



**Novos Vectores Baseados em Dendrímeros com
Aplicações em Terapia Antisense**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rita Maria de Castro

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

Setembro | 2011

T/M Una

54

CAS NOV

69 890

Novos Vectores Baseados em Dendrímeros com Aplicações em Terapia Antisense

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rita Maria de Castro

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
SECTOR DE DOCUMENTAÇÃO
E ARQUIVO

ORIENTAÇÃO
Helena Maria Pires Gaspar Tomás



NOVOS VECTORES BASEADOS EM DENDRÍMEROS COM APLICAÇÕES EM TERAPIA *ANTISENSE*

**Tese submetida à UNIVERSIDADE DA MADEIRA
com vista à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada**

Rita Maria de Castro

**Trabalho efectuado sob a orientação de:
Professora Doutora Helena Maria Pires Gaspar Tomás
Professor Doutor João Manuel Cunha Rodrigues**

Funchal - Portugal

Aos meus Pais e Irmã...

*Quando se faz o que não se ama a troco de dinheiro e fama,
cria-se um sistema financeiro, morre o prazer, o talento e a índole.
Quando se faz o que se ama, não há dinheiro nem fama que o pague,
nem obstáculos que nos façam deter.*

Fernanda Castro

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação não teria sido possível sem o apoio e orientação de diversas individualidades intervenientes na minha vida académica. Demonstro, desde já, o desejo em expressar a minha profunda gratidão e reconhecimento a todos aqueles que contribuíram, decisivamente, na minha formação, quer a nível académico e profissional, quer a nível pessoal.

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Helena Tomás, por todo o apoio e incentivo prestado durante o meu estudo e formação. Profissional exemplar, determinada, disponível, solidária, sábia e prestativa. Estas características tornam-na um modelo de virtude, dedicação e perseverança para com todos aqueles que aparecem no seu caminho.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor João Rodrigues, pelo incentivo, interesse, apoio, entusiasmo e preocupação manifestados ao longo deste ano!

Um especial agradecimento ao Doutor Luís Santos (ex-estudante de doutoramento no CQM, agora na Johns Hopkins University, EUA) pela síntese e caracterização dos dendrímeros PAMAM G5 modificados com ácidos gordos e pelo auxílio prestado ao longo da minha dissertação. Grande profissional e amigo pessoal, solidário e responsável. Sem a sua ajuda, conhecimentos, orientação e algumas sugestões, a elaboração da minha dissertação não teria sido, de facto, exequível. Agradeço, equitativamente, o entusiasmo, a euforia, amizade e os dias bem passados na sua companhia.

Gostaria, igualmente, de expressar a minha gratidão ao Doutor Sebastian Newman (Ruhr-University Bochum, Alemanha) por amavelmente ter cedido as células HeLa pEGFP utilizadas neste projecto.

Esta dissertação estaria, indubitavelmente, incompleta se não reconhecesse o apoio, a colaboração, amizade e o entusiasmo prestados pelos meus colegas e amigos, Doutor Alireza Nouri, Berta Mendes, Doutor Dan Domide, Daniel Lima, Manuel Jardim, Mara Gonçalves e Vítor Spínola. Agradeço-vos pelo alento, amabilidade, meiguice, ajuda, momentos de risota e descontração, particularmente nos dias de menor ânimo e infortúnio. Agradeço-vos do fundo do meu coração pela luz ao fundo do túnel.

Agradeço, igualmente, às técnicas de laboratório Ana Paula Temtem e Ana Paula Andrade por toda a ajuda e assistência prestada.

Gostaria também de agradecer o apoio do Centro de Química (CQM), em particular do Molecular Materials Research Group (MMRG), e da Universidade da Madeira (UMa), que com condições possíveis proporcionaram os meios necessários para a feitura desta dissertação.

Não posso deixar de reconhecer o apoio da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projecto PEst-OE/QUI/UI0674/2011 (CQM, fundos do Governo Português) e da Rede Portuguesa de RMN (PTNMR-REDE/1517/RMN/2005-POCI2010/FEDER). O apoio por parte do CS Madeira é também reconhecido.

Agradeço profundamente à minha família, nomeadamente, ao meu pai, Sidónio (que infelizmente já não se encontra entre nós) e à minha mãe, Conceição, pelo apoio prestado, carinho, amor e sacrifícios a que se submeteram para que pudesse progredir na minha formação. Agradeço também à minha irmã, Fernanda por momentos de alegria, descontração, mesmo depois de às vezes me torrar a paciência!

Não posso deixar de agradecer aos meus queridos animais de estimação, ao meu cão Malhado e à minha gata Neca por serem as coisas mais fofas neste mundo e me proporcionarem momentos de alegria e descontração!

Grata a todos que contribuíram, directa ou indirectamente, na minha formação académica.

Esta Tese de Mestrado correspondeu ao primeiro trabalho de investigação realizado no CQM - Centro de Química da Madeira (Universidade da Madeira) na área do silenciamento de genes. Neste contexto, permitiu o ganho de experiência neste importante domínio da Terapia Genética e servirá de base para o lançamento de outros trabalhos futuros. Para a estudante, foi uma oportunidade de aprender/treinar a forma de aceder e analisar a informação científica, programar trabalho de investigação, interpretar dados experimentais e, também, comunicar ciência (de modo oral e escrito). Em termos laboratoriais, o trabalho envolveu, sobretudo, a aprendizagem dos métodos básicos de cultura de células animais e a realização de diversos ensaios bioquímicos (como, por exemplo, métodos de determinação de conteúdos proteicos e avaliação da viabilidade celular), bem como a utilização de técnicas de caracterização de nanopartículas (*Dynamic Light Scattering* e medição de potencial- ζ) e de fluorescência (utilização do microscópio de fluorescência invertido, do leitor de microplacas e do espectrofluorímetro). A estudante teve ainda a possibilidade de acompanhar outros trabalhos a decorrer no CQM na área da entrega de genes, da avaliação da citocompatibilidade de materiais de implante e da síntese química (participando, inclusive, nalguns estudos efectuados), o que se mostrou bastante enriquecedor em termos de experiência académica.

No decorrer do ano lectivo, a estudante participou nas actividades de divulgação de Ciência levadas a cabo pelo CQM e, ainda, em vários encontros científicos (*6th Materials Group Meeting/CQM/2011*, *Frontiers in Biomedical Polymers/2011* e *8th SUPRAPHONE Meeting/2011*, os quais tiveram lugar na cidade do Funchal). Como resultado directo do trabalho desenvolvido no âmbito da Tese de Mestrado ou de trabalho laboratorial complementar efectuado, a estudante apresentou os seguintes trabalhos em encontros científicos:

1. Rita Castro, João Rodrigues, Helena Tomás, *Surface modified PAMAM dendrimers in antisense therapy*, apresentação oral, *6th Materials Group Meeting/CQM*, 2011 (Funchal, Universidade da Madeira).

2. Alireza Nouri, Yulin Li, Rita Castro, José Luís Santos, João Rodrigues, Helena Tomás, *In vitro study of poly(ethylenimine) (PEI)-g-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) as a gene delivery vector*, apresentação em poster, *Frontiers in Biomedical Polymers*, 2011 (Funchal).

Resumo

A terapia genética tem se revelado uma ferramenta potente na Medicina, na tentativa de revolucionar o tratamento de várias doenças hereditárias e adquiridas. A introdução de genes em células pretende a expressão estável e prolongada de proteínas com efeitos terapêuticos.

O silenciamento de genes, através da terapia genética que faz uso de oligonucleótidos *antisense*, pequenos RNA de interferência (siRNA) ou ribozimas, visa o decréscimo ou anulação do funcionamento de um gene cuja expressão amplificada, por algum motivo, leva ao desenvolvimento de uma patologia.

A internalização de material genético nas células, usualmente, carece de métodos e/ou sistemas de entrega (vectores). Estes podem pertencer a duas categorias, designadamente, métodos virais e métodos não-virais. O primeiro é considerado o mais eficiente, apresentando porém, sérias desvantagens como o risco de carcinogénese. A solução é a utilização de métodos não-virais, que podem ser físicos ou químicos.

O objectivo principal desta dissertação foi a utilização de dendrímeros para o silenciamento do gene da proteína fluorescente otimizada (EGFP) em células HeLa, previamente modificadas para expressarem esta proteína. Dendrímeros poli(amidoamina) geração 5 (PAMAM G5) modificados com 4 ou 8 moléculas de ácidos gordos de diferentes comprimentos foram complexados com oligonucleótidos *antisense*. A vantagem que estes apresentam em relação aos dendrímeros nativos é que são capazes de interagir com os lípidos da membrana celular, esperando-se, por isso, uma melhor eficiência de transfecção e efeitos *antisense*. Isto foi efectivamente verificado, sendo que o nível de silenciamento do gene da EGFP obtido, está directamente relacionado com o aumento da razão NP, o número e o comprimento das cadeias hidrofóbicas.

O silenciamento de genes tem sofrido grandes avanços, havendo actualmente uma série de ensaios clínicos para a sua utilização no tratamento

de doenças como cancros de origem hereditária ou viral, prevendo-se que venha para ficar, juntamente com o silenciamento mediado por siRNA.

Palavras-chave: terapia *antisense*; silenciamento de EGFP; oligonucleótido *antisense*; dendrímeros PAMAM; células HeLa pEGFP; fluorescência.

Abstract

Gene therapy has been proven to be a powerful tool for Medicine, in an attempt to revolutionize hereditary and acquired diseases's treatments. The successful introduction of genes into cells requires a stable and long-lasting protein expression, which results in therapeutic effects.

Gene silencing is one form of gene therapy that makes use of antisense oligonucleotides, siRNA or ribozymes. This approach is aimed to silence a gene whose expression leads to disease development.

The cellular uptake of genetic material usually requires methods and/or delivery systems. These methods can be split into two categories: viral and non-viral methods. Although, the former method is the most efficient, it has serious disadvantages such as risk of carcinogenesis. Thus, an alternative is the use of either physical or chemical non-viral.

The main goal of this dissertation was to use dendrimers as delivery systems to reduce the EGFP gene expression in HeLa cells, that had previously been modified to express this protein. PAMAM dendrimers (G5) were modified with 4 and 8 molecules of fatty acids of different lengths. The resultant dendrimers were complexed with *antisense* oligonucleotides. The advantage of these new families of dendrimers, as compared to native dendrimers, is that they are able to interact with the cell membrane lipids and increases the transfection efficiency with better antisense effects. The obtained results were, thereby, directly related to the increase of the NP, and the number and length of hydrophobic chains.

There are currently several numbers of clinical trials for treating diseases such as hereditary or viral cancers. Nevertheless, over the past few years, gene silencing has undergone major advances and is expected to be a demanding field for future therapy, along with the siRNA-mediated protein silencing.

Keywords: antisense therapy; EGFP silencing; antisense oligonucleotide; PAMAM dendrimers HeLa pEGFP cells; fluorescence.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	viii
Abstract	xi
Índice	xiv
Lista de Figuras	xviii
Lista de Tabelas.....	xxii
Lista de Acrónimos	xxiii

Capítulo I

Terapia genética: O silenciamento de genes	4
Resumo	4
1. Funcionamento de uma célula: conceitos básicos	7
1.1. A célula e o seu centro de comando.....	7
1.2. Expressão genética: transcrição e tradução.....	7
2. Terapia genética.....	12
2.1. Objectivos e importância	12
2.2. A terapia genética: etapas e obstáculos	13
2.3. Aplicação terapêutica no organismo	17
3. O silenciamento de genes	19
3.1. Oligonucleótidos, siRNA e ribozimas: a tríade para o silenciamento	19
3.2. Silenciamento de genes com oligonucleótidos <i>antisense</i>	21
3.2.1. Etapas iniciais para a aplicação da terapia <i>antisense</i> com oligonucleótidos	21
3.2.2. Mecanismos de acção	22
3.2.2.1. Impedimento estérico.....	23
3.2.2.2. Activação enzimática	24

3.3. Controlos na terapia <i>antisense</i> com oligonucleótidos	24
3.4. Oligonucleótidos: a sua evolução.....	25
3.4.1. Oligonucleótidos fosfodiéster	25
3.4.2. Modificações no grupo fosfato	27
3.4.3. Modificações na pentose	29
3.4.4. Oligonucleótidos quiméricos	31
3.5. Silenciamento de genes com siRNA	33
3.6. Silenciamento de genes com ribozimas.....	34
4. Métodos de entrega de material genético	37
4.1. Métodos virais.....	37
4.2. Métodos não-virais: físicos e químicos	38
4.2.1. Métodos físicos	39
4.2.2. Métodos químicos.....	39
4.2.2.1. Polímeros.....	41
4.2.2.1.1. Polímeros naturais	42
4.2.2.1.2. Polímeros sintéticos	43
Poli-L-Lisina e polipéptidos.....	43
Polietileneimina	44
Outros polímeros clássicos.....	46
4.2.2.1.3. Dendrímeros	47
4.2.2.2. Lipossomas e lípidos catiónicos	53
4.2.2.3. Nanopartículas inorgânicas	55
5. Terapia <i>antisense</i> : potenciais aplicações	58
5.1. Terapia <i>antisense</i> na SIDA	60
5.2. Terapia <i>antisense</i> no cancro	61
5.3. Outras doenças.....	63
5.4. Efeitos secundários dos oligonucleótidos <i>in vivo</i>	64

Capítulo II

Estudos <i>in vitro</i> ce silenciamento do gene da proteína verde fluorescente otimizada (EGFP) utilizando dendrímeros nativos e funcionalizados como vectores.....	70
Resumo	70
1. Introdução	73
1.1. Células HeLa com expressão da Proteína Verde Fluorescente Otimizada	73
1.2. Proteína verde fluorescente otimizada (EGFP).....	75
1.3. Oligonucleótidos <i>antisense</i>	77
1.4. Dendrímeros PAMAM nativos e modificados	79
1.5. Objectivos	81
2. Secção experimental	82
2.1. Materiais e reagentes.....	82
2.2. Preparação dos "dendriplexos"	83
2.3. Caracterização dos "dendriplexos" por DLS e potencial- ζ	84
2.4. Avaliação da interacção do oligonucleótido <i>antisense</i> marcado com TAMRA com dendrímeros	84
2.5. Avaliação da perda de interacção do oligonucleótido <i>antisense</i> marcado com TAMRA com dendrímero G5	85
2.6. Cultura celular de HeLa pEGFP.....	86
2.7. Transfecção das células HeLa pEGFP	86
2.8. Teste de citotoxicidade	88
2.9. Estudos de silenciamento de EGFP	89
2.10. Estudos de microscopia de fluorescência para localização celular do oligonucleótido <i>antisense</i> marcado com TAMRA	90
2.11. Tratamento estatístico	91
3. Resultados e discussão	92
3.1. Caracterização dos "dendriplexos" por DLS e potencial- ζ	92
3.2. Avaliação da interacção do oligonucleótido <i>antisense</i> marcado com TAMRA com dendrímeros	97

