-se a existência de vestígios de solvente orgânico. Deste modo, preparou-se a formulação PCL 1.7, que é em tudo igual à PCL 1.6, com exceção do tempo de evaporação que passou para as 24 horas. Após terminar esse período, verificou-se que o problema do solvente orgânico tinha sido resolvido e que os resultados, em termos de caracterização físico-química, eram semelhantes aos obtidos com a formulação PCL 1.6 (Figura 15).

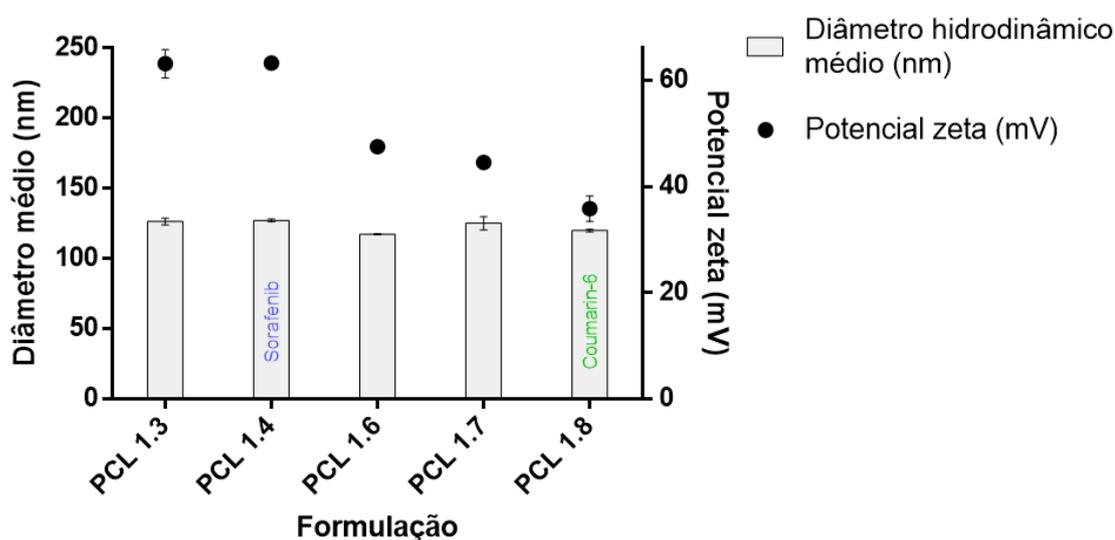


Figura 15 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 1.3, PCL 1.4, PCL 1.5, PCL 1.6, PCL 1.7 e PCL 1.8 (Protocolo 1). As formulações PCL 1.3 e PCL 1.4 foram preparadas usando o mesmo protocolo, mas a PCL 1.4 foi preparada na presença de fármaco. Na formulação PCL 1.6 e PCL 1.7 foram testados diferentes tempos de evaporação do solvente orgânico. A formulação PCL 1.8, é semelhante à formulação PCL 1.7, no entanto, foi adicionada uma sonda fluorescente (coumarin-6). Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Como referido anteriormente, era importante realizar uma centrifugação extra para eliminar o possível surfactante que se encontrasse em excesso no sobrenadante. Nesse sentido, realizaram-se diferentes centrifugações, tendo sido considerada a melhor opção a centrifugação a 25 000 g, durante 15 minutos, a 4°C (formulação PCL 1.7). Os resultados obtidos mostram que apesar do diâmetro médio ser semelhante, o potencial zeta sofreu uma ligeira diminuição, possivelmente devido à eliminação de surfactante (Figura 16). No entanto, a eficiência de recolha das partículas foi baixa, tendo, por isso, sido testadas centrifugações adicionais, realizadas durante mais tempo ou com uma força centrífuga superior. Contudo, verificou-se ser difícil ressuspender o *pellet* e o potencial zeta ficou negativo, devido muito provavelmente ao facto do surfactante não estar ligado covalentemente às partículas e ser removido em condições de centrifugação mais intensas. Deste modo, a centrifugação adicional não foi incluída no procedimento de recolha das partículas.

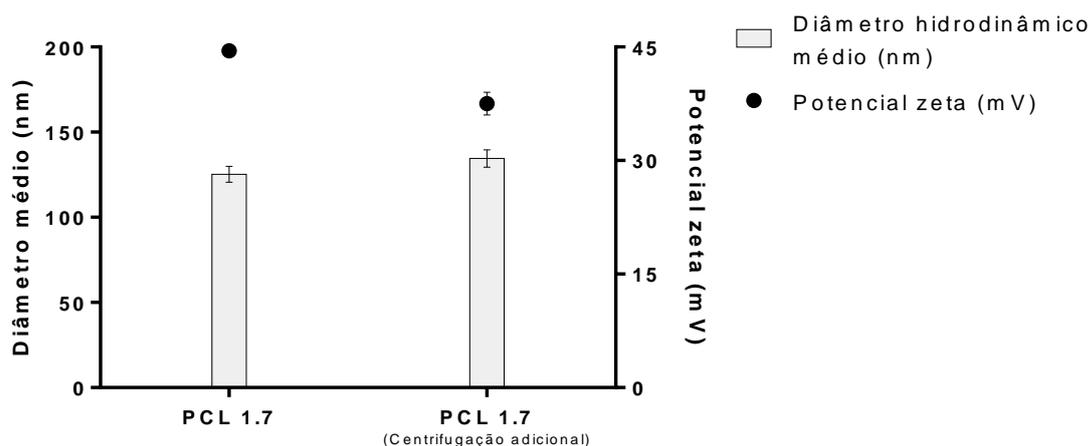


Figura 16 – Tamanho e potencial zeta da formulação PCL 1.7 antes e após a centrifugação adicional (Protocolo 1). Após a primeira centrifugação, o *pellet* foi ressuspensionado, e fez-se uma centrifugação adicional a 25 000 g durante 15 minutos, a 4°C, que corresponde aos dados da coluna da direita. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Otimizado o protocolo de produção das partículas, seguiu-se para a encapsulação. Neste caso, foi usada uma sonda fluorescente, o coumarin-6, pois é de fácil quantificação e como apresenta cor verde é possível analisar qualitativamente se houve ou não encapsulação. Esta é a formulação PCL 1.8, que foi realizada nas mesmas condições da formulação PCL 1.7, mas com a adição da sonda fluorescente à fase orgânica. Podemos verificar, pelos resultados apresentados na Figura 15, que o diâmetro médio se mantém e existe uma ligeira redução do potencial zeta.

Contudo, relativamente à eficiência de encapsulação da sonda, verificou-se que a % de EE foi inferior a 1%, colocando-se assim a hipótese de que os compostos hidrofóbicos possivelmente ficavam retidos nas micelas de surfactante, que se encontravam na solução aquosa, em vez de ficarem retidos no interior das nanopartículas.

Tabela 4 – Resumo dos valores de Pdl de todas as formulações (Protocolo 1).

Formulação	Pdl
PCL 1.1	0,111
PCL 1.2	0,083
PCL 1.3	0,100
PCL 1.4	0,072
PCL 1.5	-
PCL 1.6	0,072
PCL 1.7	0,077
PCL 1.8	0,085

Por outro lado, a análise do índice de polidispersão (Pdl) das várias preparações de nanopartículas (Tabela 4) mostrou que este parâmetro não apresentava diferenças significativas entre as diferentes formulações, sendo que o valor mais elevado que foi registado foi de 0.111, o que indica que as amostras obtidas com as diferentes condições de preparação eram homogéneas (Tabela 4) (Figura 17).

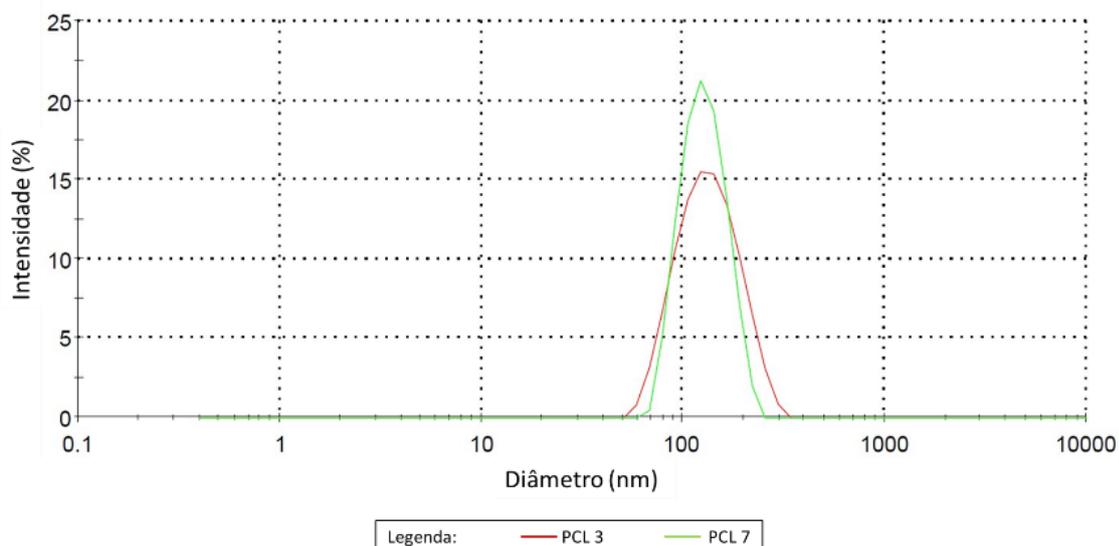


Figura 17 – Diferença entre as curvas de distribuição de tamanho das preparações PCL 1.3 e PCL 1.7 (Protocolo 1). Ambas as formulações apresentam o mesmo valor de diâmetro hidrodinâmico médio e um índice de polidispersão (Pdl) semelhante.

Este protocolo mostrou ser reprodutível em termos de tamanho médio e potencial zeta das nanopartículas obtidas. No entanto, o objetivo deste projeto era desenvolver partículas que tivessem capacidade de transportar ácidos nucleicos e um fármaco hidrofóbico com potencial antitumoral, o que não se verificou, provavelmente porque o fármaco ficou retido nas micelas de surfactante, que foram posteriormente removidas por centrifugação. Tendo em conta estes factos, testou-se um novo protocolo para preparação das nanopartículas, sendo que os resultados obtidos serão apresentados e discutidos no ponto seguinte.

3.2. Protocolo 2

3.2.1. Caracterização físico-química das partículas

O novo protocolo teve como base o mesmo método mas com uma abordagem diferente, o surfactante foi adicionado, em quantidades muito inferiores, na fase orgânica junto com o polímero, e não na fase aquosa (Barichello *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2012). Com esta nova abordagem, na fase orgânica passaram a existir micelas invertidas de surfactante que, no entanto,

deixam de existir após a adição à solução aquosa, devido à concentração do surfactante ser inferior à sua concentração micelar crítica (0,92 mM). Esta nova abordagem foi adotada na tentativa de resolver o problema da baixa taxa de encapsulação de fármaco verificada com o protocolo anterior.