3.3. Avaliação da perda de interação do oligonucleótido <i>antisense</i> marcado com TAMRA com dendrímero G5	99
3.4. Teste de citotoxicidade	102
3.5. Estudos de silenciamento de EGFP	104
3.6. Estudos de microscopia de fluorescência para localização celular do oligonucleótido <i>antisense</i> marcado com TAMRA	112
4. Conclusões e perspectivas	114
Referências bibliográficas	117

Lista de Figuras

- FIGURA 1. PROCESSO DE TRANSCRIÇÃO DE UM GENE E PROCESSAMENTO EM MRNA.** A TRANSCRIÇÃO É UM PROCESSO COM TRÊS ETAPAS, NOMEADAMENTE INICIAÇÃO, ELONGAÇÃO E TERMINAÇÃO. NA INICIAÇÃO OCORRE A LIGAÇÃO DE FACTORES PROTEICOS AO PROMOTOR *TATA BOX*. ISTO FAZ COM QUE O COMPLEXO ENZIMÁTICO RNA POLIMERASE II INICIE A ELONGAÇÃO, ATRAVÉS DA POLIMERIZAÇÃO DE RIBONUCLEÓTIDOS NO SENTIDO 5'-3', COM O AUXÍLIO DA HELICASE QUE DESNATURA A DUPLA HÉLICE A JUSANTE. A TERMINAÇÃO DÁ-SE COM A INTERRUPÇÃO DA TRANSCRIÇÃO POR DISSOCIAÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO E LIBERTAÇÃO DO PRÉ-MRNA. O PRÉ-MRNA SOFRE EM SEGUIDA UM PROCESSO DE MATURAÇÃO QUE ENVOLVE A ADIÇÃO DE UMA MOLÉCULA *CAP* À EXTREMIDADE 5', A REACÇÃO DE *SPLICING* (REMOÇÃO DOS INTRÕES E RELIGAÇÃO DOS EXÕES) E, POR FIM, A POLIADENILAÇÃO DA EXTREMIDADE 3' 8
- FIGURA 2. PROCESSO DE TRADUÇÃO DE MRNA EM PROTEÍNA.** A SÍNTESE DE PROTEÍNAS CONSISTE NUM PROCESSO DE 5 ETAPAS, SENDO ELAS A ACTIVACÃO DO AMINOÁCIDO (LIGAÇÃO DESTE AO tRNA), INICIAÇÃO (ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS), ELONGAÇÃO (FORMAÇÃO DA CADEIA PEPTÍDICA COM A INTERVENÇÃO DE FACTORES DE ELONGAÇÃO), TERMINAÇÃO (RECONHECIMENTO DO CODÃO TERMINAL) E LIBERTAÇÃO, ENROLAMENTO E PROCESSAMENTO (ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL ADQUIRIDA COM INTERVENÇÃO DE *CHAPERONAS* E MODIFICAÇÕES QUÍMICAS COMO GLICOSILAÇÕES, METILAÇÕES, FOSFORILAÇÕES, ETC.) 10
- FIGURA 3. INTERNALIZAÇÃO DE COMPLEXOS VIA ENDOCÍTICA E BARREIRAS CELULARES NO PROCESSO DE TRANSFECCÃO.** A TRANSFECCÃO DE CÉLULAS COM OS COMPLEXOS CONSISTE EM 4 ETAPAS, ONDE BARREIRAS CELULARES TÊM DE SER ULTRAPASSADAS, NOMEADAMENTE A INTERACÇÃO COM A MEMBRANA CELULAR (ELECTROSTÁTICAS OU COM RECEPTORES CELULARES), ENTRADA NA CÉLULA POR ENDOCITOSE, LIBERTAÇÃO DO ENDO-LISSOSSOMA (ATRAVÉS DA SUA RUPTURA, DE FORMA A EVITAR A DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA) E TRANSPORTE CITOPLASMÁTICO E/OU ENTRADA NUCLEAR. 15
- FIGURA 4. TERAPIA GENÉTICA COM APLICAÇÃO CLÍNICA.** A TERAPIA GENÉTICA *IN VIVO* CONSISTE NA APLICAÇÃO NO ORGANISMO DE DNA OU RNA, DE FORMA DIRECTA OU ATRAVÉS DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS, ENQUANTO EM *EX VIVO*, CÉLULAS SÃO MODIFICADAS NUMA MATRIZ TRIDIMENSIONAL OU EM MONOCAMADA, SENDO NESTE ÚLTIMO CASO ALVO DE SELECÇÃO, PARA POSTERIOR APLICAÇÃO NO ORGANISMO ATRAVÉS DA INJECCÃO DIRECTA OU COM UTILIZAÇÃO DE MATRIZES. 17
- FIGURA 5. ON-AS DIRECCIONADO PARA MRNA DE GFP.** O IMPEDIMENTO ESTÉRICO DA TRADUÇÃO E/OU ACTIVACÃO DA RNASE H, SEGUIDA DE DEGRADAÇÃO DO MRNA QUE POSSUI A INFORMAÇÃO PARA A SÍNTESE DE GFP, FAZ COM QUE A EXPRESSÃO DESTA PROTEÍNA SEJA REDUZIDA. NOTE-SE QUE A SEQUÊNCIA DO MRNA ESTÁ ESCRITA NO SENTIDO 5'-3', ENQUANTO A DO ON ESTÁ NO SENTIDO INVERSO (COMPLEMENTARIEDADE E ANTIPARALELISMO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS)..... 23
- FIGURA 6. PRINCIPAIS MODIFICAÇÕES EFECTUADAS NOS ON.** A MAIORIA DOS ON SÃO ORIGINADOS A PARTIR DE UMA MOLÉCULA-MÃE - O FOSFODIÉSTER. ESTAS MODIFICAÇÕES QUÍMICAS PODEM

OCORRER NAS POSIÇÕES R_x EM DIFERENTES COMBINAÇÕES, DANDO ORIGEM AOS DIVERSOS TIPOS DE “NUCLEÓTIDOS” PARA A CONSTRUÇÃO DE UM ON-AS (ESQUEMA DE SETAS). NO ENTANTO, AS MODIFICAÇÕES PODEM SER TÃO RADICAIS, QUE ORIGINAM ESTRUTURAS DIFERENTES, COMO POR EXEMPLO OS PNA, LNA OU N-MORFOLINO (À DIREITA NA FIGURA). 27

FIGURA 7 - OLIGONUCLEÓTIDOS QUIMÉRICOS, (A) END-MODIFIED; (B) CENTRALLY-MODIFIED..... 31

FIGURA 8. COMPARAÇÃO ENTRE MECANISMO ANTISENSE MEDIADO POR ON-AS, siRNA E RIBOZIMAS. NO MECANISMO ANTISENSE, O ON-AS QUANDO HIBRIDIZADO COM O mRNA-ALVO, FORMA UM SEGMENTO EM DUPLA CADEIA QUE IMPEDE SÍNTESE PROTEICA POR RAZÕES ESTÉRICAS OU ACTIVAÇÃO DA RNAASE H. NA ENTREGA DE siRNA NA CÉLULA, ESTA MOLÉCULA SOFRE UMA FRAGMENTAÇÃO POR PARTE DE UM COMPLEXO ENZIMÁTICO (DICER). O FRAGMENTO É DEPOIS DESNATURADO PELO COMPLEXO RISC, FICANDO EM CADEIA SIMPLES. ESTA LIGA-SE DEPOIS POR COMPLEMENTARIEDADE AO mRNA, PROMOVEDO A SUA DEGRADAÇÃO. NO MECANISMO COM RIBOZIMAS, ESTA RECONHECE UMA DETERMINADA SEQUÊNCIA NO mRNA-ALVO, LEVANDO À SUA DEGRADAÇÃO POR CLIVAGEM ENZIMÁTICA (ACTUA DE FORMA MUITO SEMELHANTE AO SISTEMA DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO). 36

FIGURA 9. EXEMPLOS DE MOLÉCULAS UTILIZADAS NA TERAPIA GENÉTICA. ESTAS MOLÉCULAS PODEM SER DE DIFERENTES CLASSES QUÍMICAS, COMO ESTRUTURAS DE CARBONO (NANOTUBOS), PROTEÍNAS, LÍPIDOS (MICELAS OU VESÍCULAS), NANOPARTÍCULAS INORGÂNICAS, POLÍMEROS (LINEARES, RAMIFICADOS OU DENDRÍTICOS). 40

FIGURA 10 - SÍNTESE DE DENDRÍMEROS; (A) MÉTODO DIVERGENTE E (B) MÉTODO CONVERGENTE. . 48

FIGURA 11 - DENDRÍMERO PAMAM, COM AS DIFERENTES CAMADAS QUE CORRESPONDEM ÀS GERAÇÕES. A ADIÇÃO DE UMA GERAÇÃO AUMENTA O NÚMERO DE AMINAS PRIMÁRIAS DE FORMA EXPONENCIAL. PODEMOS CONSTATAR QUE ESTE DENDRÍMERO TEM UMA FORMA EM “ESTRELA” DE 4 “BRAÇOS” (DENOMINADOS *DENDRONS*), QUE SÃO IGUAIS UNS AOS OUTROS. POR ISSO, OS PONTOS A VERDE E A AZUL SÃO TAMBÉM LOCALIZADOS EM TODO O DENDRÍMERO (ESTES NÃO ESTÃO REPRESENTADOS PARA FACILITAR A VISUALIZAÇÃO). 50

FIGURA 12 - PLASMÍDEO pCDNA3-EGFP. VECTOR COM O QUAL AS CÉLULAS HELA FORAM TRANSFECTADAS DE FORMA A EXPRESSAREM EGFP DE FORMA ESTÁVEL [157]. 74

FIGURA 13 - FLUORESCÊNCIA VERDE EMITIDA PELA GFP APÓS A SUA EXCITAÇÃO COM A LUMINISCÊNCIA AZUL PROVENIENTE DA AEQUORINA [161]...... 76

FIGURA 14 - FLUORÓFORO TAMRA, DERIVADA DA RODAMINA. A LIGAÇÃO AO ON-AS DÁ-SE NA POSIÇÃO R. 79

FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DENDRÍMEROS PAMAM G5 MODIFICADOS COM (A) 4 E (B) 8 MOLÉCULAS DE ÁCIDO GORDO. NOTE-SE QUE, A DISPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS NA FIGURA É UNIFORME, MAS ISSO PODERÁ NÃO REPRESENTAR O QUE REALMENTE ACONTECE, UMA VEZ QUE ESTES FORAM MODIFICADOS DE UMA FORMA ALEATÓRIA, PODENDO ESTES SE ENCONTRAREM MAIS PRÓXIMOS UNS DOS OUTROS. 80

- FIGURA 16 - DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO DOS DENDRÍMEROS NÃO COMPLEXADOS (0,1MG/ML) E DOS DENDRÍPLEXOS, A DIFERENTES RAZÕES NP, DETERMINADOS POR DLS. OS RESULTADOS PROVÊM DE MEDIÇÕES EM TRIPLICADO, INDEPENDENTES, E ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS COMO A MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO, EM NM. 94**
- FIGURA 17 - PDI DOS COMPLEXOS PREPARADOS NAS DIFERENTES RAZÕES NP, DETERMINADOS POR DLS. OS RESULTADOS PROVÊM DE MEDIÇÕES EM RÉPLICAS INDEPENDENTES E ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS COMO A MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO..... 96**
- FIGURA 18 - POTENCIAL-Z DOS DENDRÍPLEXOS PREPARADOS NAS DIFERENTES RAZÕES NP. OS RESULTADOS PROVÊM DE MEDIÇÕES EM TRIPLICADO, INDEPENDENTES, E ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS COMO A MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO, EM MV. 97**
- FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA CONDENSAÇÃO DO ON ANTISENSE-TAMRA, ONDE DNA CORRESPONDE À FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO ON-ANTISENSE-TAMRA NA SUA FORMA LIVRE. OS RESULTADOS PROVÊM DE MEDIÇÕES EM TRIPLICADO, INDEPENDENTES, E ENCONTRAM-SE REPRESENTADOS COMO A MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO, EM RFU. 98**
- FIGURA 20 - ESTUDO DO PROCESSO DE DESCOMPLEXAÇÃO ENTRE OS ON-ANTISENSE-TAMRA E OS DENDRÍMEROS NATIVOS POR ADIÇÃO DE SDS. (A) ESPECTROS DE EMISSÃO APRESENTADOS PELA SOLUÇÃO TAMPÃO E PELA SOLUÇÃO DE ON LIVRE, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE SDS; (B) ESPECTROS DE EMISSÃO APRESENTADOS PELAS SOLUÇÕES DE DENDRÍMERO G5 LIVRE E DOS SEUS COMPLEXOS COM ON NA RAZÃO NP2; (C) ESPECTROS DE EMISSÃO APRESENTADOS PELAS SOLUÇÕES DE DENDRÍMERO G5 LIVRE E DOS SEUS COMPLEXOS COM ON NA RAZÃO NP6; (D) ESPECTROS DE EMISSÃO APRESENTADOS PELAS SOLUÇÕES DE DENDRÍMERO G5 LIVRE E DOS SEUS COMPLEXOS COM ON NA RAZÃO NP10. A INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA ESTÁ EXPRESSA EM RFU. 100**
- FIGURA 21 - ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR, 48 H E 72 H APÓS A TRANSFECCÃO. OS RESULTADOS ESTÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO, EM PORCENTAGEM RELATIVAMENTE AO CONTROLO (CÉLULAS APENAS EXPOSTAS À SOLUÇÃO TAMPÃO). FORAM FEITAS 8 RÉPLICAS PARA CADA EXPERIÊNCIA). 103**
- FIGURA 22 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS HELA PEGFP 48 H APÓS A TRANFECCÃO. AMPLIAÇÃO: 100X (ESCALA = 100 µM) 106**
- FIGURA 23 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS HELA PEGFP 72 H APÓS A TRANFECCÃO. AMPLIAÇÃO: 100X (ESCALA = 100 µM) 107**
- FIGURA 24 - AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DE EGFP NAS CÉLULAS HELA PEGFP, 48H E 72 H APÓS A TRANFECCÃO. OS RESULTADOS ESTÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO, EM RFU/MG PROTEÍNA. 108**
- FIGURA 25 - AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DE EGFP NAS CÉLULAS HELA PEGFP, 48H APÓS A TRANFECCÃO. OS RESULTADOS ESTÃO REPRESENTADOS COMO MÉDIA ± DESVIO-PADRÃO, EM RFU/MG PROTEÍNA. 109**

FIGURA 26 - IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS HELA PEGFP APÓS TRANSFEÇÃO COM COMPLEXOS PREPARADOS COM OLIGONUCLEÓTIDO *ANTISENSE* MARCADO COM TAMRA (VERMELHO), PARA FINS DE VISUALIZAÇÃO DO FENÓMENO DE INTERNALIZAÇÃO. OS NÚCLEOS CELULARES ESTÃO MARCADOS COM DAPI (AZUL). AMPLIAÇÃO = 1000 X (ESCALA = 10 μM). 113

Lista de Tabelas

TABELA 1 - DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS ANTISENSE PELA ISIS PHARMACEUTICALS E PARCEIROS [143].	59
TABELA 2 - OUTROS GENES ESTUDADOS COM MAIOR FREQUÊNCIA PARA APLICAÇÃO DA TERAPIA ANTISENSE [7, 12, 16, 17, 39].	64
TABELA 3 - NOMENCLATURA E RESPECTIVAS CARACTERÍSTICAS DOS DENDRÍMEROS PAMAM G5 FUNCIONALIZADOS COM GRUPOS ALQUILO.	83
TABELA 4 - CONDIÇÕES DE TRANSFEÇÃO A QUE FORAM SUJEITAS AS CÉLULAS. PARA CADA UMA DAS SITUAÇÕES REPRESENTADAS FORAM REALIZADOS 8 RÉPLICAS (8 POÇOS DE UMA PLACA DE 96 POÇOS), SENDO QUE TODAS AS CONDIÇÕES FORAM FEITAS EM DUPLICADO PARA OS INTERVALOS DE TEMPO 48 H E 72 H, NOMEADAMENTE.	87
TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES A E B, QUE DEPOIS SÃO MISTURADAS NUMA PROPORÇÃO DE 50:1, RESPECTIVAMENTE.	90
TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES EM $\mu\text{G}/\text{ML}$, DE DENDRÍMEROS NAS RESPECTIVAS RAZÕES NP, CONSIDERANDO 5 μG DE ON <i>ANTISENSE</i>.	93
TABELA 7 - SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO DE EGFP NAS CÉLULAS HELA PEGFP, APÓS TRANSFEÇÃO COM COMPLEXOS PREPARADOS COM OS SEGUINTE DENDRÍMEROS.	111

Lista de Acrónimos

	%	Porcentagem	
	p/p	Peso-peso	
	v/v	Volume-volume	
	°C	Graus Celsius	
	µL	Microlitro	
	µm	Micrómetro	
	Å	Ångström	
	ζ	Zeta	
	λ	Comprimento de onda	
Símbolos	cm	Centímetro	
	cm ²	Centímetro quadrado	
	h	Hora	
	kb	Kilobase	
	kDa	kiloDalton	
	M	Molar	
	Mb	Megabase	
	mg	Miligrama	
	min	Minuto	
	mL	Militro	
	mV	MiliVolt	
	nm	Nanómetro	
	s	Segundo	
	A	A	Adenina
		AA	Antibiótico-Antimicótico
		AFM	Atomic Force Microscopy / Microscopia de Força Atómica
B	BCA	Bicinchoninate acid / Ácido bicinonínico	
	Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2 / Linfoma de Células B 2	

	bFGF	basic Fibroblast Growth Factor / Factor de crescimento fibroblástico básico
C	C	Citosina
	CG	Citosina e Guanina
	CMV	Cytomegalovirus / Citomegalovírus
D	DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole / 4',6-diamidino-2-fenilindole
	DC- colesterol	3β-(N-(N',N'-dimethylaminoethane)- carbamoyl)cholesterol chlorohydrate / 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)- carbamoil)colesterol clorohidrato
	DDAB	Dimethyldioctadecyl ammonium bromide / Brometo de dimetildioctadecilamónio
	DLS	Dynamic Light Scattering / Difusão dinâmica da luz
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Meio Eagle com modificações Dulbecco
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	DNA	Deoxyribonucleic acid / Ácido Desoxirribonucleico
	DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine / 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
	DOTMA	N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N- trimethylammonium chloride / Cloreto de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N- trimetilamónio
	dsDNA	double strand Deoxyribonucleic acid / Ácido Desoxirribonucleico de cadeia dupla
E	EDA	Etilenodiamina
	EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid / Ácido etilenodiamino tetraacético
	EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein / Proteína verde fluorescente otimizada

	EMA	European Medicines Agency / Agência Europeia de Medicamentos
	EUA	Estados Unidos da América
F	FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting / Citometria de fluxo activada por fluorescência
	FBS	Foetal Bovine Serum / Soro fetal bovino
	FDA	Food and Drug Administration / Agência America para a Administração de Alimentos e Fármacos
	G	Guanina
	G418	Geneticin / Geneticina
	G5	Geração 5
	G5.La4	Dendrímero PAMAM G5, com 4 ácidos láuricos conjugados
	G5.La8	Dendrímero PAMAM G5, com 8 ácido láurico conjugados
G	G5.My4	Dendrímero PAMAM G5, com 4 ácido mirístico conjugados
	G5.My8	Dendrímero PAMAM G5, com 8 ácido mirístico conjugados
	G5.Pa4	Dendrímero PAMAM G5, com 4 ácido palmítico conjugados
	G5.Pa8	Dendrímero PAMAM G5, com 8 ácido palmítico conjugados
	GFP	Green Fluorescent Protein / Proteína verde fluorescente
	HA	Hyaluronic acid / Ácido hialurónico
H	HBG	Hepes buffered-Glucose / Tampão Hepes com glucose
	hEGF-2	Human Epidermal Growth Factor-2 / Factor de crescimento epidérmico humano-2
	HeLa	Henrietta Lacks cells / Células Henrietta Lacks
L	La	Lauric acid / Ácido láurico

	LDL	Low-Density Lipoprotein / Lipoproteína de baixa densidade
	LNA	Locked nucleic acid / Ácido nucleico bloqueado ou cíclico
	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase / Proteína cinase activada por mitogénios
	MOE	2'-O-(2'-Metoxi)etil
M	mRNA	messenger Ribonucleic acid / Ácido Ribonucleico mensageiro
	MSC	Mesenchymal Stem Cells / Células estaminais mesenquimatosas
	My	Myristic acid / ácido mirístico
N	NK	Natural Killer / Assassina natural
	NP	Razão molar amina/fosfato
	OLON	Oleoyl ornithinate / oleoil ornitinato
O	OMe	2'-O-Metil
	ON-AS	Oligonucleótido Antisense
	Pa	Palmitic acid / ácido palmítico
	PAMAM	Poly(amidoamine) / Poli(amidoamina)
	PBS	Phosphate Buffered Saline / Solução salina de tampão fosfato
	PDI	Polydispersivity Index / Índice de Polidispersão
	PDMAEMA	Poly((2-dimethylamino)ethylmethacrylate) / Poli((2-dimetilamino)etilmetacrilato)
P	pDNA	Plasmid Deoxyribonucleic acid / Ácido Desoxirribonucleico plasmídico
	PEAA	Poly(ethylacrylic acid) / poli(ácido etilacrílico)
	PEG	Poly(ethyleneglycol) / polietilenoglicol
	PGA	Polyglycolic acid / Poli(ácido glicólico)
	PHPMA	Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) / Poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida)
	PEI	Polyethyleneimine / polietileneimina

	PLA	Poly(lactic acid) / Poli(ácido láctico)
	PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid) / poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
	PLL	Poly(L-lysine) / poli(L-lisina)
	PPI	Poly(propyleneimine) / Poli(propileneimina)
	pré-mRNA	pré-messenger Ribonucleic acid / Ácido RiboNucleico mensageiro imaturo
	PTMAEMA	Poly(2-(trimethylamino)ethylmethacrylate)) / Poli(2-(trimetilamino)etilmetacrilato))
	PVP	Polyvinylpyrrolidone / Polivinilpirrolidona
R	RFU	Relative Fluorescence Units / Unidades de Fluorescência Relativa
	RGD	Arginina-glicina-aspartato
	RISC	RNA-Induced Silencing Complex / Complexo de silenciamento induzido por RNA
	RLB	Reporter Lysis Buffer / Tampão para lise celular
	RMN	Ressonância Magnética Nuclear
	RNA	Ribonucleic acid / Ácido Ribonucleico
	RNase H	Ribonuclease H
	RSV	Rous Sarcome Virus / Vírus do Sarcoma de Rous
		SDS
S	siRNA	Small interference ribonucleic acid / Pequeno Ácido Ribonucleico de interferência
	SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
	ssDNA	Single strand Deoxyribonucleic acid / Ácido Deoxirribonucleico de cadeia simples
	ssRNA	Single strand Ribonucleic acid / Ácido Ribonucleico de cadeia simples
T	T	Timina
	TAMRA	Carboxitetrametilrodamina
	TF	Transcription Factor / Factores de Transcrição

	TR	Transcriptase Reversa
	tRNA	Transference Ribonucleic acid / Ácido RiboNucleico de transferência
U	UV	Ultravioleta
	vEGF	Vascular Endothelial Growth Factor / Factor de crescimento vascular endotelial
V	VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

Capítulo I

Terapia genética: O silenciamento de genes

Capítulo I

Terapia genética: O silenciamento de genes

Resumo

Existem conceitos básicos que têm de ser conhecidos para compreendermos o mecanismo de funcionamento do silenciamento de genes. Esses conceitos, abordados neste capítulo, vão desde a síntese proteica até aos mecanismos utilizados pelas células na internalização de moléculas. Só depois se abordarão temas como a terapia genética e a sua vertente de silenciamento de genes, através da transfecção de células com complexos formados por um sistema de transporte e material genético.

No silenciamento de genes, são utilizados diversos tipos de moléculas, desde oligonucleótidos *antisense* (ON-AS), pequenos RNA de interferência (siRNA) ou ribozimas. Dar-se-á relevo às moléculas constituídas por simples cadeias nucleotídicas fosfodiéster, com ou sem modificações químicas e que estão na base do mecanismo de silenciamento de genes (terapia *antisense*). Estas alterações químicas visam conferir às moléculas as propriedades físico-químicas desejadas como estabilidade e resistência à degradação enzimática. O mesmo acontece com os métodos de entrega de material genético às células, que sofrem evolução, quer sejam estes virais ou não virais (físicos ou químicos). A atenção vira-se principalmente para a utilização de métodos químicos como o uso de polímeros sintéticos, entre os quais se encontram a polietileneimina (PEI) e os dendrímeros poli(amidoamina) (PAMAM).

Há que ter conhecimento das etapas e obstáculos envolvidos na transfecção de células com material genético, e compreender os processos e mecanismos de acção para se atingir efeitos *antisense*.

Têm sido realizados inúmeros estudos *in vitro* e *in vivo* relativamente à aplicação da terapia *antisense*, sendo que existem já alguns produtos

comercializados. Alguns desses estudos serão destacados por serem tão importantes para o futuro da investigação em diversas áreas da medicina.

1. Funcionamento de uma célula: conceitos básicos

A célula é a unidade básica da vida, pois possui a capacidade de obter energia do ambiente e usá-la para crescer e se multiplicar. Esta é constituída por diversas estruturas, cada uma com uma função definida.

1.1. A célula e o seu centro de comando

Destacando apenas a célula animal, o conteúdo interno desta encontra-se isolado do exterior, através de uma membrana plasmática formada por uma bicamada fosfolipídica. Nesta estão localizadas diversas macromoléculas, designadamente, proteínas com funções distintas como a comunicação intercelular, receptores, canais de transporte e bombas que fazem, então, o contacto do meio extracelular com o intracelular [1-3]. É, então, no citoplasma que se encontram os diferentes organelos como o núcleo, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, as mitocôndrias, etc., e onde são sintetizadas todas as moléculas essenciais à célula.

O centro de comando de uma célula situa-se no núcleo. Este organelo é delimitado por uma membrana porosa designada invólucro nuclear, e é nele que se encontra o património genético da célula [4], o DNA. As moléculas de DNA são sequências que resultam da combinação dos nucleótidos A, T, C e G, formando segmentos designados genes. Estes contêm a informação para a síntese proteica, essencial para que processos como a proliferação, o crescimento e a morte decorram com normalidade [4, 5].

1.2. Expressão genética: transcrição e tradução

A síntese proteica é um processo com uma série de etapas que se inicia no núcleo e termina no citoplasma. Resumidamente, a informação contida no gene é copiada no núcleo através do processo de transcrição (**Figura 1**). Tal

origina uma molécula de pré-mRNA complementar à cadeia de DNA molde [6]. Esta molécula de pré-mRNA, ainda no núcleo, irá sofrer um processo de maturação que originará um mRNA maduro [7], sendo este depois encaminhado para o citoplasma através dos poros nucleares, onde se irá associar a ribossomas para a síntese proteica.