Neste protocolo, a fase orgânica continha os solventes etanol e acetona na proporção de 1:1, o polímero PCL, o surfactante CTAB e, quando desejado, continha também o fármaco ou sonda, sendo que esta solução era injetada gota a gota em água Milli-Q. As condições das várias formulações produzidas estão apresentadas na Tabela 5, tendo-se averiguado a reprodutibilidade do protocolo. As formulações foram produzidas com a sonda hidrofóbica, de forma a garantir que, durante o procedimento de otimização, as partículas tinham capacidade de encapsular compostos hidrofóbicos, e só depois se prepararam as nanopartículas com fármaco. Durante o procedimento de otimização, os parâmetros avaliados foram: o diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersão (PDI), o potencial zeta e a % de EE da sonda fluorescente (coumarin-6).

Tabela 5 – Resumo das condições das diferentes formulações (Protocolo 2).

Formulação	Fase aquosa	Fase orgânica			Coumarin-6 ou Sorafenib	Tempo de evaporação
	Volume (mL)	[PCL] (mg/mL)	m (PCL) (mg)	Volume (mL)		
PCL 2.1	20	17	34	2	-	16 horas
PCL 2.2	20	17	34	2	Coumarin-6	16 horas
PCL 2.3	20	17	34	2	Coumarin-6	24 horas
PCL 2.4	20	10	20	2	Coumarin-6	24 horas
PCL 2.5	20	10	20	2	-	24 horas
PCL 2.6	20	10	20	2	Sorafenib	24 horas

3.2.1.1. Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

Como referido anteriormente, realizou-se uma formulação com base no protocolo desenvolvido por Neves e colaboradores (Neves *et al.*, 2012), que corresponde à formulação PCL 2.1. Nesta primeira formulação (PCL 2.1), obteve-se partículas com um diâmetro hidrodinâmico médio de cerca de 180 nm e um potencial zeta superior a +50 mV (Figura 18), de acordo com os resultados apresentados no artigo referenciado (Neves *et al.*, 2012).

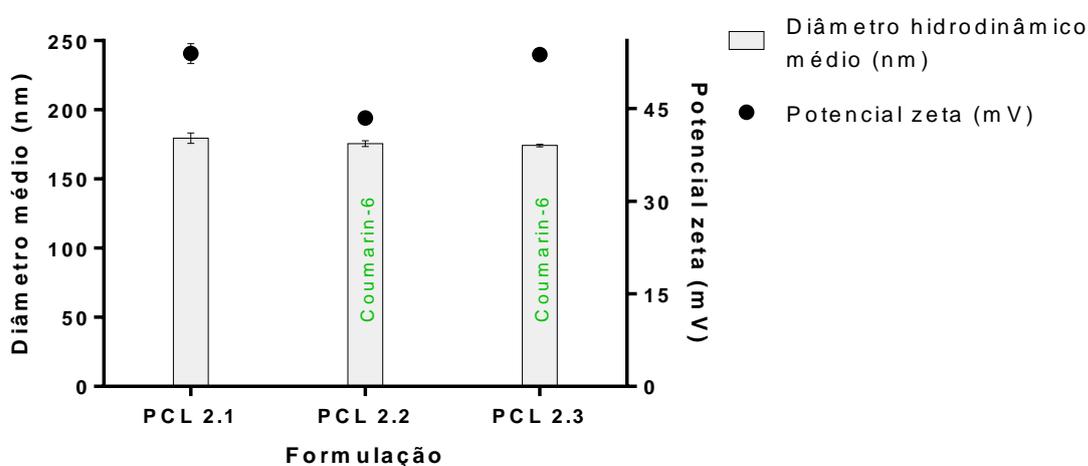


Figura 18 – Tamanho e potencial zeta da formulação PCL 2.1, PCL 2.2 e PCL 2.3 (Protocolo 2). A segunda formulação difere da primeira uma vez que foi adicionado uma sonda fluorescente à mesma (coumarin-6). A formulação PCL 2.3 difere da segunda no tempo de agitação, para evaporação do solvente orgânico, 24 horas neste caso. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Para perceber se as partículas tinham capacidade de encapsular compostos hidrofóbicos, foi usado o coumarin-6 em algumas formulações, como é o caso da formulação PCL 2.2. Esta formulação é igual à anterior (PCL 2.1) à exceção da adição da sonda fluorescente, tendo-se obtido um valor semelhante de tamanho médio das partículas e uma ligeira diminuição do potencial zeta, mantendo-se, no entanto, substancialmente positivo. Percebeu-se que as 16 horas podiam não ser suficientes para eliminação completa do solvente orgânico, por isso, produziu-se a formulação PCL 2.3, onde se aumentou o tempo de evaporação para 24 horas. Em termos de resultados de tamanho médio e potencial zeta mantiveram-se semelhantes às duas formulações anteriores, particularmente à formulação PCL 2.1.

No entanto, estas partículas apresentavam um diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 180 nm. Sabendo que ainda seria adicionado fármaco às mesmas e complexado material genético, o que provavelmente iria resultar num aumento do tamanho das partículas, tentou-se modificar o protocolo de produção por forma a que as partículas tivessem um diâmetro inferior. Para atingir este objetivo, diminuiu-se a concentração do polímero no solvente orgânico, de modo a tentar que as partículas se formassem com um diâmetro ligeiramente inferior, o que se verificou com a formulação PCL 2.4. A Figura 19 compara os resultados obtidos para duas formulações semelhantes, onde apenas se reduziu a massa de polímero adicionado ao solvente orgânico e, conseqüentemente, a massa de surfactante para se manter o rácio entre estes dois compostos. Tal como se pode verificar, esta alteração resultou numa diminuição do diâmetro médio hidrodinâmico de 180 nm para um tamanho ligeiramente inferior a 150 nm, acompanhada de uma ligeira diminuição do potencial zeta de +54 mV para +47 mV.

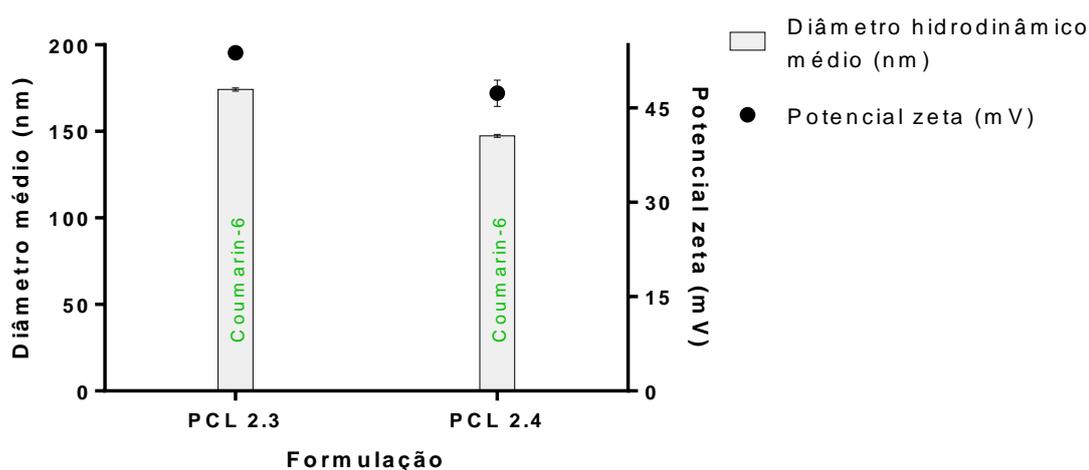


Figura 19 – Tamanho e potencial zeta da formulação PCL 2.3 e PCL 2.4 (Protocolo 2). Na formulação PCL 2.4 foi usada uma concentração de polímero inferior à usada na PCL 2.3 na tentativa de diminuir o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Como referido anteriormente, estas formulações foram produzidas com uma sonda fluorescente no sentido de se poder confirmar se as partículas conseguiriam encapsular o fármaco com elevada eficiência, o que se acabou por verificar, tal como será discutido no ponto 3.2.1.2. Considerando um diâmetro médio de aproximadamente 150 nm, partiu-se então para a formação de partículas nestas condições, mas vazias (formulação PCL 2.5), tendo-se verificado os mesmos resultados do que a mesma formulação com sonda (Figura 20). O passo seguinte, consistiu em verificar as

características da formulação com o fármaco, incluindo a eficiência de encapsulação. Tal como é possível constatar pelos resultados apresentados na Figura 20, esta formulação (PCL 2.6) apresentou um diâmetro hidrodinâmico médio e um potencial zeta semelhante às formulações anteriores, mostrando que o processo de encapsulação do fármaco não alterou de forma significativa as suas propriedades físico-químicas.

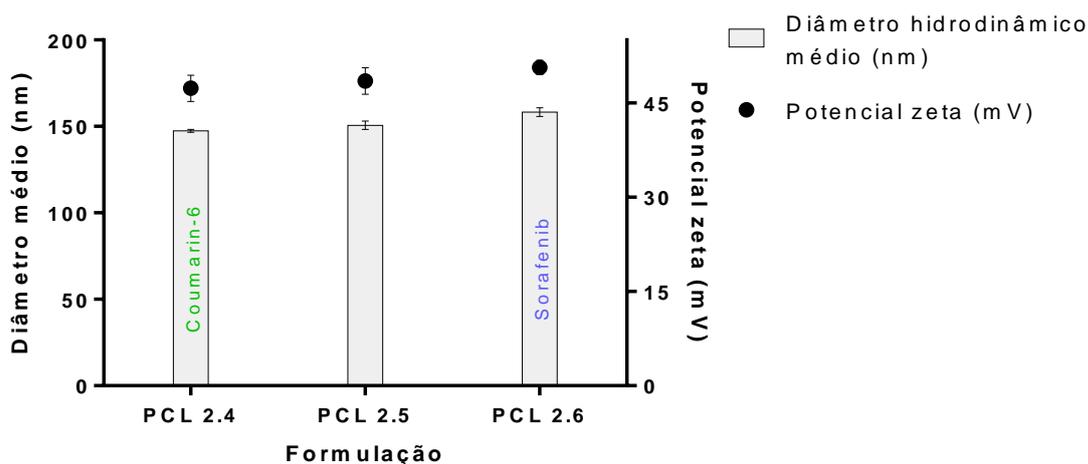


Figura 20 – Tamanho e potencial zeta das formulações PCL 2.4, PCL 2.5 e PCL 2.6 (Protocolo 2). As três formulações apresentadas foram realizadas nas mesmas condições, com a exceção do que foi encapsulado. Na formulação PCL 2.4 foi encapsulada a sonda fluorescente (coumarin-6), a formulação PCL 2.5 representa as partículas vazias e a formulação PCL 2.6 foi encapsulado fármaco. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Em algumas formulações, testaram-se diferentes condições de centrifugação para tentar eliminar o possível surfactante em excesso, no entanto não houve sucesso nesse passo, uma vez que se verificou a formação de agregados e, em simultâneo, partículas que não sedimentavam. Para se obter um bom rendimento na sua recolha, era necessário uma força centrífuga elevada, que tornava as partículas inviáveis para uso posterior devido aos agregados de dimensões elevadas (resultados não apresentados). Diminuindo a força centrífuga levava a um rendimento muito baixo de partículas recolhidas, o que também não satisfazia os objetivos. Considerou-se que o surfactante em suspensão era insignificante, porque a quantidade adicionada era bastante baixa. Adicionalmente, decidiu-se usar as partículas sem nenhum processo de separação ou tentativa de homogeneização da população (por exemplo usando a filtração), porque as formulações mostraram ser bastante homogêneas, pois o Pdl foi sempre inferior a 0.130 (Tabela 6).