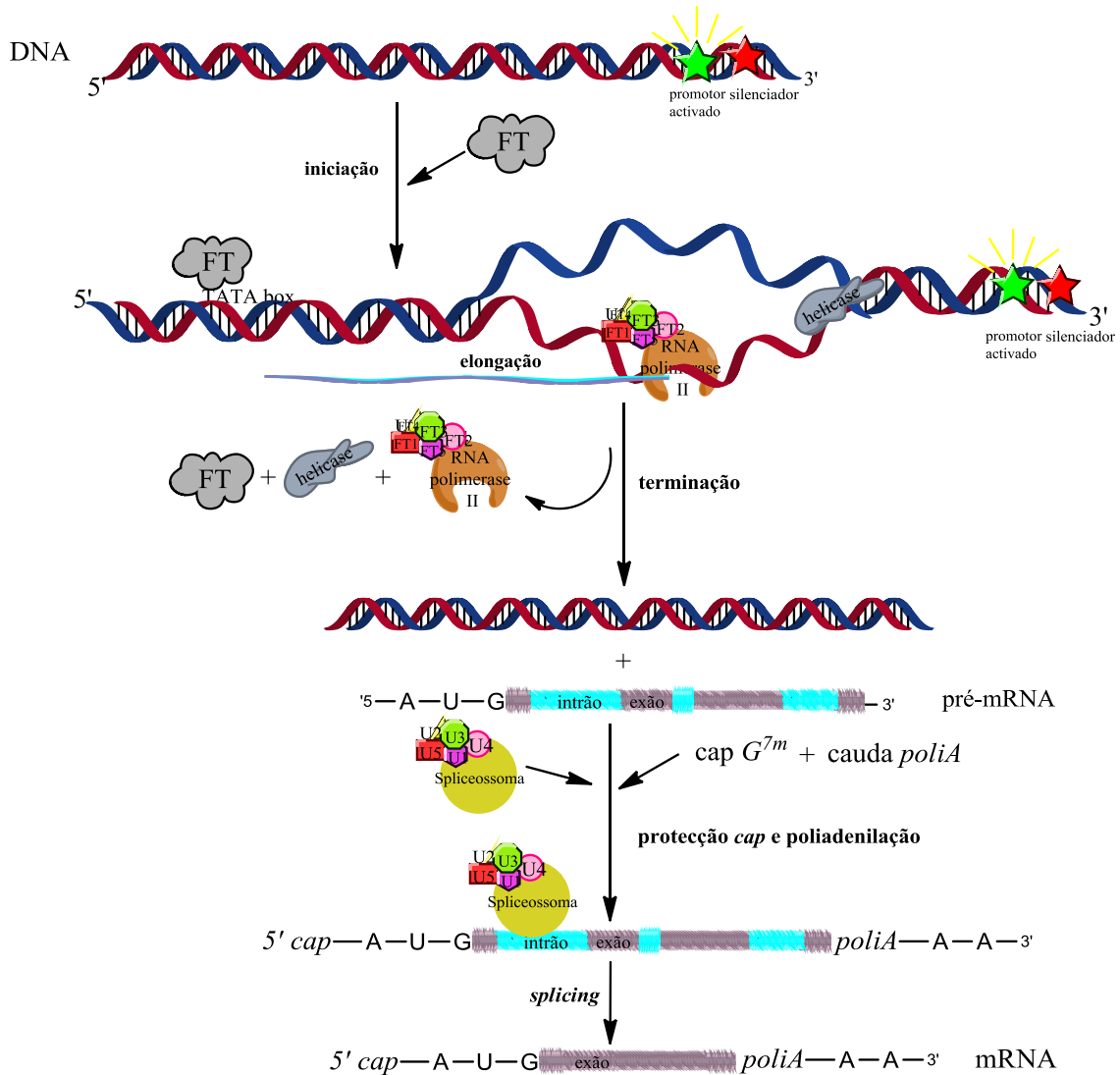


Figura 1. Processo de transcrição de um gene e processamento em mRNA. A transcrição é um processo com três etapas, nomeadamente iniciação, elongação e terminação. Na iniciação ocorre a ligação de factores proteicos ao promotor *TATA box*. Isto faz com que o complexo enzimático RNA polimerase II inicie a elongação, através da polimerização de ribonucleótidos no sentido 5'-3', com o auxílio da helicase que desnatura a dupla hélice a jusante. A terminação dá-se com a interrupção da transcrição por dissociação do complexo enzimático e libertação do pré-mRNA. O pré-mRNA sofre em seguida um processo de maturação que envolve a adição de uma molécula *cap* à

extremidade 5', a reacção de *splicing* (remoção dos intrões e religação dos exões) e, por fim, a poliadenilação da extremidade 3'.

É nos ribossomas que começa, então, o processo de tradução do mRNA em proteína (Figura 2), com a intervenção de moléculas de tRNA que irão promover a elongação da cadeia polipeptídica [8]. As proteínas são, seguidamente, alvo de modificações estruturais e químicas que as tornam activas [5, 9].

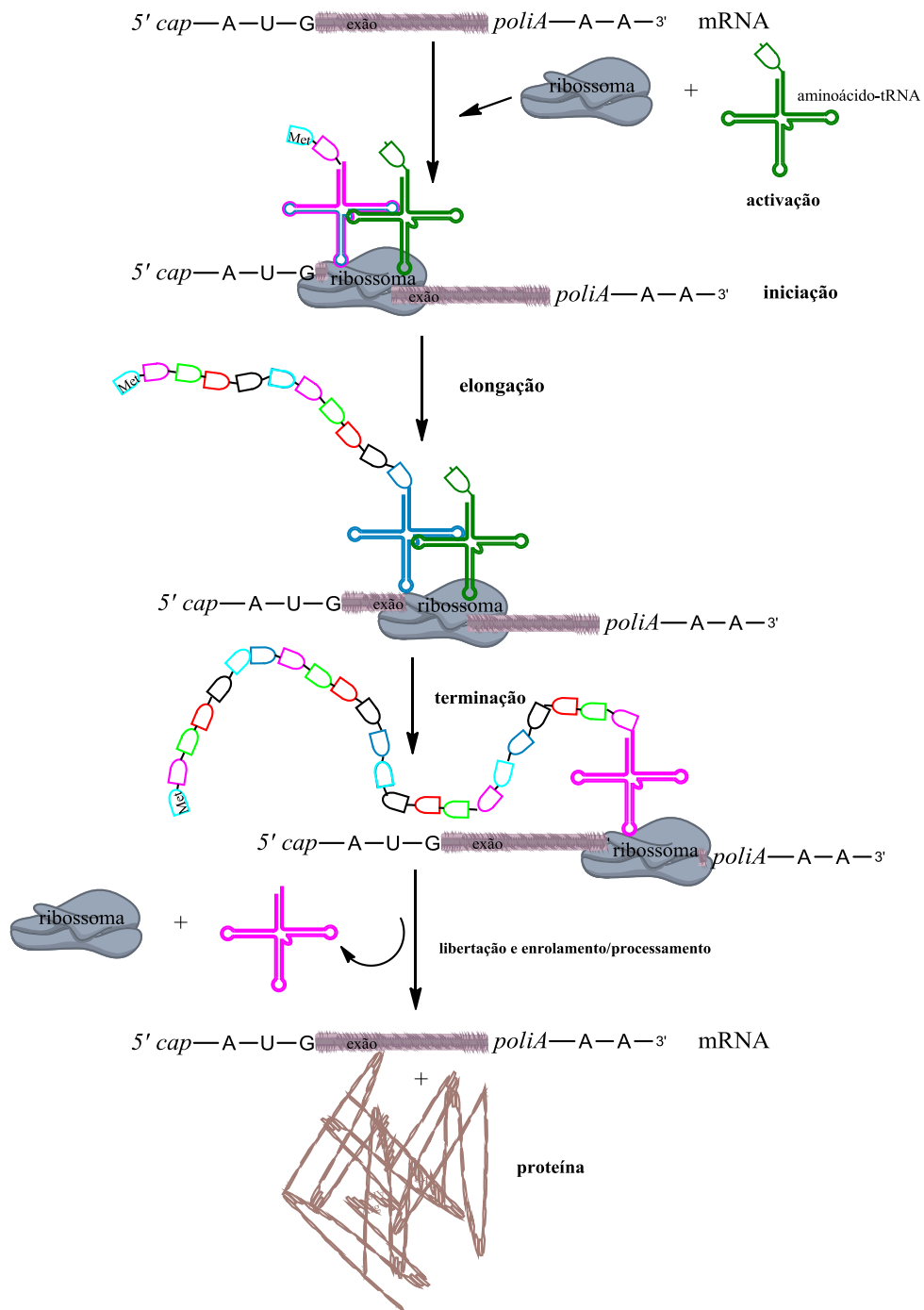


Figura 2. Processo de tradução de mRNA em proteína. A síntese de proteínas consiste num processo de 5 etapas, sendo elas a activação do aminoácido (ligação deste ao tRNA), iniciação (adição de aminoácidos), alongação (formação da cadeia peptídica com a intervenção de factores de alongação), terminação (reconhecimento do códon terminal) e libertação, enrolamento e processamento (estrutura tridimensional adquirida com intervenção de *chaperonas* e modificações químicas como glicosilações, metilações, fosforilações, etc.).

A síntese de proteínas por parte da célula apenas é possível devido a mecanismos de regulação da expressão genética coordenados no tempo e no espaço, sendo fortemente influenciada pelo tipo de célula e estímulos externos. A estrutura e funções das células são determinadas pelas proteínas nelas expressas, sendo que o tipo e a quantidade de proteína são regulados na fase inicial da transcrição, por factores de transcrição (*TF*), promotores (*enhancers*) ou bloqueadores (*silencers*). Qualquer alteração destes mecanismos pode levar ao desenvolvimento de patologias como a proliferação maligna ou neurodegeneração [5, 10, 11].

A célula é uma entidade pequena, no entanto, composta por diversas estruturas, e envolvendo múltiplos e complexos mecanismos, de forma a garantir o seu bom funcionamento.

2. Terapia genética

Com o sequenciamento completo do genoma humano e os grandes avanços na Genética Celular e Molecular, tornou-se possível a identificação de novas drogas, vias de sinalização e moléculas reguladoras, que serão úteis para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas [12]. Isto é possível, graças aos avanços nos estudos de produtos genéticos (as proteínas), por exemplo, com a introdução dos genes de interesse em vectores (como plasmídeos), seguida da sua entrega e internalização nas células e expressão da proteína-alvo por parte destas.

2.1. Objectivos e importância

A terapia genética pode ser utilizada em diversas áreas da medicina como a Engenharia Genética e Regeneração de Tecidos, através da introdução de material genético, seja este DNA ou RNA [13], em células. O tratamento recorrendo a este tipo de terapia visa diferentes objectivos, como a substituição de um gene que se encontra mutado pelo que não possui mutação, a introdução de um novo gene na célula resultando assim na expressão de uma nova proteína com funções terapêuticas, ou ainda, a modulação da expressão de genes endógenos e exógenos [13-15]. Estas alterações ao nível molecular são importantes armas no tratamento de doenças adquiridas ou hereditárias, nomeadamente, infecções virais, cancros, doenças auto-imunes, entre outras [14].

Esta capacidade de manipulação da expressão genética nas células, transformou-se numa importante ferramenta para o estudo das funções dos genes [16], designadamente, quais os seus produtos, como são regulados, como poderão ser modulados e quais as suas aplicações terapêuticas [7, 17, 18].

Anteriormente ao aparecimento desta tecnologia e da sua aplicação em células para a regulação da proliferação, diferenciação e regeneração de tecidos, todos estes processos celulares só podiam ser controlados através da administração contínua e por vezes repetida, de elevadas concentrações de moléculas, como factores de transcrição, proteínas, citocinas, factores de crescimento, entre outros [14, 19]. O processo é, assim, pouco prático, tanto para o paciente como para o médico.

Desta forma, a terapia genética apresenta o potencial para revolucionar a abordagem terapêutica, na medida em que os genes de interesse expressos, de forma estável ou transiente mas suficiente, pelas células tornam possível a produção controlada e prolongada destes factores [14].

2.2. A terapia genética: etapas e obstáculos

A entrega de material genético em células é uma área da ciência que se está a desenvolver de uma forma cuja rápida evolução, sendo de natureza multidisciplinar [13], envolve conhecimentos das áreas da Biologia Celular, Genética Celular e Molecular, Química dos Materiais, Bioquímica, Nanomateriais e Biotecnologia.

Para que seja possível a aplicação da terapia genética nas células, existem uma série de passos a serem seguidos e que dependem do conhecimento das diferentes áreas da Ciência. Esses passos compreendem a escolha e preparação do gene ou outro material genético, o método ou sistema de transporte para entrega às células, a optimização das condições experimentais e compreensão de todos os mecanismos envolvidos no processo.

A selecção do material genético é facilitada, uma vez que depende da aplicação e do objectivo a atingir. No entanto, o sistema de transporte continua a ser um problema, pois ainda não existe um sistema de entrega ideal [13].

A transfecção de células com material genético depende de diversos factores, como o tipo de célula, a sua origem, o método de transfecção, o sistema de entrega, o tipo de material genético, o pH do meio, a

concentração de iões, entre outros. Estes são alvo de optimização, de forma a alcançar uma transfecção com níveis satisfatórios.

De entre os factores acima enumerados, o método e sistema de entrega utilizados na transfecção são muito importantes. Existem diversas técnicas para a transfecção de células, nomeadamente, métodos virais e não-virais [14]. No entanto, em ambos, o material genético possui um conjunto de barreiras (físicas e químicas) a serem ultrapassadas, com o intuito de chegar a um nível aceitável das suas funções, sem provocar grandes danos nas células.

Na transfecção, o material genético depara-se com a presença de barreiras [20, 21] em todas as etapas, seja a transfecção *in vitro* ou *in vivo*. *In vivo*, o número de barreiras é superior, especialmente se a via de exposição for sistémica, uma vez que há a possibilidade de interacção com componentes em circulação no sangue como as proteínas séricas e as células sanguíneas [13]. Há que considerar, ainda, factores e fenómenos como o tempo de semi-vida dos componentes de transfecção e a taxa de depuração e eliminação destes pelo organismo.

O material genético (DNA ou RNA) antes de ser internalizado pelas células, terá que ser protegido da degradação enzimática e eliminação [13, 14], por exemplo, através da complexação com um sistema de entrega. Além disso, o ácido nucleico sendo uma molécula polianiónica e hidrofílica, não consegue atravessar facilmente a bicamada lipídica que tem um carácter hidrofóbico e superfície carregada negativamente [19, 22], havendo, por isso, repulsão entre cargas idênticas. Esta situação é então resolvida através da formação de complexos.

Ao chegar às células-alvo, os complexos ácido nucleico-sistema de entrega têm que atravessar a membrana plasmática para exercerem as suas funções nas células. Existem evidências de que estes complexos são internalizados pelas células via endocítica [23], despoletada por uma desestabilização da membrana ou mediada por receptores celulares, formando-se vesículas por invaginação da membrana celular.

A vesícula formada no processo de endocitose é denominada de endossoma, existindo na sua membrana transportadores membranares de

protões. Quando o seu interior sofre uma acidificação pelo bombeamento de protões, esta funde-se com um lisossoma (vesícula semelhante, com inúmeras enzimas no seu interior), levando à degradação do seu conteúdo. Algumas das enzimas que intervêm neste processo de digestão são nucleases, proteases, lipases, sulfatases, fosfatases, todas elas activas apenas em meio ácido, com valores de pH a variar entre 3 e 6 [24, 25].

A internalização endocítica dos complexos (Figura 3) faz com que, no fim deste processo, estes se encontrem no interior de um endo-lisossoma [8]. Para que a transfecção seja efectiva, os complexos terão de evitar a degradação enzimática, escapando do interior da vesícula após a sua ruptura [19].