Tabela 6 – Resumo dos valores de Pdl de todas as formulações (Protocolo 2).

Formulação	Pdl
PCL 2.1	0,126
PCL 2.2	0,083
PCL 2.3	0,130
PCL 2.4	0,119
PCL 2.5	0,114
PCL 2.6	0,117

3.2.1.2. Eficiência de encapsulação do coumarin-6

Como referido acima, várias formulações foram preparadas com uma sonda fluorescente que mimetiza o fármaco e que é fácil de quantificar. Primeiramente, para perceber se o protocolo inicial permitia encapsular compostos hidrofóbicos com elevada eficiência e, em seguida, para verificar se a % EE era alterada quando realizadas alterações ao procedimento. Foram produzidas três formulações com sonda fluorescente (formulação PCL 2.2, PCL 2.3 e PCL 2.4). Na formulação PCL 2.2, verificou-se que o sobrenadante estava límpido e as partículas com uma coloração intensa verde (cor da sonda), ou seja, que tinha existido encapsulação. No entanto, como se tinha percebido que era necessário aumentar o tempo de evaporação do solvente orgânico, não foi realizada uma análise quantitativa da % EE nesta formulação (16 horas, sob agitação magnética). Preparou-se assim a formulação PCL 2.3, com mais tempo de agitação (24 horas) para garantir a evaporação do solvente orgânico. Realizou-se uma curva padrão, tal como se pode verificar pela Figura 21, e efetuou-se a quantificação da sonda para se proceder aos cálculos de % EE, tendo-se determinado um valor de encapsulação de aproximadamente 94% (Figura 22). No entanto, este valor parecia poder ser melhorado se fosse usada uma força de centrifugação superior, de forma a garantir que não ficavam partículas no sobrenadante, o que foi tido em conta nas formulações seguintes, tanto para a quantificação da sonda como para o fármaco.

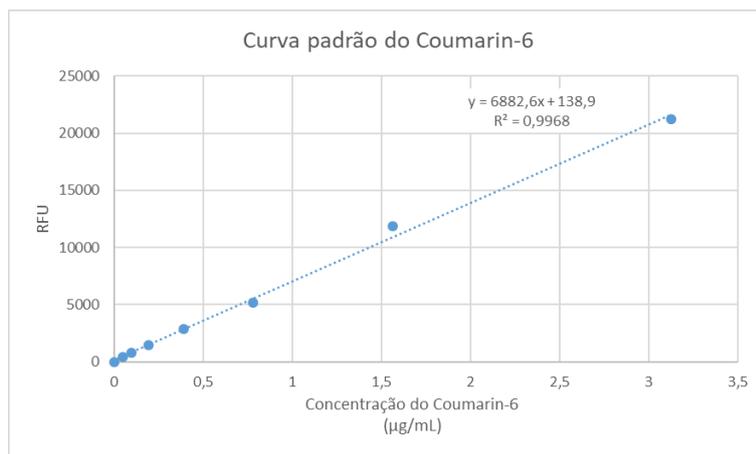


Figura 21 – Curva padrão do coumarin-6 determinada por fluorescência. Curva realizada em DMSO. Pontos da curva: 0; 0,0244; 0,0488; 0,0977; 0,1953; 0,3906; 0,7813; 1,5625; 3,125 µg/mL.

Com a formulação PCL 2.4, que foi produzida com a finalidade de diminuir o tamanho das partículas, tal como discutido anteriormente, verificou-se que o valor da % EE aumentou ligeiramente, o que possivelmente se deveu a uma melhor recolha das nanopartículas durante a centrifugação. Na formulação PCL 2.4, a média das duas sínteses deu um valor de 99,75% de eficiência de encapsulação (Figura 22), valor superior aos valores apresentados na literatura (Neves *et al.*, 2011).

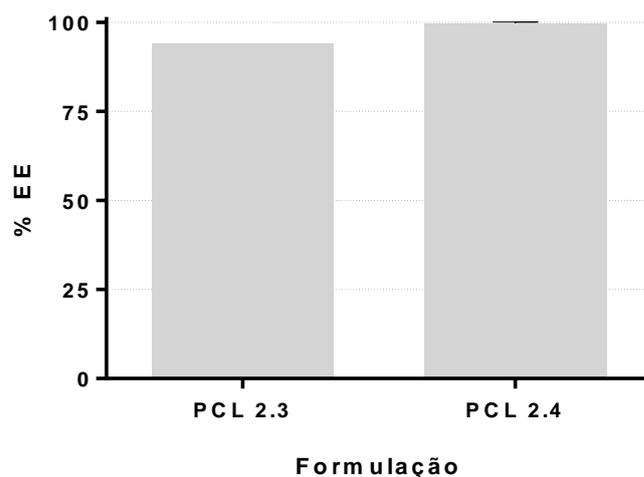


Figura 22 – Eficiência de encapsulação da sonda fluorescente (coumarin-6). Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Os resultados obtidos mostram que a formulação PCL 2.4 apresenta um diâmetro hidrodinâmico e um potencial zeta adequados, e uma eficiência de encapsulação elevada, justificando a utilização deste protocolo na tentativa de encapsulação do fármaco.

3.2.1.3. Eficiência de encapsulação de sorafenib e capacidade de carga das nanopartículas

Otimizado o protocolo da produção das nanopartículas, realizou-se o protocolo de forma igual mas desta vez com o fármaco em estudo. Tal como se pode verificar pelos resultados apresentados na Figura 23, o valor de % EE é elevado, tendo sido sempre superior a 96% e não apresentando diferenças significativas entre as diferentes sínteses, de referir que em uma das réplicas a % EE é de 98,3%. Também a capacidade de carga (% CC) foi constante, nas diferentes sínteses realizadas, oscilando entre 9,9% e 10,0%. Os resultados de % EE deste projeto, são superiores aos encontrados na literatura (Neves *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2019). Os resultados de % CC são da mesma ordem de grandeza de alguns estudos encontrados na literatura (Neves *et al.*, 2011), havendo outros estudos em que o valor obtido neste projeto é muito superior (Pinto *et al.*, 2019). No entanto, esse valor pode possivelmente ser aumentado, alterando a razão polímero/fármaco no sentido de aumentar a quantidade de fármaco usado na formulação. Seria necessário realizar ensaios nesse sentido, pois existe a possibilidade das partículas já estarem na sua máxima capacidade de encapsulação de fármaco. Por outro lado, este aumento da quantidade de fármaco inicial, face à quantidade de polímero, pode levar a uma diminuição da % de EE. Estes dois parâmetros estão muito dependentes do rácio polímero/fármaco usado na formulação, e por vezes, tentar aumentar a % CC leva a uma diminuição significativa da % EE. Os resultados obtidos mostram que ambos os valores, % EE e % CC, são muito promissores, o que faz destas partículas excelentes nanossistemas para encapsular fármacos hidrofóbicos, como o sorafenib.

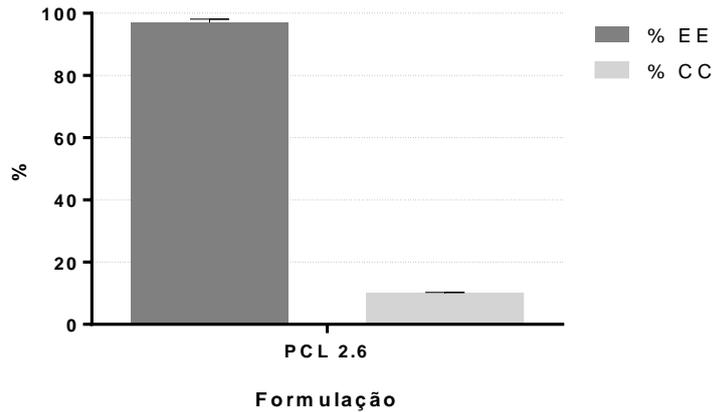


Figura 23 – Eficiência de encapsulação e capacidade de carga de sorafenib. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

3.2.1.4. Estabilidade da suspensão de partículas ao longo do tempo

Um outro parâmetro de grande importância é a estabilidade das partículas, ou seja, o tempo durante o qual as partículas mantêm as suas características como seja, o diâmetro médio, o Pdl, o potencial zeta e a quantidade de fármaco encapsulada. Este parâmetro é de elevada importância do ponto de vista de uma possível aplicação clínica, pois é fundamental perceber se as formulações são estáveis e se existe necessidade de as armazenar congeladas, para elas manterem as suas características, ou se é suficiente armazenar a 4°C. Para realizar este estudo, algumas formulações foram armazenadas a 4°C e a -20°C. Foram avaliadas as características referidas no dia de obtenção das partículas (dia 0) e nos dias 7, 14, 30 e 60.

As condições de armazenamento, correspondentes a cada formulação, estão resumidas Tabela 7.

Tabela 7 – Resumo das condições de armazenamento das diferentes formulações usadas para os ensaios de estabilidade ao longo do tempo.

Formulação	Composto encapsulado	Armazenamento	
		-20°C	4°C
PCL 2.5	-	Sim	Sim
PCL 2.6	Sorafenib	Sim	Sim

A formulação PCL 2.5 corresponde a partículas vazias, enquanto que a formulação PCL 2.6 corresponde à formulação com fármaco. As formulações em estudo (PCL 2.5 e PCL 2.6) foram divididas em duas partes, uma parte foi armazenada a 4°C e a outra parte foi armazenada a -20°C. Na formulação PCL 2.5 foram realizadas alíquotas apenas para a leitura do tamanho médio e do potencial zeta das nanopartícula. Enquanto que na formulação PCL 2.6, para além das alíquotas para o tamanho médio e potencial zeta das nanopartículas, alíquotou-se também amostra para a quantificação do fármaco.

3.2.1.4.1. Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

As amostras armazenadas a 4°C apresentaram valores de diâmetro hidrodinâmico médio e de potencial zeta constantes ao longo de 60 dias, tal como se pode verificar pelos resultados apresentados na Figura 24, mostrando que as nanopartículas desenvolvidos são estáveis nestas condições de armazenamento. Também é importante referir que o parâmetro que avalia o nível de homogeneidade das formulações (Pdl), como seria de esperar pelos resultados anteriores, também se manteve constante ao longo do tempo (Figura 25). As mesmas observações foram verificadas aquando do armazenamento a -20°C (Figura 26 e Figura 27).

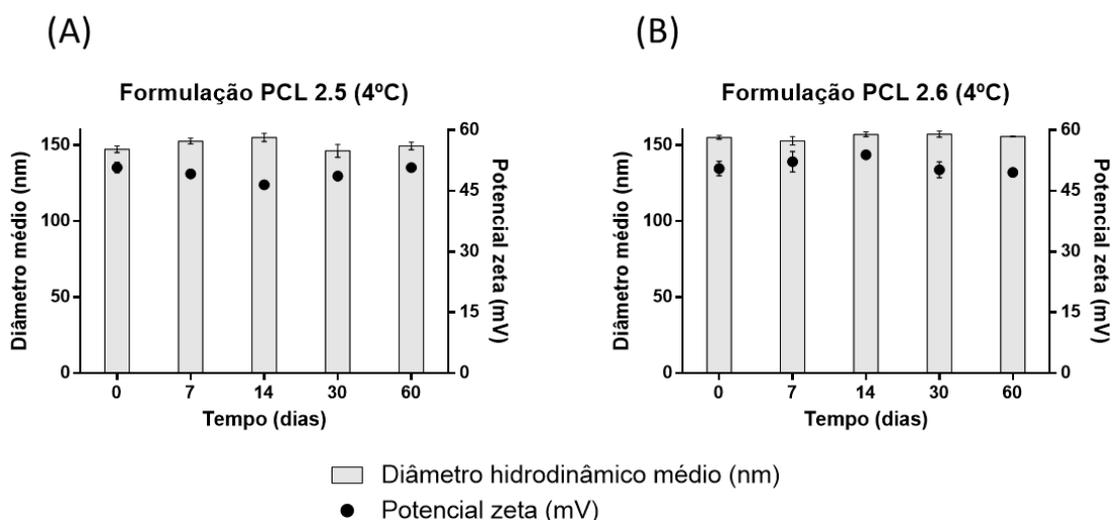


Figura 24 – Tamanho e potencial zeta das nanopartículas ao longo do tempo. Foram realizadas análises de diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta das partículas armazenadas a 4°C ao longo de 60 dias, nos diferentes tempos: 0, 7, 14, 30 e 60 dias. (A) corresponde a formulação de partículas vazias. (B) é correspondente a partículas que contêm fármaco encapsulado. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

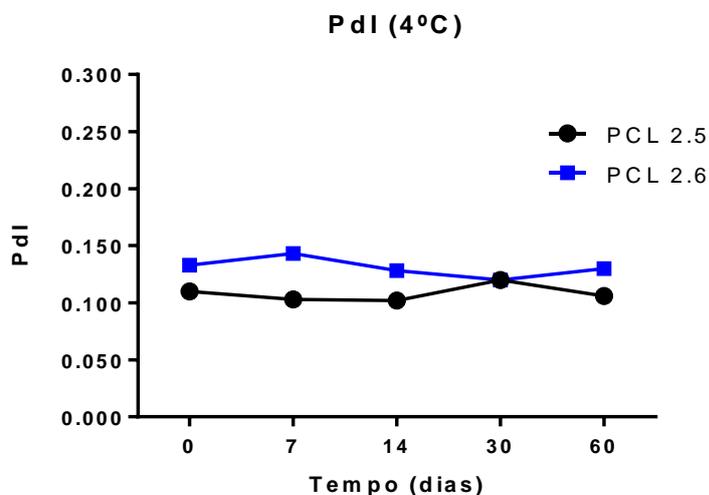


Figura 25 – Índice de polidispersão (PdI) das formulações ao longo do tempo. As amostras foram armazenadas a 4°C.

Ao contrário do verificado na literatura, onde o PdI das formulações de nanopartículas, produzidas com a mesma metodologia, sofre um ligeiro aumento, após o armazenamento de 7 dias, que se acentua bastante ao longo do tempo (Neves *et al.*, 2013), as formulações desenvolvidas no presente trabalho apresentaram um PdI constante, tendo-se apenas verificado um ligeiro aumento, no tempo de 30 dias, na amostra com fármaco armazenado a -20°C (Figura 27). As

amostras mostraram ser estáveis tanto em condições de armazenamento diferentes como com formulações diferentes, com e sem fármaco.

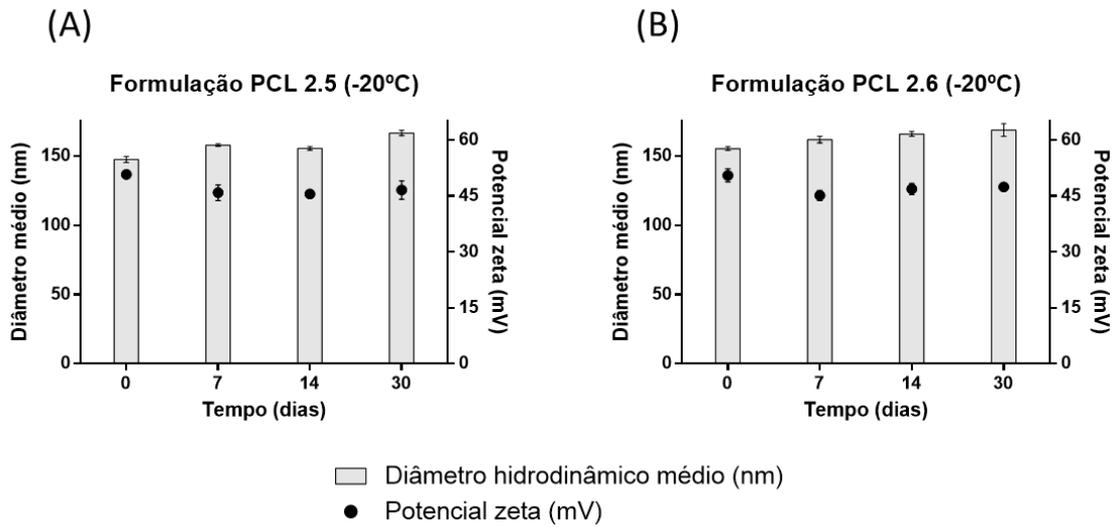


Figura 26 – Tamanho e potencial zeta das nanopartículas ao longo do tempo. Foram realizadas análises de diâmetro hidrodinâmico médio e potencial zeta das partículas armazenadas a 4°C ao longo de 30 dias, nos diferentes tempos: 0, 7, 14 e 30. (A) corresponde a formulação de partículas vazias. (B) é correspondente a partículas que contêm fármaco encapsulado. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

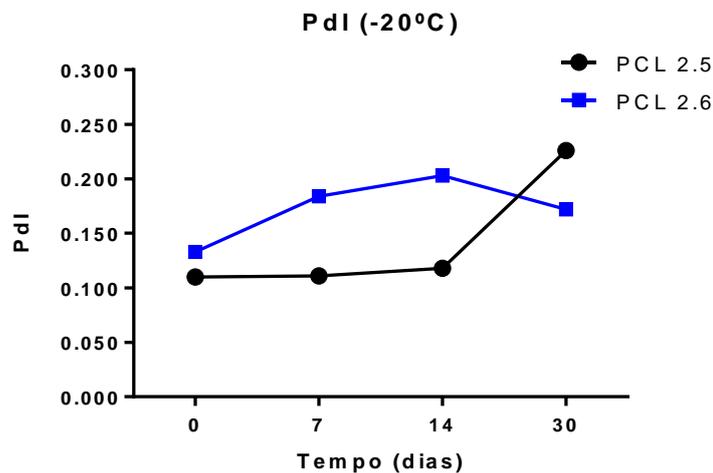


Figura 27 – Índice de polidispersão (PDI) das formulações ao longo do tempo. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Nos estudos encontrados na bibliografia, a estabilidade é realizada com as amostras armazenadas a 4°C ou a temperatura superior (Neves *et al.*, 2013). Não foram consideradas temperaturas

superiores, pois o fármaco, quando em suspensão, deve ser armazenado no frio e a uma temperatura constante.

Também foram realizados ensaios em que as partículas foram previamente liofilizadas, para o caso das suspensões não fossem estáveis ao longo do tempo. No entanto, a liofilização de partículas poliméricas leva à formação de agregados de dimensões consideráveis que, após voltar a suspender, esses agregados não se desfazem, tal como já demonstrado em alguns estudos (Saez *et al.*, 2000; Bozdag *et al.*, 2005). Para contornar esse problema, em alguns trabalhos foram adicionados açúcares à suspensão no sentido de manter as características das partículas, após a liofilização. De acordo com os trabalhos publicados, o açúcar que, para este fim, apresenta melhores resultados é a glucose numa concentração de 5% (m/v) (Saez *et al.*, 2000; Bozdag *et al.*, 2005). Nesse sentido, realizou-se a liofilização de uma amostra com e sem 5% (m/v) de glucose, ressuspendeu-se a amostra e realizou-se as análises de DLS e potencial zeta. Os resultados mostraram que, em ambas as condições de liofilização, o potencial zeta não se altera, mas quando a formulação foi liofilizada sem açúcar, o diâmetro médio aumentou substancialmente. No entanto, quando a mesma formulação foi liofilizada com 5% (m/v) de glucose, o diâmetro hidrodinâmico médio apresentou-se muito semelhante ao inicial, apenas com um ligeiro aumento do Pdl (Figura 28).

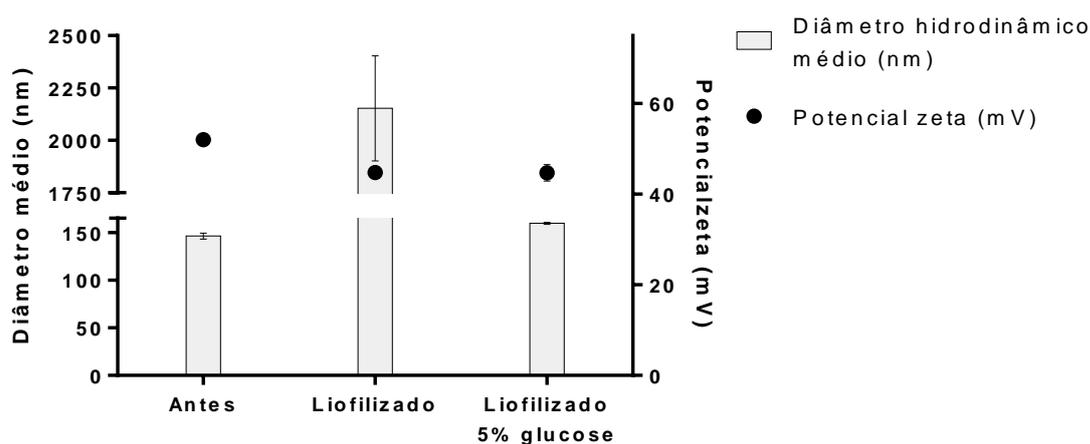


Figura 28 – Tamanho e potencial zeta de partículas liofilizadas. Foi realizada a análise de partículas não liofilizadas (antes), de partículas liofilizadas e de partículas liofilizadas na presença de 5% (m/v) de glucose. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

3.2.1.4.2. Percentagem de fármaco retido nas nanopartículas

Realizou-se uma curva padrão (Figura 29) para quantificação do fármaco que se mantinha encapsulado nas partículas durante o armazenamento.