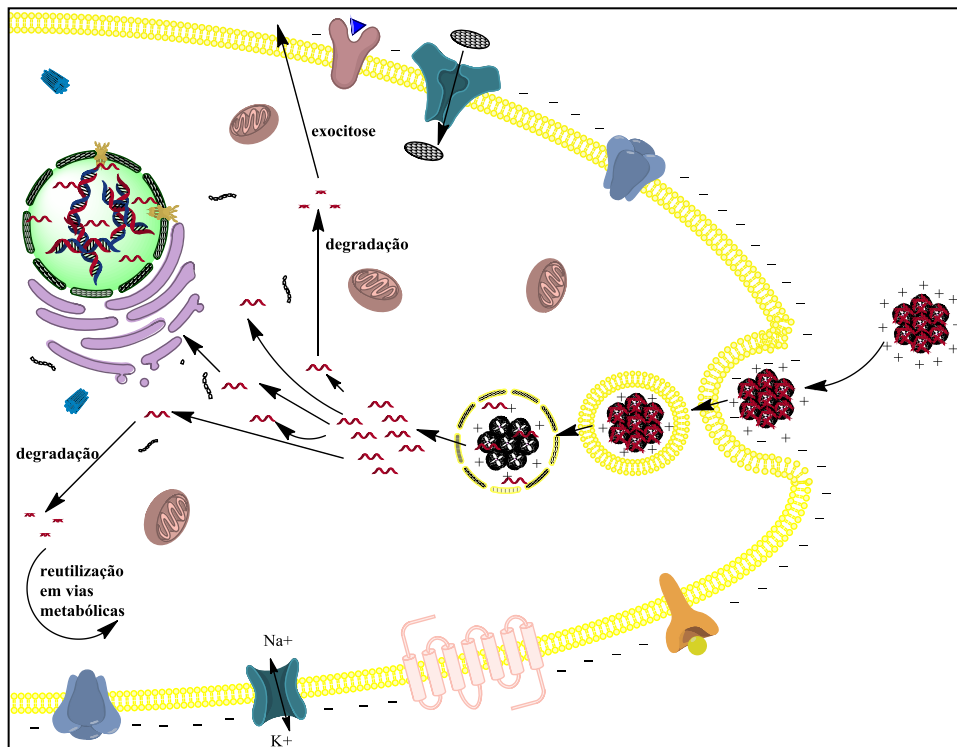


Figura 3. Internalização de complexos via endocítica e barreiras celulares no processo de transfecção. A transfecção de células com os complexos consiste em 4 etapas, onde barreiras celulares têm de ser ultrapassadas, nomeadamente a interacção com a membrana celular (electrostáticas ou com receptores celulares), entrada na célula por endocitose, libertação do endo-lisossoma (através da sua ruptura, de forma a evitar a degradação enzimática) e transporte citoplasmático e/ou entrada nuclear.

A ruptura do endo-lisossoma e libertação do seu conteúdo prende-se com um papel importante do sistema de entrega do material genético neste

processo. Muitos sistemas de transporte possuem grupos funcionais com capacidade de facilitar a libertação dos complexos dos endo-lisossomas. É o que acontece com alguns polímeros catiónicos que possuem grupos amina, especialmente os que apresentam aminas terciárias. As aminas terciárias, em condições de pH fisiológico, não se encontram protonadas. A acidificação do interior dos endo-lisossomas através da bomba de prótons, faz o pH baixar. Com isto, as aminas terciárias actuam como "esponja de prótons", reabsorvendo os prótons, fazendo com que o fluxo de prótons não cesse. De forma a contrariar o aumento da carga positiva no interior da vesícula, ocorre simultaneamente, uma contínua entrada de iões cloro, aumento da força iónica e posterior ruptura osmótica da vesícula [14, 26].

A libertação do conteúdo do endo-lisossoma pode ser facilitada através da adição de agentes lisossomotrópicos como a cloroquina, que permeabiliza a membrana do lisossoma [8, 26, 27].

A libertação do material genético desta vesícula pode ocorrer com ele complexado ou não com o sistema de entrega [13, 26]. Isto foi comprovado através do trabalho de Marcusson [28], quando um ON marcado com sonda fluorescente foi encontrado no núcleo, mas a sonda do sistema de transporte (lipossoma) não foi encontrada.

Ainda assim, as barreiras não se ficam por aqui. Após a libertação endossómica, o material genético, complexado ou não, deve dirigir-se ao núcleo, se este for o seu destino. Se o destino for o citoplasma, o seu caminho termina por aqui, embora tenha que enfrentar as enzimas aí existentes. No entanto, se a paragem final for o núcleo, o material genético depara-se com uma complexa matriz de proteínas [26], fibras e filamentos de actina, que dificulta este transporte, assim como as múltiplas enzimas que aí circulam e que poderão degradar o ácido nucleico. Outros estudos referem que esta complexa matriz de filamentos está envolvida no transporte de material genético do citoplasma para o núcleo [29].

A maior barreira para a terapia genética [19], o invólucro nuclear [26], é apenas acessível através dos poros nucleares, limitando por isso, as dimensões das moléculas que por lá podem passar. O transporte dos ácidos nucleicos do citoplasma para o núcleo pode ser mediado por proteínas, processo que

parece ser dependente de energia [30]. A entrada neste organelo pode ocorrer numa maior quantidade se a célula se encontrar em divisão, fase do ciclo celular onde o invólucro nuclear está mais permeável [16, 19].

2.3. Aplicação terapêutica no organismo

A terapia genética pode ser alcançada através de distintas formas (Figura 4). Estas podem ser divididas em duas grandes classes, nomeadamente, as que são aplicadas de forma directa no organismo (*in vivo*) e mediada por células (*ex vivo*).

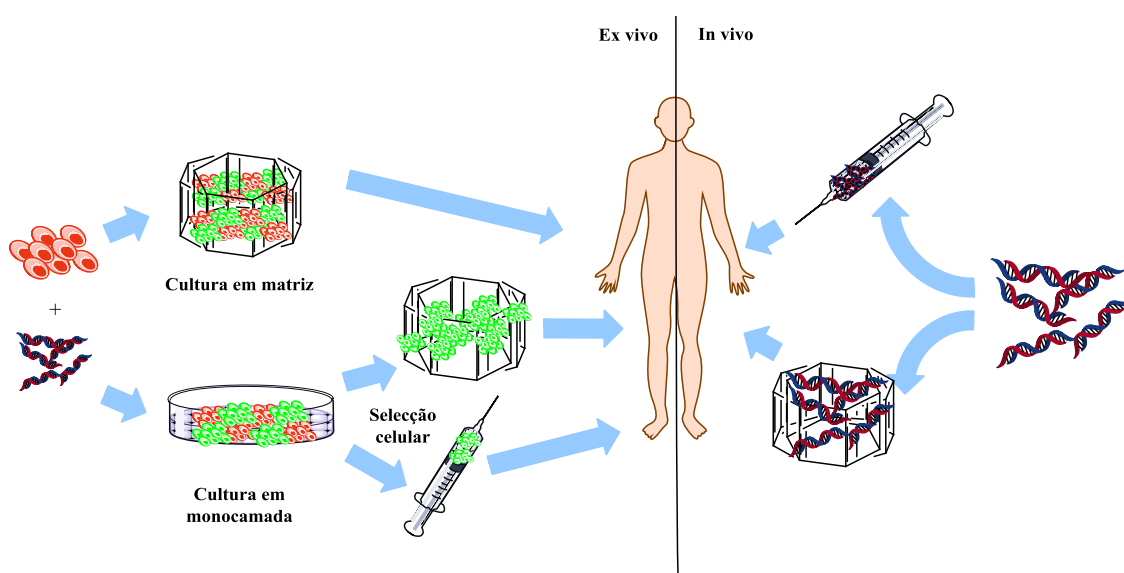


Figura 4. Terapia genética com aplicação clínica. A terapia genética *in vivo* consiste na aplicação no organismo de DNA ou RNA, de forma directa ou através de matrizes tridimensionais, enquanto em *ex vivo*, células são modificadas numa matriz tridimensional ou em monocamada, sendo neste último caso alvo de selecção, para posterior aplicação no organismo através da injeção directa ou com utilização de matrizes.

A aplicação no organismo pode ser realizada com a injeção directa do material genético nas células ou tecido, ou por outro lado, através do implante de uma matriz tridimensional na qual o material genético se encontra disperso, promovendo assim uma libertação prolongada e controlada [13, 14].

Já a terapia genética mediada por células, sejam as células de origem autóloga (provenientes do paciente) ou alogenética (provêm de um dador), consiste na transformação das células em laboratório. Estas células podem ser modificadas em cultura de monocamada ou numa matriz tridimensional, sendo depois transplantadas para o paciente, exercendo assim a sua função de expressão proteica [14].

3. O silenciamento de genes

A terapia genética pretende atingir diversos objectivos, e como referido anteriormente, depende da aplicação. Esta pode ser a substituição de um gene defeituoso, a introdução de um gene para a expressão de uma nova proteína ou ainda a regulação da expressão genética, através da amplificação ou silenciamento de um gene específico.

Existem três formas de se atingir o silenciamento de um gene, nomeadamente, utilizando ON-AS, siRNA e ribozimas. Estes três mecanismos de silenciamento serão abordados, sendo que será dado maior ênfase aos ON-AS, uma vez que é disso que esta dissertação trata.

3.1. Oligonucleótidos, siRNA e ribozimas: a tríade para o silenciamento

Antes de nos dedicarmos à exploração pormenorizada da temática do silenciamento de genes, é imperativo debruçarmo-nos sobre o aparecimento desta vertente da terapia genética e todos os termos relacionados, assim como dos mecanismos existentes para atingir o anulamento ou redução da expressão de um gene numa proteína.

O conceito *antisense* surgiu em estudos na década de 60, depois de se verificar que seres procariotas utilizavam cadeias de RNA para silenciar genes [12]. De uma forma geral, o silenciamento de genes através de um mecanismo *antisense* envolve o uso de moléculas de DNA, RNA ou análogos químicos, capazes de reconhecer e hibridizarem de forma específica e complementar, segundo os princípios de Watson-Crick, com o mRNA-alvo.

Após alguns anos de investigação, em 1978, Zamecnik e Stephenson conseguiram inibir a replicação do RSV em fibroblastos de galinha, utilizando um ON-AS com 13 nucleótidos complementar ao mRNA-alvo [12, 18, 31, 32]. Surgia, deste modo, uma nova classe de moléculas que poderiam ser utilizadas como drogas, os ON-AS, com a vantagem de possuírem selectividade

e especificidade [16, 17] e de interagirem a nível da expressão genética, ao contrário das drogas convencionais, que interagem directamente com proteínas [7].

A inibição da expressão de um gene em proteína pode ser conseguida através da interferência em diversos processos celulares, como a transcrição de genes em mRNA, maturação do pré-mRNA ou tradução de mRNA em proteína [8, 16, 33, 34], processos esses anteriormente descritos. Esta interferência pode ser, então, ao nível do DNA ou do RNA.

A produção de uma proteína pode ser interdita através da utilização de moléculas (DNA, RNA ou análogos químicos) com a capacidade de se ligarem à dupla cadeia em hélice do DNA, formando uma tripla hélice que impede de forma estérica, a transcrição da informação contida no gene [17, 33-36]. Outras moléculas podem também hibridizar-se ao mRNA-alvo, formando um segmento em dupla cadeia que impede a tradução do mRNA em proteína, por impedimento estérico ou activação de enzimas [8]. Existe ainda uma outra estratégia alternativa, que consiste na entrega de plasmídeos recombinantes, com genes que codificam algumas destas moléculas de RNA anteriormente referidas [7, 8, 16, 37]. Uma vez expressos de forma estável pelas células, existem em maior quantidade, estando por isso, imediatamente disponíveis para o silenciamento imediato e eficiente. No entanto, a transfecção de células com plasmídeos é menos eficiente, pois são moléculas com dimensões muito superiores, havendo também a necessidade de obter uma linha celular estável [16, 18]. Outra desvantagem é que a resistência daqueles a nucleases é menor pois não possuem modificações químicas que conferem propriedades de estabilidade e resistência à degradação [38].

O silenciamento de genes tem sido estudado *in vitro*, olhando sempre para uma futura aplicação *in vivo*, no tratamento de doenças provocadas pela amplificação de uma determinada proteína.

Além dos ON-AS, foram também desenvolvidas outras moléculas que são capazes de exercer um efeito de silenciamento genético, nomeadamente, siRNA e ribozimas (mais à frente desenvolvidos), resultando na diminuição da quantidade de uma proteína específica.

3.2. Silenciamento de genes com oligonucleótidos *antisense*

A terapia *antisense* fazendo uso de ON-AS é das mais comuns. Os ON consistem em pequenas cadeias de DNA ou RNA, na sua forma nativa (fosfodiéster) ou modificadas [39]. Quando internalizadas pelas células, estas são capazes de hibridizar, de forma selectiva e específica a um mRNA-alvo (ou seus precursores) com sequência complementar, através do emparelhamento de bases segundo Watson-Crick, inibindo assim a síntese de uma proteína-alvo [7, 12, 16-19, 36].

3.2.1. Etapas iniciais para a aplicação da terapia *antisense* com oligonucleótidos

Têm de ser seguidos uma série de passos para que esta abordagem terapêutica seja aplicada *in vitro* e posteriormente empregue *in vivo*. Estes passos são igualmente seguidos quando são utilizadas moléculas siRNA ou ribozimas para o silenciamento da expressão de uma proteína.

Primeiramente, há a necessidade de ter conhecimento da doença e dos mecanismos responsáveis pela sua manifestação [17]. Se a fisiopatologia se dever à expressão de uma proteína exógena (por exemplo, um vírus) ou amplificação de uma proteína endógena [39], esta pode, então, ser alvo de terapia *antisense* fazendo com que a sua expressão diminua para valores mais baixos, se possível.

Depois de identificada a proteína, uma pequena sequência do gene que a codifica será conhecida, assim como o mRNA que lhe dá origem. A partir daqui, os ON-AS são desenhados de forma a possuírem uma sequência complementar a uma região do mRNA, e cuja actividade seja melhor e mais eficaz [17].

A escolha da melhor região do mRNA para que o ON-AS se hibridize é muitas vezes realizada através de programas computacionais, de forma a que no final se obtenha uma dupla cadeia com o mRNA, estável e sem formação

de estruturas secundárias ou dímeros entre ON-AS. Mesmo assim, a estratégia empírica parece ter melhores resultados [17, 39-42].

Posteriormente à determinação da sequência do ON-AS, há que considerar a dimensão desta molécula *antisense*, pois terá que ter o número suficiente de bases emparelhadas para levar à inibição da expressão de uma proteína de forma específica e selectiva [17].

Os ON podem ser moléculas constituídas por cadeias de DNA ou RNA. Esta diferença entre o tipo de nucleótidos parece fazer com que estes ajam através de diferentes mecanismos [16]. ON constituídos por ribonucleótidos hibridizam com o mRNA-alvo, formando uma dupla cadeia de RNA, que não é reconhecida pela enzima responsável pela degradação do mRNA-alvo [35], sendo o silenciamento provocado por impedimento estérico [16] e com um possível efeito *antisense* mais forte, devido a uma maior estabilidade da dupla cadeia RNA-RNA [34]. No entanto, se os ON foram cadeias de DNA (um pouco mais resistentes a nucleases do que RNA) [34] e constituídos por nucleótidos capazes de activar a RNase H (facto que veremos mais à frente), o complexo formado com o mRNA é reconhecido pela RNase H e o mRNA pode ser degradado por esta via [16, 39].