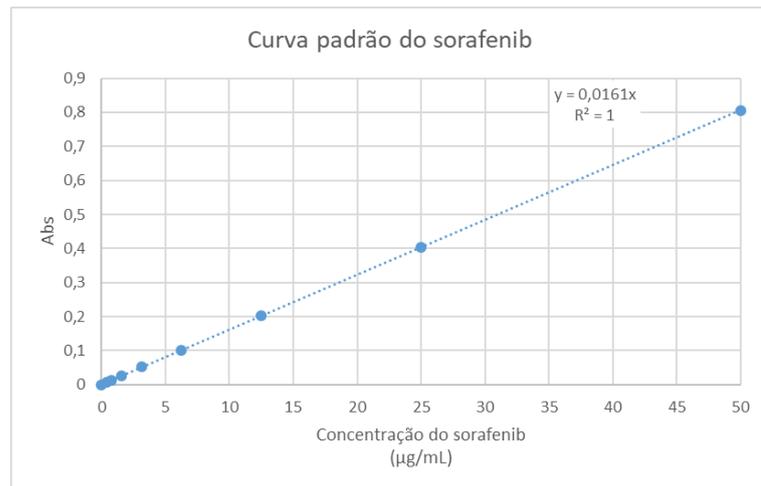


Figura 29 – Curva padrão do sorafenib obtida por absorvância. Curva realizada em DMSO e quantificada a um comprimento de onda de 275 nm. Pontos da curva: 0; 0,391; 0,781; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 µg/mL.

As amostras foram centrifugadas e separadas do sobrenadante, em cada tempo pré-definido (0, 7, 15, 30 e 60 dias após a sua síntese), para a quantificação do fármaco, tendo-se verificado que o fármaco se mantinha no interior das partículas e não era libertado ao longo do tempo (Figura 30).

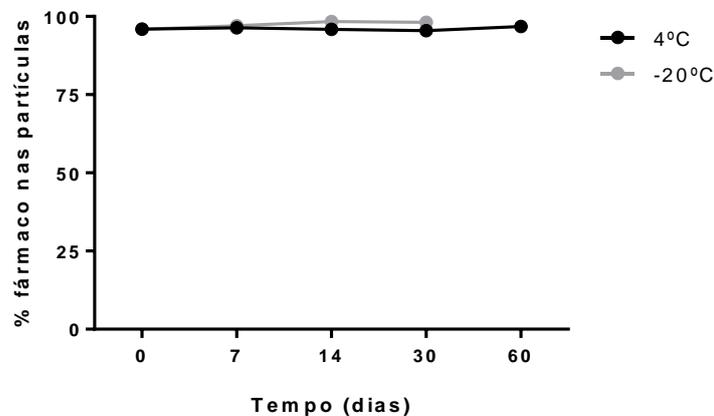


Figura 30 – Percentagem de fármaco que fica retido nas partículas ao longo do tempo. O armazenamento das partículas foi feito a -20°C e a 4°C (Formulação PCL 2.6).

3.2.2. Complexos

Um outro objetivo do projeto era avaliar a capacidade que as partículas tinham para complexar material genético e protegê-lo das endonucleases. A condensação do material genético com a partícula efetua-se através das interações electrostáticas estabelecidas entre os grupos amina existentes no surfactante (carga positiva), que se encontra à superfície da partícula, e os grupos fosfatos do ADN (carga negativa). Para tal, foi complexado material genético com as partículas, em várias razões de carga (+/-) partículas/pADN, tais como: 1/2; 2/1; 4/1; 8/1; 10/1; 25/1. Com estas amostras, complexos nanopartículas/ADN, foram realizados três ensaios diferentes, cujo os resultados obtidos serão apresentados e discutidos neste ponto.

3.2.2.1. Ensaio de intercalação do brometo de etídio

Após a produção dos complexos, adicionou-se o brometo de etídio e deixou-se incubar durante 10 minutos. Considerando o acesso total do brometo de etídio (100% de acesso), quando adicionado ao material genético sozinho (controlo), calculou-se a percentagem de acesso da sonda ao ADN dos complexos relativamente ao controlo. Como se pode verificar pelos resultados apresentados na Figura 31, observou-se uma diminuição da fluorescência do brometo de etídio com o aumento da razão de carga dos complexos, o que significa que, com o aumento da quantidade de partículas e consequente aumento das cargas positivas, existe uma diminuição do acesso do brometo de etídio ao ADN, que se traduz numa maior condensação e proteção do material genético.

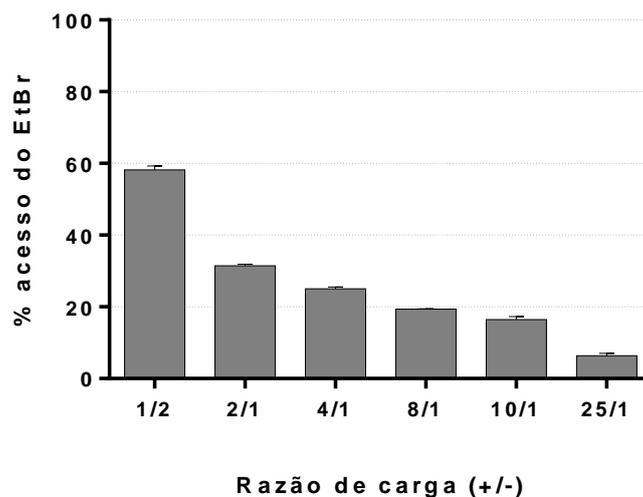


Figura 31 – Acesso do brometo de etídio ao material genético dos complexos. Os resultados são apresentados em percentagem relativamente ao controlo. O controlo corresponde à mesma quantidade de ADN livre e, submetido às mesmas condições, que representa 100% de acesso do brometo de etídio. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

3.2.2.2. Ensaio de eletroforese em gel de agarose com DNase I

Como ensaio complementar para avaliar a condensação e proteção do material genético realizou-se o ensaio de eletroforese em gel de agarose. Neste caso, realizado com incubação com DNase I ativa e inativa, para assim avaliar a proteção do ADN conferida pelos complexos à ação enzimática. Quando a condensação é muito reduzida, a DNase I degrada o ADN e não aparecem bandas no gel, face a incubação com a DNase I inactiva. Nas razões de carga em que a condensação do ADN é eficiente, não se espera ver diferenças entre as amostras incubadas com DNase I ativa e DNase I inactiva, podendo o ADN manter-se complexado com partícula no poço sem deslocamento ao longo do gel, devido à elevada condensação/proteção. O ADN corre no gel pois tem carga negativa e, aplicando uma diferença de potencial, tende a migrar para o eléctrodo positivo.

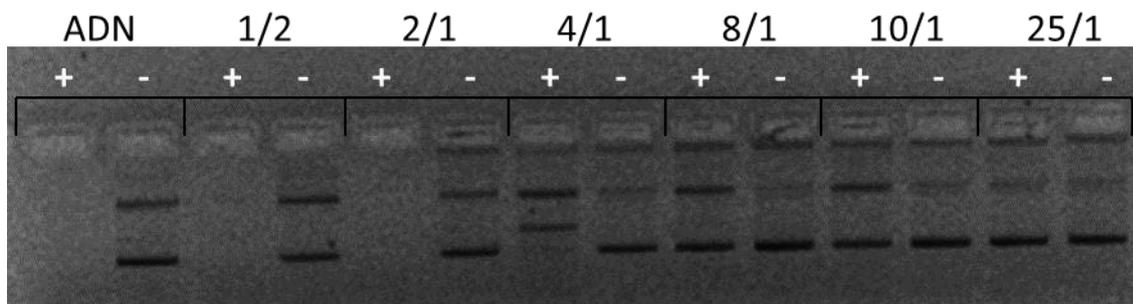


Figura 32 – Ensaio de eletroforese em gel de agarose dos complexos incubados com DNase I ativa e inativa. As amostras foram incubadas, durante 30 minutos, a 37°C com DNase I activa (+) ou previamente inativada (-).

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 32 e, como seria de esperar, na condição apenas com material genético (ADN), quando adicionada a DNase I ativada, não se vê nenhuma banda, o que significa que o material genético foi completamente degradado enzimaticamente e os seus componentes migraram para fora do gel, durante a corrida. O mesmo aconteceu nas razões de carga (+/-) 1/2 e 2/1. Na razão de carga (+/-) 4/1 verificou-se uma menor degradação do material genético, indicando que existe alguma proteção, mas que ainda não é suficiente, face à diferença das bandas entre a incubação com a DNase I activa e DNase I inactiva. Nas razões de carga (+/-) seguintes, 8/1 e 10/1 observou-se uma maior proteção do material genético, sendo que se existe uma menor diferença de intensidade das bandas entre os complexos incubados com a DNase I activa e inactiva. Na razão de carga (+/-) 25/1, de acordo com o esperado, foi onde se verificou o maior nível de proteção, sendo esta praticamente total, uma vez que não se verificou diferença de intensidade das bandas entre a incubação com a DNase I activa e DNase I inactiva. Um dado importante a referir é o facto de pouco material genético se encontrar no poço, o que se deve provavelmente a uma ligação electrostática que não é excessivamente forte e, quando aplicado um campo eléctrico, permite que grande parte do ADN se liberte da partícula. No entanto, pelo facto de ter sido realizado o ensaio com DNase I activa, podemos concluir que o material genético na razão de carga (+/-) 25/1 está completamente protegido.

Os resultados obtidos neste ensaio foram concordantes com os obtidos no ensaio de intercalação do brometo de etídio. Considerando que os complexos desenvolvidos, nomeadamente na razão de carga (+/-) 25/1, são bastante promissores no que diz respeito à condensação e proteção do material genético, foi importante verificar que dimensões e que potencial zeta é que estas formulações apresentavam, tal como será apresentado e discutido no ponto seguinte (3.2.2.3).

3.2.2.3. Análise da difusão dinâmica da luz (DLS) e potencial zeta (ZP)

A complexação de material genético com nanossistemas geralmente resulta num aumento do diâmetro hidrodinâmico médio. Esse aumento pode ser mais acentuado quando estamos na presença de complexos preparados em razões de carga (+/-) em que o potencial zeta se aproxima da neutralidade, pois nessas razões de carga (+/-) existem menos repulsões electrostáticas aumentando assim a probabilidade de haver a formação de agregados. Relativamente ao potencial zeta, é esperado que em razões de carga (+/-) baixas este seja substancialmente negativo e, à medida que se aumenta a razão de carga (+/-), se aproxime da neutralidade e se torne positivo.

Os complexos preparados na razão de carga (+/-) 1/2 apresentaram um diâmetro médio semelhante ao das partículas sozinhas, enquanto que na razão de carga (+/-) 2/1 se verificou um aumento de cerca de 30 nm (Figura 33). Estas duas razões de carga (+/-) apresentaram um potencial zeta negativo, devido provavelmente à presença de material genético à superfície das nanopartículas. Os complexos preparados na razão de carga (+/-) 4/1 apresentaram um potencial zeta ainda bastante negativo, a rondar os -22 mV, e um diâmetro hidrodinâmico médio superior a 800 nm, o que não seria de esperar, pois as partículas ainda apresentam um potencial zeta significativamente negativo. Os sistemas produzidos nas razões de carga (+/-) 8/1 e 10/1 apresentaram um potencial zeta próximo da neutralidade e diâmetros médios das partículas elevados, provavelmente devido à formação de agregados justificada pelas repulsões electrostáticas reduzidas (Figura 33). Relativamente aos complexos preparados na razão de carga (+/-) 25/1, evidenciaram um diâmetro hidrodinâmico médio semelhante ao das nanopartículas sem ADN e apresentaram um potencial zeta manifestamente positivo de +38.5 mV, muito possivelmente devido à quantidade de cargas positivas ser substancialmente maior que nas restantes razões de carga (+/-). Ainda assim, este valor é inferior ao das partículas sem ADN, devido à existência de material genético complexado (Figura 33).

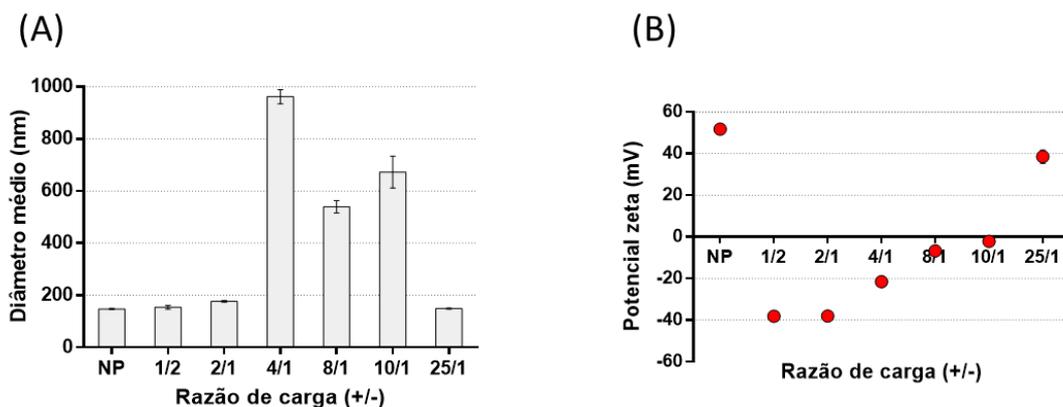


Figura 33 – Tamanho e potencial zeta dos complexos preparados nas diferentes razões de carga (+/-). (A) Diâmetro hidrodinâmico médio dos complexos. (B) Potencial zeta dos complexos. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão obtidos a partir de triplicados.

Considerando os resultados obtidos nos três ensaios realizados com os complexos, é possível verificar que a formulação preparada na razão de carga (+/-) 25/1 foi a que apresentou os melhores resultados, em todos os ensaios, evidenciando ser a razão de carga (+/-) mais promissora para prosseguir os estudos de transporte e entrega de material genético.

4. Conclusão e perspectivas futuras

O carcinoma hepatocelular tem elevada incidência e está no top 5 dos tipos de cancro mais mortais. A sua elevada taxa de mortalidade está associada ao facto de ser uma doença assintomática, em estádios iniciais, o que leva a um diagnóstico tardio. Normalmente, quando é realizado o diagnóstico, os tratamentos disponíveis já não são suficientes para reverter a doença, embora existam alguns casos de sucesso. Infelizmente, estes casos estão associados a uma elevada taxa de recorrência da doença à *posteriori*. Para além disso, os efeitos adversos da terapia convencional são graves e muito frequentes, principalmente quando nos referimos à quimioterapia. Considerando o prognóstico da doença, os tratamentos limitados para os estádios mais avançados e os efeitos adversos associados aos tratamentos existentes, levou a que se tornasse imprescindível estudar abordagens terapêuticas alternativas às convencionais.

Os sistemas de transporte de agentes terapêuticos surgiram nos últimos anos para colmatar alguns problemas dos tratamentos convencionais, sendo promissores para o tratamento de diversas doenças, inclusive do cancro. Nestes sistemas, podem ser transportados diferentes agentes terapêuticos em simultâneo, podendo ter um efeito sinérgico quando administrados ao mesmo tempo. Podem ser transportadas proteínas, fármacos, material genético ou mais do que um dos agentes terapêuticos referidos, de forma a obter-se uma terapia combinada e sinérgica. Para além disso, os sistemas de transporte podem ser modificados, de modo a incorporarem um ligando específico para um determinado tipo de células, ou de forma a que a libertação do agente terapêutico seja feita de forma controlada. Quando se fala de sistemas de transporte não virais, pretende-se partículas biocompatíveis, com baixa citotoxicidade e imunogenicidade, elevada especificidade e elevada eficiência de entrega do agente terapêutico ao alvo desejado.

Com o conhecimento existente desta alternativa terapêutica, surgiu este projeto que visa desenvolver nanossistemas de base polimérica capazes de transportar eficientemente fármaco e material genético em simultâneo até às células do carcinoma hepatocelular.

A policaprolactona foi aprovada pela FDA para ser usada em aplicações biomédicas devido, principalmente, à sua biocompatibilidade e à sua biodegradabilidade. Este polímero foi escolhido face às características promissoras que apresenta enquanto potencial sistema de transporte. Foram realizados dois procedimentos diferentes para a produção das partículas, sendo que o

primeiro foi descartado devido às características das nanopartículas não satisfazerem o objetivo do projeto, as partículas eram incapazes de transportar fármaco. O segundo procedimento, que surge de uma nova abordagem, demonstrou a capacidade de gerar partículas de dimensões e carga de superfície desejadas para a complexação do material genético, diâmetro hidrodinâmico médio próximo de 150 nm e potencial zeta substancialmente positivo. Adicionalmente, a formulação desenvolvida apresenta uma eficiência de encapsulação de fármaco de aproximadamente 100% e uma capacidade de carregamento a rondar os 10%. Demonstrou também uma elevada estabilidade, ao longo de pelo menos 60 dias.

Seguiu-se para o segundo objetivo do projeto, avaliar a capacidade destas mesmas partículas complexarem com o material genético e protegê-lo. Para avaliar a complexação e a capacidade das partículas condensarem o material genético, de modo a conseguirem protegê-lo da degradação enzimática, foram realizados dois ensaios complementares, o ensaio de intercalação do brometo de etídio e o gel de agarose com e sem DNase I ativa. Adicionalmente, foram realizados os ensaios de DLS e potencial zeta. Os resultados obtidos nos dois primeiros ensaios revelaram-se concordantes, demonstrando que a formulação preparada na razão de carga (+/-) 25/1 é muito promissora em termos de condensação e proteção do material genético. Relativamente aos ensaios de DLS e potencial zeta, esta formulação preparada nesta mesma razão carga (+/-) apresentou valores de diâmetro médio de aproximadamente 150 nm e um potencial zeta positivo, sendo estas propriedades benéficas à interação e internalização celular dos nanossistemas.

Concluindo, neste projeto foi possível produzir nanopartículas que possuem elevada capacidade de transporte de um fármaco hidrofóbico, com propriedades antitumorais, e material genético, apresentando características favoráveis à sua aplicação em estratégia terapêuticas.

Considerando que estas partículas têm características muito promissoras, como perspectivas futuras, será importante avaliar a sua biocompatibilidade, a sua interação com as células alvo e os mecanismos de internalização celular. Do mesmo modo, será fundamental verificar se os nanossistemas desenvolvidos têm a capacidade de libertar o fármaco e o material genético nas células alvo de forma eficiente, e avaliar o efeito antitumoral resultante quer das estratégias individuais quer da estratégia combinada. Adicionalmente, em termos de desenvolvimento futuro de formulação, poder-se-á revestir o nanossistema gerado com uma bicamada lipídica e/ou um polímero hidrofílico, de forma a mascarar a carga positiva do nanossistema e assim reduzir a sua

potencial interação inespecífica com os componentes do sangue. Esta modificação deverá ser acompanhada da incorporação de um ligando específico para as células alvo, por exemplo para o recetor das asialoglicoproteínas que está sobre-expresso no carcinoma hepatocelular, de modo a aumentar a eficiência e especificidade de entrega dos agentes terapêuticos às células alvo.

Bibliografia

- Akiel, M., Rajasekaran, D., Gredler, R., Siddiq, A., Srivastava, J., Robertson, C., Jariwala, N. H., Fisher, P. B. & Sarkar, D. (2014). Emerging role of insulin-like growth factor-binding protein 7 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, **1**, 9–19.
- Al-Allaf, F. A., Coutelle, C., Waddington, S. N., David, A. L., Harbottle, R. & Themis, M. (2010). LDLR-Gene therapy for familial hypercholesterolaemia: Problems, progress, and perspectives. *International Archives of Medicine*, **3**(1), 1–25.
- Al-Jamal, W. T. & Kostarelos, K. (2007). Liposome-nanoparticle hybrids for multimodal diagnostic and therapeutic applications. *Nanomedicine*, **2**(1), 85–98.
- Al-Jamal, W. T. & Kostarelos, K. (2011). Liposomes: From a clinically established drug delivery system to a nanoparticle platform for theranostic nanomedicine. *Accounts of Chemical Research*, **44**(10), 1094–1104.
- Ankerhold, J., Grabert, H. & Pechukas, P. (2005). Quantum Brownian motion with large friction. *Chaos*, **15**(2).
- Araki, T., Yashima, H., Shimizu, K., Aomori, T., Hashita, T., Kaira, K., Nakamura, T. & Yamamoto, K. (2012). Review of the treatment of non-small cell lung cancer with gefitinib. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, **6**, 407–421.
- Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z. & Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **71**, 1185–1198.
- Banik, B. L., Fattahi, P. & Brown, J. L. (2016). Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **8**(2), 271–299.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K. & Nagai, T. (1999). Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. Taylor & Francis, **25**(4), 471–476.
- Bouattour, M., Raymond, E., Qin, S., Cheng, A. L., Stammberger, U., Locatelli, G. & Faivre, S. (2018). Recent developments of c-Met as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **67**(3), 1132–1149.
- Bozdag, S., Dillen, K., Vandervoort, J. & Ludwig, A. (2005). The effect of freeze-drying with different cryoprotectants and gamma-irradiation sterilization on the characteristics of ciprofloxacin HCl-loaded poly(D,L-lactide-glycolide) nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**(6), 699–707.
- Bozzuto, G. & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, **10**(1), 975–999.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**(6), 394–424.
- Breitfeld, P. P., Jr., C. F. S., Strous, G. J. A. M., Geuze, H. J. & Schwartz, A. L. (1985). Cell biology of

the asialoglycoprotein receptor system: a model of receptor-mediated endocytosis. *International Review Cytology*, **97**, 47–95.