3.2.2. Mecanismos de acção

Nas células em cultura ou no organismo, a hibridização do ON-AS com o mRNA-alvo (Figura 5) leva à formação de um segmento em dupla cadeia, onde o ON é a cadeia *antisense* e o mRNA a cadeia *sense* [17]. Este complexo pode, nesse caso, agir através de dois mecanismos: o impedimento estérico ou activação enzimática [8, 12, 33, 36].

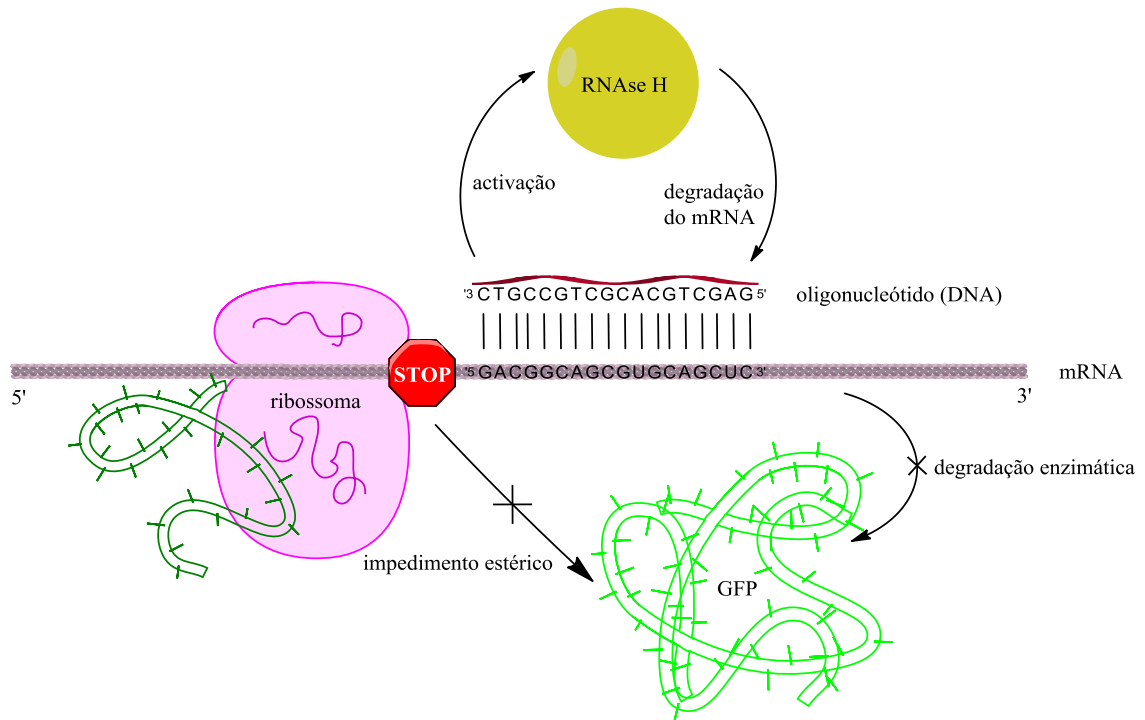


Figura 5. ON-AS direccional para mRNA de GFP. O impedimento estérico da tradução e/ou activação da RNase H, seguida de degradação do mRNA que possui a informação para a síntese de GFP, faz com que a expressão desta proteína seja reduzida. Note-se que a sequência do mRNA está escrita no sentido 5'-3', enquanto a do ON está no sentido inverso (complementariedade e antiparalelismo dos ácidos nucleicos).

3.2.2.1. Impedimento estérico

O impedimento estérico pode ocorrer durante o processamento do pré-mRNA (*splicing*) em mRNA, ainda no núcleo [18] ou no avanço dos ribossomas na tradução dos mRNA em proteína, já no citoplasma [17]. Os ON-AS que actuam através deste último mecanismo não dependem da actividade de RNase H, no entanto, a sua função parece depender da região ao qual se ligam ao mRNA-alvo. A ligação à região inicial do mRNA leva a crer que são mais eficientes, uma vez que a região codificante poderá estar envolvida na formação de estruturas secundárias ou terciárias, impedindo a ligação do ON-AS, além de que parece haver facilidade para o ribossoma desnaturar este segmento em dupla cadeia [18, 39]. Mesmo assim, a ligação do ON-AS à região inicial do mRNA-alvo poderá levar a uma diminuição da especificidade e

selectividade, uma vez que estas regiões apresentam uma grande homologia entre transcritos de inúmeros genes, inclusive genes reguladores [7].

3.2.2.2. Activação enzimática

Na activação enzimática, a presença no mRNA de um segmento em dupla cadeia com determinadas características químicas e com um comprimento de 5 a 6 bases emparelhadas [18], faz activar a enzima RNase H que, por sua vez, degrada apenas a cadeia de mRNA, deixando o ON-AS intacto [7, 8, 36]. Deixando de existir mRNA, não ocorre a síntese proteica.

A RNase H é uma enzima endonuclease ubiquitária, existindo em maior quantidade no núcleo da célula. Esta catalisa a degradação do mRNA no complexo formado entre este e o ON-AS [12, 43]. Assim sendo, a terapia *antisense* é eficaz, onde quer que seja que o ON-AS esteja presente, no citoplasma ou no núcleo [15, 17, 18, 36].

3.3. Controlos na terapia *antisense* com oligonucleótidos

A utilização de um ON-AS, assim como com siRNA ou ribozimas, em testes *in vitro* e *in vivo*, exige o recurso a moléculas controlo apropriadas, como forma de verificar os efeitos das diferentes características fisico-químicas do ON-AS teste.

O mecanismo de acção de um ON-AS (impedimento estérico ou activação de RNase H) pode ser estudado através da utilização de sequências muito semelhantes à sequência do ON-AS teste. Por exemplo, a activação da enzima pode ser averiguada com a utilização de um ON controlo que possui a mesma composição química que o ON-AS teste, mas cujas bases nucleótídicas se encontram baralhadas. A este ON chama-se *scrambled* [17, 18] e possui como objectivo principal verificar os efeitos das bases na actividade da enzima ou impedimento estérico [17].

Outro tipo de molécula controle que poderá ser utilizada é um ON cuja sequência é um pouco semelhante ao ON-AS, no entanto, contendo apenas algumas trocas de bases, fazendo com que a hibridização não ocorra a cem por cento nem seja estável (não há o emparelhamento de todas as bases nucleotídicas), ou seja, há *mismatches* [7, 16-18]. Aqui, torna-se possível verificar o efeito de substituições no grau de silenciamento da expressão genética [17].

3.4. Oligonucleótidos: a sua evolução

Os ON-AS, sendo cadeias nucleotídicas, são dificilmente internalizados pelas células na sua forma isolada, devido à sua carga negativa conferida pelos grupos fosfato. Para aumentar a probabilidade de internalização, estes têm de ser complexados com sistemas de entrega (vetores de transfecção) [18] (mais à frente desenvolvidos). No entanto, alguns estudos chegaram à conclusão de que a aplicação desta terapia *in vivo* não necessitava de qualquer sistema de entrega. Surgiram, então, diversas hipóteses como a interação dos ON-AS com proteínas em circulação, que os protegeria da degradação e eliminação por parte do organismo [7, 18].

3.4.1. Oligonucleótidos fosfodiéster

Os primeiros ON-AS utilizados consistiam em simples cadeias de DNA não modificadas - fosfodiésteres - com dimensões a variar entre 12 a 26 nucleótidos [7, 8, 17, 39], sendo estes os limites para que haja simultaneamente, reconhecimento da sequência complementar no mRNA-alvo e boas propriedades de hibridização [7]. Sequências com mais de 30 nucleótidos poderão formar estruturas secundárias no ON e dímeros entre si, reduzindo a internalização, especificidade e aumentando a toxicidade [7].

Um ON-AS para ser entregue às células, deverá possuir características como estabilidade e resistência contra a degradação enzimática, por parte de

exo e endonucleases existentes em meio fisiológico [8]. Além disso, deverá ter uma boa solubilidade e capacidade de hibridização específica e selectiva [7].

Os ON-AS fosfodiéster, apesar de serem facilmente sintetizados [18], possuírem boa solubilidade, capacidade de hibridização [7] e activarem a enzima RNase H [18, 39], são rapidamente degradados por exonucleases, ou seja, ainda antes de entrarem nas células [8].

O mecanismo de entrada destas moléculas nas células ainda não é bem conhecido, sendo que a hipótese formulada é desta ocorrer via endocitose mediada por receptores celulares, acumulando-se depois em vesículas endolisossómicas. Entretanto, sabe-se que a sua internalização depende de energia e de condições como a concentração e temperatura [7, 36].

De forma a ultrapassar os problemas de degradação, os ON-AS fosfodiésteres têm sido sujeitos a modificações químicas e estruturais [18, 39]. Estas alterações (Figura 6) influenciam as características químicas e estruturais dos ON-AS, assim como o seu modo e grau de actuação no silenciamento da expressão de um gene. A sua capacidade de activarem a enzima RNase H e de agirem como seu substrato [7] é também influenciado por estas alterações. Isto é verificado através da variação do número de bases emparelhadas necessárias para haver actividade *antisense* [17], que como anteriormente referido, pode ser de 5 ou 6 bases emparelhadas para haver activação enzimática.

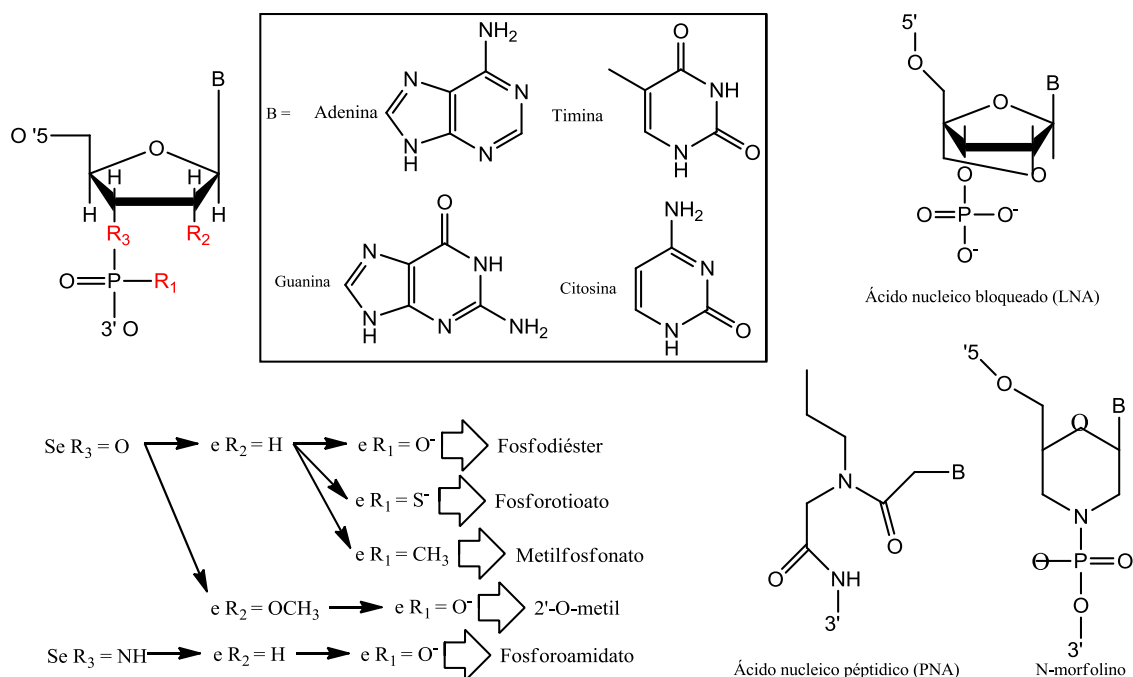


Figura 6. Principais modificações efectuadas nos ON. A maioria dos ON são originados a partir de uma molécula-mãe - o fosfodiéster. Estas modificações químicas podem ocorrer nas posições R_x em diferentes combinações, dando origem aos diversos tipos de “nucleótidos” para a construção de um ON-AS (esquema de setas). No entanto, as modificações podem ser tão radicais, que originam estruturas diferentes, como por exemplo os PNA, LNA ou N-morfolino (à direita na Figura).

Existem muitas mais modificações químicas passíveis de serem realizadas nos nucleótidos de forma as suas características físico-químicas e biológicas [44]. Apenas as mais importantes serão evidenciadas, sendo estas as mais comuns e principais na terapia *antisense*.

3.4.2. Modificações no grupo fosfato

Uma das primeiras modificações realizadas nos ON-AS, foi a substituição de um oxigénio do grupo fosfato que não participa na ligação entre os nucleótidos, por um átomo de enxofre, dando origem a um ON designado de fosforotioato [7, 8, 12, 39], também designados ON de primeira geração [12].

Outras modificações nesta posição já foram igualmente testadas, como por exemplo a substituição do átomo de oxigênio por átomos de selênio, carbono e azoto [7, 33, 36].

Os fosforotioatos têm sido estudados de forma intensiva, devido às suas características físico-químicas, selectividade, toxicidade moderada e custos de produção baixos. Esta modificação na composição química dos ON faz com que a sua estabilidade em ambiente fisiológico melhore, quer seja *in vivo* ou *in vitro* [18, 45, 46]. Isto deve-se ao aumento da solubilidade em água [16], significativa resistência à degradação por parte de nucleases [8, 17, 39] sem comprometer a afinidade pelo mRNA-alvo e activação da RNase H, sendo estes bons substratos para a enzima [7, 12, 18]. Por exemplo, um ON-AS inteiramente fosforotioato pode permanecer intacto por 48h depois de internalizado por células *in vitro* [17].

Por tudo isto, estes têm sido utilizados, tanto no passado como no presente, na investigação em laboratório e ensaios clínicos. No entanto, uma vez que possuem átomos de enxofre, discute-se a possibilidade destes interagirem com proteínas [7, 16, 17] como a fibronectina, heparina, TR do VIH tipo 1, bFGF [17] e conseqüentemente ocasionarem efeitos secundários [16].

De forma a ultrapassar algumas limitações apresentadas pelos fosforotioatos, como por exemplo alguns efeitos não específicos (também designados efeitos não *antisense*) e toxicidade moderada [45], têm sido sintetizadas outras moléculas análogas, partindo de fosfodiéster ou fosforotioatos. Essas modificações podem ocorrer no grupo fosfato, na base azotada ou na pentose [7, 16, 18], em diferentes combinações, dando assim origem aos ON de segunda e terceira gerações.