Cao, F. & Yin, L.-X. (2019). miR-122 enhances sensitivity of hepatocellular carcinoma to oxaliplatin via inhibiting MDR1 by targeting Wnt/ β -catenin pathway. *Experimental and Molecular Pathology*. Elsevier, **106**(32), 34–43.

Chawla, J. S. & Amiji, M. M. (2002). Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International Journal of Pharmaceutics*, **249**(1–2), 127–138.

Chen, J., Guo, Z., Tian, H. & Chen, X. (2016). Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy, **3**(September 2015), 16023.

Cheng, C. J., Tietjen, G. T., Saucier-Sawyer, J. K. & Saltzman, W. M. (2015). A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, **14**(4), 239–247.

Chi, H. C., Chen, S. L., Cheng, Y. H., Lin, T. K., Tsai, C. Y., Tsai, M. M., Lin, Y. H., Huang, Y. H. & Lin, K. H. (2016). Chemotherapy resistance and metastasis-promoting effects of thyroid hormone in hepatocarcinoma cells are mediated by suppression of FoxO1 and Bim pathway. *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, **7**(8), 2324–2334.

Chiang, Y.-T., Lyu, S.-Y., Wen, Y.-H. & Lo, C.-L. (2018). Preparation and characterization of electrostatically crosslinked polymer-liposomes in anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(6), 1615–1633.

Choi, Y. S., Lee, M. Y., David, A. E. & Park, Y. S. (2014). Nanoparticles for gene delivery: Therapeutic and toxic effects. *Molecular and Cellular Toxicology*, **10**(1), 1–8.

D'Souza, A. A. & Devarajan, P. V. (2015). Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - Strategies and applications. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., **203**, 126–139.

Daher, S., Massarwa, M., Benson, A. A. & Khoury, T. (2018). Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: An updated comprehensive review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, **6**(1), 1–10.

Deng, G. L., Zeng, S. & Shen, H. (2015). Chemotherapy and target therapy for hepatocellular carcinoma: New advances and challenges. *World Journal of Hepatology*, **7**(5), 787–798.

Ding, W.-Z., Ni, Q.-F., Lu, Y.-T., Kong, L.-L., Yu, J.-J., Tan, L.-W. & Kong, L.-B. (2016). MicroRNA-497 regulates cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Oncology letters*, **11**(2), 1081–1088.

Dogini, D. B., Pascoal, V. D. B., Avansini, S. H., Vieira, A. S., Pereira, T. C. & Lopes-Cendes, I. (2014). The new world of RNAs. *Genetics and molecular biology*, **37**(1), 285–293.

El-Khateeb, S. Z. & Abdel-Moety, E. M. (1988). Determination of quaternary ammonium surfactants in pharmaceutical formulations by the hypochromic effect. *Talanta*, **35**(10), 813–815.

El-Shemi, A. G., Ashshi, A. M., Oh, E., Jung, B. K., Basalamah, M., Alsaegh, A. & Yun, C. O. (2018). Efficacy of combining ING4 and TRAIL genes in cancer-targeting gene virotherapy strategy: First evidence in preclinical hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy*, **25**(1), 54–65.

Enayati, M., Ahmad, Z., Stride, E. & Edirisinghe, M. (2010). Size mapping of electric field-assisted production of polycaprolactone particles. *Journal of the Royal Society Interface*, **7**, 393–402.

Faloppi, L., Scartozzi, M., Maccaroni, E., Di Pietro Paolo, M., Berardi, R., Del Prete, M. & Cascinu, S. (2011). Evolving strategies for the treatment of hepatocellular carcinoma: From clinical-guided

to molecularly-taylorred therapeutic options. *Cancer Treatment Reviews*. Elsevier Ltd, **37**(3), 169–177.

Faneca, H., Simões, S. & Pedroso de Lima, M. C. (2004). Association of albumin or protamine to lipoplexes: Enhancement of transfection and resistance to serum. *Journal of Gene Medicine*, **6**(6), 681–692.

Fang, J., Islam, R., Islam, W., Yin, H., Subr, V., Etrych, T., Ulbrich, K. & Maeda, H. (2019). Augmentation of EPR effect and efficacy of anticancer nanomedicine by carbon monoxide generating agents. *Pharmaceutics*, **11**.

Fankhauser, F. (2010). Anwendung der statischen und dynamischen lichtstreuung - Eine Übersicht. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, **227**(3), 194–198.

Farinha, D., Pedroso De Lima, M. C. & Faneca, H. (2014). Specific and efficient gene delivery mediated by an asialofetuin-associated nanosystem. *International Journal of Pharmaceutics*, **473**(1–2), 366–374.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, **144**(8), 1941–1953.

Gao, D. Y., Lin, T. T., Sung, Y. C., Liu, Y. C., Chiang, W. H., Chang, C. C., Liu, J. Y. & Chen, Y. (2015). CXCR4-targeted lipid-coated PLGA nanoparticles deliver sorafenib and overcome acquired drug resistance in liver cancer. *Biomaterials*. Elsevier Ltd, **67**, 194–203.

Gao, J., Chen, H., Yu, Y., Song, J., Song, H., Su, X., Li, W., Tong, X., Qian, W., Wang, H., Dai, J. & Guo, Y. (2013). Inhibition of hepatocellular carcinoma growth using immunoliposomes for co-delivery of adriamycin and ribonucleotide reductase M2 siRNA. *Biomaterials*. Elsevier Ltd, **34**(38), 10084–10098.

Garner, R. C., Miller, E. C. & Miller, J. A. (1972). Liver Microsomal Metabolism of Aflatoxin B 1 to a Reactive Derivative Toxic to Salmonella typhimurium TA 15301. *Cancer Research*, **32**(10), 2058–2066.

Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M. & Abedi, M. R. (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *Journal of Gene Medicine*, **20**(5), 1–16.

Gossmann, R., Langer, K. & Mulac, D. (2015). New perspective in the formulation and characterization of didodecyldimethylammonium bromide (DMAB) stabilized poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles. *PLoS ONE*, **10**(7), 1–15.

Hadinoto, K., Sundaresan, A. & Cheow, W. S. (2013). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., **85**(3), 427–443.

Howard, M. D., Jay, M., Dziubla, T. D. & Lu, X. (2008). PEGylation of nanocarrier drug delivery systems: State of the art. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **4**(2), 133–148.

Hu, Y., Shen, Y., Ji, B., Wang, L., Zhang, Z. & Zhang, Y. (2011). Combinational RNAi gene therapy of hepatocellular carcinoma by targeting human EGFR and TERT. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier B.V., **42**(4), 387–391.

Huang, X., Leroux, J. C. & Castagner, B. (2017). Well-defined multivalent ligands for hepatocytes targeting via asialoglycoprotein receptor. *Bioconjugate Chemistry*, **28**(2), 283–295.

Ishibashi, H., Nakamura, M., Komori, A., Migita, K. & Shimoda, S. (2009). Liver architecture, cell function, and disease. *Seminars in Immunopathology*, **31**(3), 399–409.

- Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today*, **11**(17–18), 812–818.
- Jemal, A., Bray, F., M., M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **34**(1), 53–59.
- Jeong, S., Zheng, B., Wang, H., Xia, Q. & Chen, L. (2018). Nervous system and primary liver cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier, **1869**(2), 286–292.
- Jiang, P., Cao, J. & Bai, W.-H. (2015). Lentivirus-mediated siRNA targeting ER- α inhibits tumorigenesis and induces apoptosis in hepatocarcinoma cells. *BioMed Research International*, **2015**, 1–8.
- Kim, B.-K., Hwang, G.-B., Seu, Y.-B., Choi, J.-S., Jin, K. S. & Doh, K.-O. (2015). DOTAP/DOPE ratio and cell type determine transfection efficiency with DOTAP-liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., **1848**(10), 1996–2001.
- Klutzn, K., Schaffert, D., Willhauck, M. J., Grünwald, G. K., Haase, R., Wunderlich, N., Zach, C., Gildehaus, F. J., Senekowitsch-Schmidtke, R., Göke, B., Wagner, E., Ogris, M. & Spitzweg, C. (2011). Epidermal growth factor receptor-targeted¹³¹I-therapy of liver cancer following systemic delivery of the sodium iodide symporter gene. *Molecular Therapy*. The American Society of Gene & Cell Therapy, **19**(4), 676–685.
- Korhan, P., Erdal, E. & Atabey, N. (2014). MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **450**(4), 1304–1312.
- Lacouture, M. E., Wu, S., Robert, C., Atkins, M. B., Kong, H. H., Guitart, J., Garbe, C., Hauschild, A., Puzanov, I., Alexandrescu, D. T., Anderson, R. T., Wood, L. & Dutcher, J. P. (2008). Evolving strategies for the management of hand-foot skin reaction associated with the multitargeted kinase inhibitors Sorafenib and Sunitinib. *The Oncologist*, **13**(9), 1001–1011.
- Lam, B. Q., Dai, L. & Qin, Z. (2016). The role of HGF/c-MET signaling pathway in lymphoma. *Journal of Hematology and Oncology*. Journal of Hematology & Oncology, **9**(1), 1–8.
- Lee, J. J., Yazan, L. S. & Abdullah, C. A. C. (2017). A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 2373–2384.
- Lee, T. K. W., Han, J. S., Fan, S. T., Liang, Z. D., Tian, P. K., Gu, J. R. & Ng, I. O. L. (2001). Gene delivery using a receptor-mediated gene transfer system targeted to hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, **93**(3), 393–400.
- Li, L., Wei, Y. & Gong, C. (2015). Polymeric nanocarriers for non-viral gene delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 739–770.
- Li, M., Su, Y., Zhang, F., Chen, K., Xu, X. & Xu, L. (2018). A dual-targeting reconstituted high density lipoprotein leveraging the synergy of sorafenib and anti-miRNA21 for enhanced hepatocellular carcinoma therapy. *Acta Biomaterialia*, **75**, 413–426.
- Li, S. & Huang, L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Therapy*, **7**(1), 31–34.
- Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G. A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nav Rev Drug Discov*, **12**(11), 847.
- Liong, M., Lu, J., Kovochich, M., Xia, T., Ruehm, S. G., Nel, A. E., Tamanoi, F. & Zink, J. I. (2008). Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*, **2**(5),

889–896.