Todas estas modificações químicas visam aumentar a actividade *antisense* e estabilidade dos ON-AS em sistemas biológicos *in vitro* ou *in vivo* [12, 18], assim como a especificidade, selectividade e eficácia *antisense*. Simultaneamente, deseja-se uma diminuição da toxicidade apresentada por estas moléculas [16]. Estas alterações químicas e estruturais modificam também a afinidade e hibridização ao mRNA-alvo, internalização por parte da célula e capacidade de activar a enzima RNase H [18].

Modificações no grupo fosfato, além dos fosforotioato, podem por exemplo, dar origem a metilfosfonatos e PNA, que são ON de segunda geração e terceira geração, respectivamente. Estas modificações têm se revelado importantes, uma vez que possuem propriedades melhoradas [8].

Os metilfosfonatos possuem um grupo metil na posição de um oxigênio no grupo fosfato. Já nos PNA, derivados dos ácidos arabinonucleicos, a estrutura de fosfato é substituída por ligações poliamida, adquirindo uma estrutura semelhante a poli-aminoácidos [16, 39, 44, 47].

Todas estas modificações resultam positivamente numa melhor capacidade de hibridização e farmacocinética, estabilidade em ambiente fisiológico, resistência a endo, exonucleases e proteases [12, 16]. Por outro lado, têm em comum uma polaridade reduzida, ausência de carga negativa e não activam a enzima [17, 18, 48], propriedades estas, que diminuem a solubilidade em água e, conseqüentemente, resultam numa menor internalização pelas células e eficiência *antisense* [16, 18]. Mesmo assim, a internalização de ON de carga neutra é superior à obtida por ON com carga negativa, o que seria de esperar, devido à repulsão entre este último e a membrana celular [49].

3.4.3. Modificações na pentose

Relativamente às modificações na pentose, as mais prevalentes são na posição 2' do açúcar, com grupos O-alquil. O grupo O-alquil pode ser do tipo O-metil ou O-(2'-Metoxi)etil, dando origem a modificações comumente designadas OMe e MOE, respectivamente [12, 16, 39]. Estes ON de segunda geração caracterizam-se por terem uma maior estabilidade contra a acção de nucleases e actuam na inibição da síntese proteica através de impedimento estérico [16, 17], sendo demonstrado por McKay [50] que estes apresentavam maior eficiência que os tão proclamados fosforotioato.

Uma outra variante desta modificação é o 2'-O-metiltioetil que, como o próprio nome indica, possui um átomo de enxofre, mostrando por isso, uma grande afinidade por proteínas séricas. Esta propriedade revelou ser

importante para estudos *in vivo*, devido à sua acção de distribuição no organismo e farmacocinética [16].

A substituição da ribose por um anel morfolino de seis membros e da ligação fosfodiéster por uma ligação fosfodiamidato não iónica origina o "nucleótido" N-morfolino, cuja afinidade pelo mRNA-alvo é superior à dos ON-AS fosfodiéster [39, 51]. Estes, da mesma forma que os análogos químicos OMe e MOE, actuam por impedimento estérico sem activarem a RNase H [16, 51]. A sua solubilidade em água, internalização pelas células e eficiência *antisense* estão diminuídas, uma vez que possui uma carga neutra [17, 18, 51].

Os ON de terceira geração surgem com modificações 2'-O-4'-C-metileno em ponte de forma a produzir uma ribose que é ciclíca, que é representado pelos LNA. Estes possuem grande afinidade de ligação ao mRNA-alvo, no entanto, não servem de substrato para a enzima, apesar de haver alguma controvérsia acerca no mecanismo pelo qual actua, sendo defendido que a sua actividade *antisense* deve-se ao impedimento estérico [12, 35]. Um estudo com este análogo em conjunto com nucleótidos normais revelaram efeitos *antisense* através da activação da RNase H, assim como uma elevada resistência à degradação em amostras de soro [52].

Existem ainda outros análogos químicos, que resultam de modificações mais elaboradas como por exemplo C5-propinil-dU,dC e "G-clamp" desoxicitosinas, que quando combinadas com fosforotioatos aumentam a eficácia *antisense* [17]. O objectivo principal de todas estas modificações consiste em aumentar a resistência a nucleases e melhorar a farmacocinética [12].

De uma forma geral, existe um factor em comum entre os ON-AS que não activam a RNase-H e que actuam por impedimento estérico [51]. Modificações que originam ON de segunda e terceira geração, que envolvem a substituições de átomos por grupos de maiores dimensões dão origem a ON que actuam por impedimento estérico.

3.4.4. Oligonucleótidos quiméricos

Através das modificações anteriormente especificadas podemos, de uma forma geral, constatar que a maioria das modificações de segunda e terceira geração produz ON incapazes de induzir a RNase H, [18]. Por esta razão, a sua aplicação está limitada [17].

Através dos avanços na Química e na Farmacologia, surgiram novas modificações, de modo a aumentar a estabilidade e resistência à degradação enzimática, indução e aumento da actividade enzimática, afinidade pelo mRNA-alvo, tudo para se atingir os efeitos *antisense* desejados com o mínimo de efeitos secundários [16].

As vantagens anteriormente apresentadas pelos ON de segunda e terceira geração são, então, aliadas às vantagens apresentadas pelos ON-AS fosforotioato. Isto é conseguido através da síntese de ON-AS quiméricos, moléculas híbridas, constituídas por segmentos de nucleótidos de dois ou mais tipos [18, 46, 53]. Os diferentes tipos de nucleótidos que fazem parte do ON podem estar dispostos em diferentes posições [45], e consoante a posição da modificação, estes podem ser chamados "*end-modified*" ou "*centrally-modified*" (Figura 7).

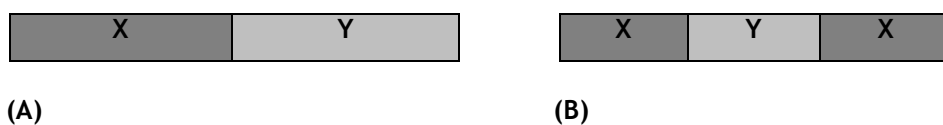


Figura 7 - Oligonucleótidos quiméricos, (A) *end-modified*; (B) *centrally-modified*.

No primeiro, cada extremidade é constituída por diferentes tipos de nucleótidos, enquanto que no segundo, as extremidades são de um tipo de nucleótido e a região central de outro. Os ON modificados na região central podem também ser designados de *gapmers* ("interrompidos") [8, 44], uma vez que a sequência de um tipo de nucleótidos é interrompida pela sequência de outro tipo de nucleótidos. Iremos apenas focar-nos nos ON *gapmer* uma vez que estes apresentam grandes potencialidades.

Um ON *gapmer* é formado por três segmentos de nucleótidos, nucleótidos esses que podem ser de qualquer tipo anteriormente referido. Os segmentos das extremidades são constituídos por nucleótidos do mesmo tipo e têm a função de proteger o ON da degradação enzimática por parte de nucleases e conferir afinidade de ligação ao mRNA-alvo, aumentando assim a selectividade, que podem ou não ter a capacidade de activar a RNase H [17, 18]. Por outro lado, a região central consiste de uma sequência de nucleótidos de outro género, capazes de activar a enzima, acabando por exercer a função *antisense* [12, 16, 18].

Apresentando um exemplo destes ON *gapmers*, de acordo o anteriormente referido, podemos ter um ON cujas extremidades sejam nucleótidos de segunda geração, como por exemplo MOE ou OMe (com elevada afinidade ao mRNA-alvo) e na região central, um segmento de nucleótidos fosfodiéster ou fosforotioato (excelentes substratos para RNase H) [8, 39]. Além disso, todos os nucleótidos que fazem parte deste ON *gapmer* podem ser modificados com átomos de enxofre (modificações fosforotioato), de forma a melhorar as propriedades de distribuição e farmacocinética, no entanto, tendo sempre em conta as repercussões que isso pode ter quanto às interacções com proteínas séricas e efeitos secundários que daí podem resultar [36, 39, 40, 42, 54, 55]. Estudos com estes ON *gapmers* revelaram uma maior estabilidade (por resistirem à degradação enzimática por parte de 5'-exonucleases e 3'-exonucleases) [53], e conseqüentemente, maior tempo de semi-vida e eficiência [16].

Além das modificações químicas internas no ON-AS, têm sido realizados outras modificações, como a conjugação destas moléculas a lípidos, anticorpos, colesterol [8, 12], péptidos fusogénios [56], péptidos RGD [57], PEG [58], adsorção a nanopartículas biodegradáveis [59] e nanopartículas de fosfato de cálcio [60], encapsulamento em nanopartículas [61], etc.. Um trabalho interessante desenvolvido por Shchepinov [62] envolve a síntese de dendrímeros de oligonucleótidos, com oligonucleótidos como grupos terminais à superfície da molécula, que poderá ter aplicações em testes que envolvam técnicas de auto-montagem e hibridização de cadeias nucleótídicas.

Têm sido feitas inúmeras modificações e diversas combinações em ON-AS, de modo a aumentar a sua especificidade e estabilidade, simultaneamente com a diminuição da toxicidade *in vitro* e *in vivo* [38]. No entanto, os ON-AS fosfodiéster e fosforotioato lideram grande parte dos estudos laboratoriais e ensaios clínicos [16], sendo que já existem algumas moléculas comercializadas, mas que serão especificadas mais à frente na dissertação.

3.5. Silenciamento de genes com siRNA

O silenciamento da expressão de um gene em proteína com siRNA resume-se à entrega de longas moléculas de RNA de cadeia dupla com umas pequenas extremidades em cadeia simples, no citoplasma [19, 39, 63, 64]. Estas moléculas têm sido construídas com base em programas de modelação de forma a chegar à melhor sequência, da mesma forma que acontece com os ON-AS.

Estas duplas cadeias de RNA actuam através de processo que envolve diversos complexos enzimáticos como o Dicer, que irá fragmentar a longa cadeia de siRNA em segmentos de 19 a 21 pares de bases [39]. Em seguida, o complexo enzimático RISC fará a desnaturação dos fragmentos de dupla cadeia em cadeia simples, sendo que a cadeia *antisense* hibridizar-se-á ao mRNA-alvo, como acontece com os ON-AS. O mRNA será então impedido de ser traduzido em proteína ou degradado pela endonuclease do complexo RISC [39].

É possível reduzir o número de etapas deste mecanismo, utilizando moléculas de siRNA mais curtas, evitando assim o passo de fragmentação pelo complexo Dicer [12]. Diversos tipos de siRNA podem ser utilizados, como por exemplo moléculas em forma de "gancho", designadas "*hairpin*" [65].

Actualmente, o silenciamento com siRNA é uma estratégia em crescimento e promissora, apesar destes possuírem o dobro do tamanho dos ON-AS (por serem dupla cadeia), o que limita a internalização por parte das células [12]. Este mecanismo é eficaz pois activa complexos enzimáticos de

fragmentação e desnaturação, revelando ser uma potente estratégia para o estudo da função dos genes associados a doenças e o seu tratamento [12, 16, 27].

As moléculas de siRNA, apesar de serem mais estáveis (por serem de cadeia dupla), podem sofrer as modificações químicas anteriormente referidas para os ON-AS, de modo a aumentar a estabilidade, resistência às nucleases e eficiência [16, 66]. No entanto, estas modificações são mais difíceis de implementar nas moléculas de siRNA que nos ON. Uma estratégia para atingir o silenciamento com estas moléculas, é a introdução de genes que codificam estas moléculas dentro da própria célula [67].

A terapia *antisense* utilizando siRNA é eficaz e potente, e inclusivamente, tem sido aplicada em células, em simultâneo com ON-AS não homólogos, que se ligam a outra região do mesmo mRNA-alvo [39].

Moléculas de siRNA têm sido aplicadas no tratamento de doenças como VIH, cancro, doenças neurodegenerativas [68, 69], utilizando diversos sistemas de entrega como lipossomas, dendrímeros, colesterol, nanopartículas, polímeros catiónicos, nanotubos de carbono, proteínas com capacidade de translocação membranar, e por diversas vias de exposição como intraocular, intravenosa, etc. [36, 63, 70, 71]. Um estudo realizado por Alexander [72] utilizando siRNA e como vector de entrega microsferas, resultou no silenciamento de gene da EGFP em cerca de 90% revelando que estas moléculas são potentes drogas *antisense*.

3.6. Silenciamento de genes com ribozimas

O terceiro mecanismo baseia-se na utilização de ribozimas, que consistem em enzimas catalíticas RNA-RNA [19]. Existem diversos tipos de ribozimas, em "*hairpin*" (forma de gancho) ou "*hammerhead*" (forma de cabeça-de-martelo), estas últimas com maior relevância terapêutica [8, 39]. Estas são pequenas sequências de ribonucleótidos (30 a 40 nucleótidos), com segmentos em dupla hélice [39]. As ribozimas possuem locais de ligação ao substrato e um domínio catalítico, que têm de ser identificados e sintetizados

de forma a que sejam compatíveis com o mRNA-alvo e o silenciamento seja eficiente [16].

Quando expressas pelas células a partir de um vector plasmídico ou entregues às células com sistemas de entrega, estas moléculas fragmentam o mRNA-alvo sempre que encontram a sequência NUH, onde N pode ser qualquer um dos quatro nucleótidos e H qualquer um menos a guanina [16, 39].

Diversos tipos de modificações químicas e estruturais podem ser efectuadas como acontece com os ON, de forma a melhorar a sua estabilidade, resistência às nucleases e afinidade pelo "substrato" (o mRNA-alvo). No entanto, a afinidade pelo mRNA-alvo poderá ser tão elevada, que reduz a actividade catalítica drasticamente [16], por não ser fácil a dissociação do complexo ribozima/mRNA. Estas modificações podem fazer com que o tempo de semi-vida passe de 1 min para 10 dias [16]. Exemplos destas modificações são fosforotioato, açúcares invertidos e 2'-O-metil [16].

As ribozimas têm sido internalizadas pelas células com o auxílio de sistemas de entrega como lipossomas (mais à frente desenvolvidos), uma vez que, além de facilitarem a sua entrada na células, as protegem da degradação enzimática, no interior aquoso deste sistema de transporte [39].