Liu, K., Liu, S., Zhang, W., Ji, B., Wang, Y. & Liu, Y. (2014). miR-222 regulates sorafenib resistance and enhance tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*, **45**(4), 1537–1546.

Liu, K., Lin, D., Ouyang, Y., Pang, L., Guo, X., Wang, S., Zang, Y. & Chen, D. (2017). Amphiregulin impairs apoptosis-stimulating protein 2 of p53 overexpression–induced apoptosis in hepatoma cells. *Tumor Biology*, **39**(3), 1–8.

Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., McNabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M. & Carter, C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Research*, **66**(24), 11851–11858.

Liu, Z., Chen, D., Ning, F., Du, J. & Wang, H. (2018). EGF is highly expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and promotes motility of HCC cells via fibronectin. *Journal of Cellular Biochemistry*, **119**(5), 4170–4183.

Lohitesh, K., Chowdhury, R. & Mukherjee, S. (2018). Resistance a major hindrance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma: An insight. *Cancer Cell International*. BioMed Central, **18**(1), 1–15.

Lowry, J. B. (1979). Direct spectrophotometric assay of quaternary ammonium compounds using bromthymol blue. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **68**(1), 110–111.

Magalhães, M., Farinha, D., de Lima, M. C. P. & Faneca, H. (2014). Increased gene delivery efficiency and specificity of a lipid-based nanosystem incorporating a glycolipid. *International Journal of Nanomedicine*, **9**(1), 4979–4989.

Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A. & Wood, G. C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., **9**(4), 474–491.

Mao, Y., Pei, N., Chen, X., Chen, H., Yan, R., Bai, N., Li, A., Li, J., Zhang, Y., Du, H., Chen, B., Sumners, C., Wang, X., Wang, S. & Li, H. (2018). Angiotensin 1-7 overexpression mediated by a capsid-optimized AAV8 vector leads to significant growth inhibition of hepatocellular carcinoma in vivo. *International Journal of Biological Sciences*, **14**(1), 57–68.

Marshall, J. & Johnsen, S. (2017). Fluorescence as a means of colour signal enhancement. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **372**(1724).

Merzouk, A. S., Hafida, M., Medjdoub, A., Loukidi, B., Cherrak, S., Merzouk, S. A. & Elhabiri, M. (2017). Alterations of hepatocyte function with free radical generators and reparation or prevention with coffee polyphenols. *Free Radical Research*, **51**(3), 294–305.

Nassirpour, R., Mehta, P. P. & Yin, M. J. (2013). miR-122 regulates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting AKT3. *PLoS ONE*, **8**(11).

Nayerossadat, N., Ali, P. & Maedeh, T. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, **1**(1), 27.

Neves, J. das, Michiels, J., Ariën, K. K., Vanham, G., Amiji, M., Bahia, M. F. & Sarmiento, B. (2011). Polymeric nanoparticles affect the intracellular delivery, antiretroviral activity and cytotoxicity of the microbicide drug candidate dapivirine. *Pharmaceutical Research*, **29**(6), 1468–1484.

Neves, J. das, Rocha, C. M. R., Gonçalves, M. P., Carrier, R. L., Amiji, M., Bahia, M. F. & Sarmiento, B. (2012). Interactions of microbicide nanoparticles with a simulated vaginal fluid. *Molecular*

Pharmaceutics, **9**(11), 3347–3356.

Neves, J. das, Amiji, M., Bahia, M. F. & Sarmiento, B. (2013). Assessing the physical-chemical properties and stability of dapivirine-loaded polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., **456**(2), 307–314.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T. & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis*, **2**(3), 213–219.

Obeid, J. M., Kunk, P. R., Zaydfudim, V. M., Bullock, T. N., Slingluff, C. L. & Rahma, O. E. (2017). Immunotherapy for hepatocellular carcinoma patients: is it ready for prime time? *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, **67**(2), 161–174.

Passadouro, M., de Lima, M. C. P. & Faneca, H. (2014). MicroRNA modulation combined with sunitinib as a novel therapeutic strategy for pancreatic cancer. *International Journal of Nanomedicine*, **9**(1), 3203–3217.

Perrie, Y., Frederik, P. M. & Gregoriadis, G. (2001). Liposome-mediated DNA vaccination: The effect of vesicle composition. *Vaccine*, **19**(23–24), 3301–3310.

Petros, R. A. & DeSimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, **9**(8), 615–627.

Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., Marchio, A., Battiston, C., Terris, B., Mazzaferro, V., Lowe, S. W., Croce, C. M. & Dejean, A. (2010). miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(1), 264–269.

Pinho, S. L. C., Faneca, H., Geraldés, C. F. G. C., Rocha, J., Carlos, L. D. & Delville, M. H. (2012). Silica nanoparticles for bimodal MRI-optical imaging by grafting Gd³⁺ and Eu³⁺ /Tb³⁺ complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (16), 2828–2837.

Pinto, M., Fernandes, C., Martins, E., Silva, R., Benfeito, S., Cagide, F., Mendes, R. F., Almeida Paz, F. A., Garrido, J., Remião, F. & Borges, F. (2019). Boosting drug discovery for Parkinson's: Enhancement of the delivery of a monoamine oxidase-B inhibitor by brain-targeted PEGylated polycaprolactone-based nanoparticles. *Pharmaceutics*, **11**(7), 331–352.

Poudel, B. K., Gupta, B., Ramasamy, T., Thapa, R. K., Youn, Y. S., Choi, H. G., Yong, C. S. & Kim, J. O. (2016). Development of polymeric irinotecan nanoparticles using a novel lactone preservation strategy. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., **512**(1), 75–86.

Saez, A., Guzmán, M., Molpeceres, J. & Aberturas, M. R. (2000). Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**(3), 379–387.

Santo, D., Cordeiro, R. A., Sousa, A., Serra, A., Coelho, J. F. J. & Faneca, H. (2017). Combination of poly[(2-dimethylamino)ethyl methacrylate] and poly(β-amino ester) results in a strong and synergistic transfection activity. *Biomacromolecules*, **18**(10), 3331–3342.

Schepelmann, S., Niculescu-Duvaz, I. & Springer, C. J. (2008). Suicide gene therapy. in Bronchud, M. H. et al. (eds) *Principles of molecular oncology*. 3rd edn. Humana press, 367–382.

Somia, N. & Verma, I. M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Reviews Genetics*. Nature America Inc., **1**, 91–99.

Spiess, M. (1990). The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*. American Chemical Society, **29**(43), 10009–10018.

- Spuch, C. & Navarro, C. (2011). Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). *Journal of Drug Delivery*, **2011**, 1–12.
- Studart, A. R., Amstad, E. & Gauckler, L. J. (2007). Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions. *Langmuir*, **23**(3), 1081–1090.
- Su, H., Yang, J.-R., Xu, T., Huang, J., Xu, L., Yuan, Y. & Zhuang, S.-M. (2009). MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Research*, **69**(3), 1135–1142.
- Tang, Z. Y. (2001). Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World Journal of Gastroenterology*, **7**(4), 445–454.
- Tani, J., Faustine & Sufian, J. T. (2011). Updates on Current Advances in Gene Therapy Actualizaciones Acerca de los Adelantos Presentes en Terapia Genética. *West Indian Med J*, **60**(2), 188–194.
- Waller, L. P., Deshpande, V. & Pysopoulos, N. (2015). Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review. *World Journal of Hepatology*, **7**(26), 2648–2663.
- Wang, Z., Chang, Z., Lu, M., Shao, D., Yue, J., Yang, D., Zheng, X., Li, M., He, K., Zhang, M., Chen, L. & Dong, W. fei (2018). Shape-controlled magnetic mesoporous silica nanoparticles for magnetically-mediated suicide gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Biomaterials*. Elsevier Ltd, **154**, 147–157.
- Wu, X., Fan, J., Wang, X., Zhou, J., Qiu, S., Yu, Y., Liu, Y. & Tang, Z. (2007). Downregulation of CCR1 inhibits human hepatocellular carcinoma cell invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **355**(4), 866–871.
- Xia, Y., Guo, M., Xu, T. T., Li, Y. H., Wang, C. B., Lin, Z. F., Zhao, M. Q. & Zhu, B. (2018). siRNA-loaded selenium nanoparticle modified with hyaluronic acid for enhanced hepatocellular carcinoma therapy. *International Journal of Nanomedicine*, **13**, 1539–1552.
- Xu, J., Li, J., Zheng, T.-H., Bai, L. & Liu, Z.-J. (2016). MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma. *Adv Clin Exp Med*, **25**(5), 971–975.
- Xue, H., Yu, Z., Liu, Y., Yuan, W., Yang, T., You, J., He, X., Lee, R. J., Li, L. & Xu, C. (2017). Delivery of miR-375 and doxorubicin hydrochloride by lipid-coated hollow mesoporous silica nanoparticles to overcome multiple drug resistance in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Nanomedicine*, **12**, 5271–5287.
- Yang, Z., Duan, J., Wang, J., Liu, Q., Shang, R., Yang, X., Lu, P., Xia, C., Wang, L. & Dou, K. (2018). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified with polyethylenimine and galactose for siRNA targeted delivery in hepatocellular carcinoma therapy. *International Journal of Nanomedicine*, **13**, 1851–1865.
- Yi, S. W., Yune, T. Y., Kim, T. W., Chung, H., Choi, Y. W., Kwon, I. C., Lee, E. B. & Jeong, S. Y. (2000). A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum-resistant gene delivery system. *Pharmaceutical Research*, **17**(3), 1–8.
- Zhang, B., Chen, M., Zhang, Y., Chen, W., Zhang, L. & Chen, L. (2018). An ultrasonic nanobubble-mediated PNP / fludarabine suicide gene system: A new approach for the treatment of hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, **13**(5), 1–14.
- Zholkovskij, E. K., Masliyeh, J. H., Shilov, V. N. & Bhattacharjee, S. (2007). Electrokinetic phenomena in concentrated disperse systems: General problem formulation and spherical cell

approach. *Advances in Colloid and Interface Science*, **134–135**, 279–321.

Zhu, W., Peng, Y., Wang, L., Hong, Y., Jiang, X., Li, Q., Liu, H., Huang, L., Wu, J., Celis, E., Merchen, T., Kruse, E. & He, Y. (2018). Identification of α -fetoprotein-specific T cell receptors for hepatocellular carcinoma immunotherapy. *Hepatology*, **68**(2), 574–589.

Zou, Z. *et al.* (2017). miR-495 sensitizes MDR cancer cells to the combination of doxorubicin and taxol by inhibiting MDR1 expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21**(9), 1929–1943.