Os primeiros ensaios com estas moléculas foram realizados tendo como alvo o VIH e o cancro. No tratamento de cancro, estas moléculas têm sido combinadas com agentes quimioterapêuticos, pois revelaram sensibilizar as células cancerígenas à quimioterapia [16, 39]. Existem já diversas moléculas desenvolvidas e comercializadas pela Ribozyme Pharmaceuticals Inc., como ANGIOZYME™, cujo alvo é o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) no tratamento de cancro colorectal metastático [16]. Outra molécula é o HERZYME™, direccionado contra hEGF-2 no cancro da mama e ovários, que possui nucleótidos modificados [16].

Comparando os três mecanismos (Figura 8), todos visam atingir o mesmo objectivo, o silenciamento de um gene, utilizando apenas diferentes moléculas que irão agir através de diferentes mecanismos.

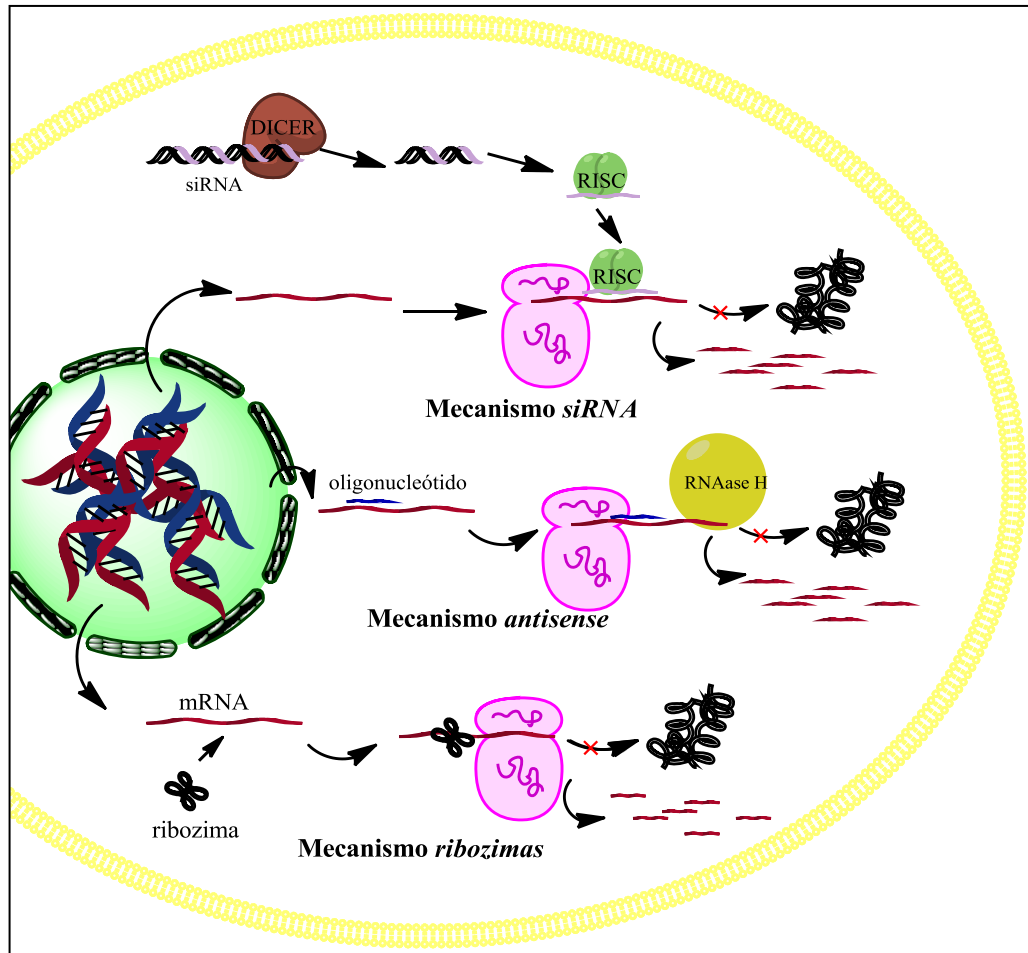


Figura 8. Comparação entre mecanismo *antisense* mediado por ON-AS, siRNA e ribozimas. No mecanismo *antisense*, o ON-AS quando hibridizado com o mRNA-alvo, forma um segmento em dupla cadeia que impede síntese proteica por razões estéricas ou activação da RNAase H. Na entrega de siRNA na célula, esta molécula sofre uma fragmentação por parte de um complexo enzimático (Dicer). O fragmento é depois desnaturado pelo complexo RISC, ficando em cadeia simples. Esta liga-se depois por complementariedade ao mRNA, promovendo a sua degradação. No mecanismo com ribozimas, esta reconhece uma determinada sequência no mRNA-alvo, levando à sua degradação por clivagem enzimática (actua de forma muito semelhante ao sistema de enzimas de restrição).

Os siRNA apresentam agora grandes avanços e parece ser uma abordagem com futuro, no entanto, os ON apresentam algumas vantagens sobre este, relativamente à flexibilidade nas modificações químicas, alvo celular, resistência a nucleases e síntese fácil e de baixo custo [16].

4. Métodos de entrega de material genético

A transferência de material genético (DNA, RNA, ON-AS, siRNA ou ribozimas) para as células exige vetores de transporte [14, 73] que protegem esse material da degradação enzimática, que sejam eficientes, específicos, seguros, não tóxicos e não imunogênicos, assim como de baixos custos de produção e aplicação [14, 26, 73]. Estudos *in vitro* mostraram que a entrega de material genético no seu estado livre não é eficaz, a não ser que se encontre em concentrações elevadas, o que pode levantar questões de toxicidade [7].

Existem diversos tipos de vetores (virais e não-virais) que vão de encontro a algumas das características e propriedades acima especificadas. No entanto, ainda não existe o vector ideal, que reúna todas estas propriedades simultaneamente.

4.1. Métodos virais

Os vírus foram dos primeiros vetores a serem utilizados para a entrega de material genético em células. Estes ainda são muito utilizados para a terapia genética, embora com limitações na aplicação clínica [14, 73]. Estas partículas são constituídas por uma cápside, cujo interior se encontra carregado de material genético (DNA ou RNA). Para se multiplicarem, os vírus necessitam de uma célula hospedeira, de forma a tirar proveito de toda a maquinaria celular [15] para a síntese das proteínas víricas. É devido a esta facilidade de infecção dos vírus que estes são extremamente eficientes na transferência de material genético [19, 27]. Estes são capazes de proporcionar uma expressão prolongada e estável [14], mesmo utilizados a baixas concentrações [15].

A terapia genética beneficia destes vetores, através da introdução dos genes de interesse no genoma do vírus, utilizando técnicas de recombinação

[15]. Os vírus habitualmente utilizados são os lentivírus, os retrovírus, e os derivados e associados de adenovírus [14, 27, 73].

Apesar de todas as vantagens anteriormente referidas, os vírus levantam muitos problemas, devido aos riscos de uma introdução aleatória dos genes de interesse no genoma da célula hospedeira, oncogénese, infecções, toxicidade aguda, expressão ectópica e indução de respostas imunes [12, 14, 26, 73]. Além disso, possuem limitações físicas como a produção em larga escala, tecnologias complexas e dispendiosas para a obtenção de vírus recombinantes e restrição do tamanho e quantidade de ácidos nucleicos encapsulados [14, 15, 27].

Os riscos e limitações apresentados são, deste modo, os alicerces para o desenvolvimento de novos vectores e métodos alternativos, que acarretam menos riscos e mais vantagens, apesar de menos eficientes.

4.2. Métodos não-virais: físicos e químicos

Existem inúmeros sistemas não-virais que estão a ser actualmente estudados para terapia genética e que possuem propriedades biológicas capazes de ultrapassar alguns dos problemas levantados pelos vírus [14].

O desenvolvimento de vectores tem como fundamento a descoberta das barreiras à transfecção e a compreensão dos mecanismos que estão por detrás destas, de forma a ultrapassá-los e torná-los tão efectivos quanto os sistemas virais [14, 19, 73].

Os métodos não-virais podem ser divididos em duas grandes classes, físicos e químicos. Comparativamente aos métodos virais, estes não apresentam uma eficiência tão elevada quanto à entrega de material genético, nem uma expressão genética estável e prolongada [14, 15, 19], sendo este objectivo difícil de atingir, apesar de todos os avanços verificados na área.

4.2.1. Métodos físicos

Resumidamente, os métodos físicos consistem na entrega de material genético através de técnicas de manipulação (mecânica, osmótica, térmica e eléctrica) [15] de estruturas celulares como a membrana plasmática e o invólucro nuclear. Exemplos destas técnicas são a microinjecção, irradiação com laser, electroporação, sonoporação, iontoforese, nucleofecção, bombardeamento de partículas (vulgarmente conhecido por “*gene gun*”) e *scrape-loading* [7, 8, 14, 17, 18, 39, 74-78].

Os métodos físicos são usualmente utilizados para a entrega de drogas ou material genético em células que são resistentes à entrega destes através de métodos químicos [14] e descrições mais detalhadas sobre os fundamentos e aplicações destes métodos podem ser encontrados na literatura [8, 15, 22, 27, 36, 74].

Todos estes métodos melhoram a eficiência da entrega de material genético, seja ele de que natureza for, e alguns deles até apresentam valores de viabilidade celular elevados, no entanto, a sua aplicação *in vivo* é problemática, devido aos danos irreversíveis que poderão ser causados às células, além de não serem práticos por se encontrarem limitados pelo tipo de tecido e anatomia [14].

4.2.2. Métodos químicos

Os métodos químicos (Figura 9) baseiam-se na utilização de moléculas, naturais ou sintéticas, capazes de transferir material genético para o interior das células [14]. As moléculas utilizadas podem pertencer a diversas classes químicas, como nanopartículas inorgânicas, polímeros sintéticos, proteínas, péptidos com capacidade de translocação membranar, lípidos, solventes orgânicos, entre outros [7, 8, 14, 15, 18, 46, 79-81].

Desde já, há que salientar que os termos “complexos” e “transfecção” sofrem alterações, consoante os sistemas ou vectores de transporte do

material genético. Temos por exemplo, que os complexos entre ácido nucleico e polímeros em geral, são designados "poliplexos" (ocorre a "polifecção"), e que os complexos entre o material genético e sistemas lipídicos são "lipoplexos" (ocorre a "lipofecção"). No entanto, alguns tornam-se mais específicos, como é o caso dos complexos formados com dendrímeros, que podem ser designados "dendriplexos" (ocorre a "dendrificação").

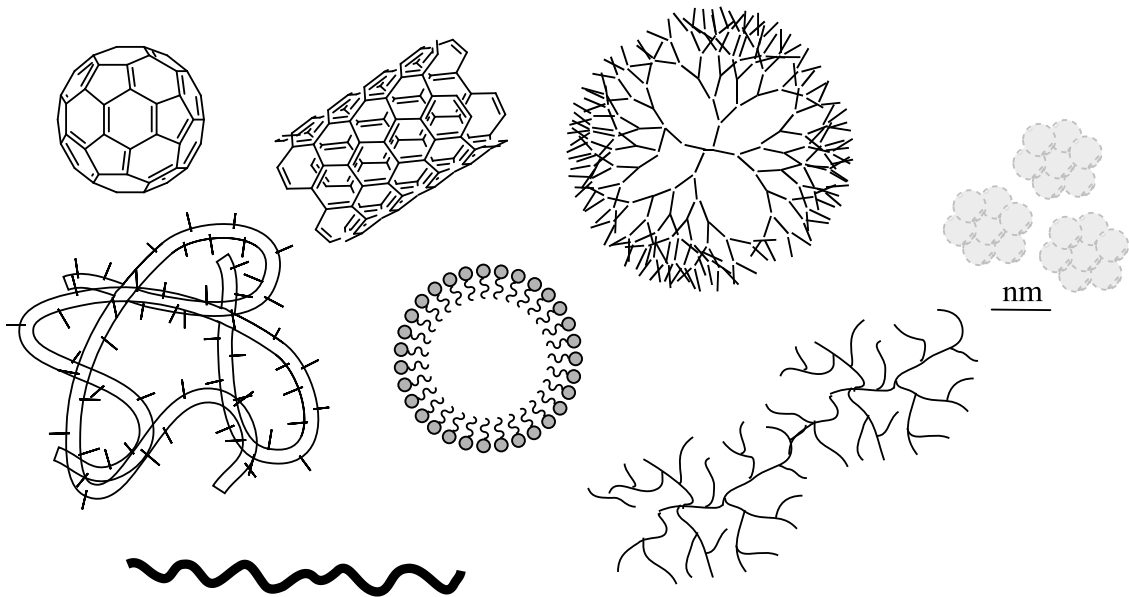


Figura 9. Exemplos de moléculas utilizadas na terapia genética. Estas moléculas podem ser de diferentes classes químicas, como estruturas de carbono (nanotubos), proteínas, lipídios (micelas ou vesículas), nanopartículas inorgânicas, polímeros (lineares, ramificados ou dendríticos).

Estas moléculas podem ainda sofrer modificações, de modo a adicionar características importantes que as originais não possuem, de forma a melhorar a internalização do material genético por parte das células, e consequentemente, a eficiência de transfecção.

Comparativamente com os vectores virais, estes não induzem uma resposta imune (possuem pouca ou nenhuma imunogenicidade), não são veículo de transmissão de doenças, podem ser sintetizados em grande escala e com custo relativamente baixo, e além disso, não possuem limitações quanto ao tipo e dimensão do material genético a ser entregue [13, 14, 19].

Debruçamo-nos, em seguida, sobre um segmento indispensável nesta dissertação, uma pequena revisão sobre os vectores não-virais de natureza química mais utilizados na transfecção de células. Aqui, serão também abordadas as suas características físico-químicas mais importantes e modificações químicas que podem sofrer.

4.2.2.1. Polímeros

Os primeiros vectores que foram utilizados foram os polímeros [15]. Estes podem ser lineares ou ramificados, naturais ou sintéticos, mas geralmente, possuem em comum uma característica, são policatiões [13, 26, 80, 82]. Estas cargas positivas são normalmente conferidas por grupos funcionais como aminas primárias, que a pH fisiológico se encontram protonados.

A presença de cargas positivas permite a condensação de ácidos nucleicos, por interacção electrostática com os grupos fosfato com carga negativa. Ocorre assim uma complexação e co-precipitação, onde os ácidos nucleicos passam a estar protegidos de uma possível degradação enzimática [15, 19, 83].

A condensação de ácidos nucleicos é importante para que ocorra a transfecção mediada por polímeros, uma vez que uma molécula de pDNA poderá ter dimensões na ordem de grandeza dos μm de diâmetro. Isto não facilita a sua internalização por parte da célula e entrada no núcleo. Então, a sua condensação através de materiais poliméricos poderá condensar este pDNA até formar partículas esféricas que podem atingir 25 nm [19, 26].

Após a condensação dos ácidos nucleicos por parte dos polímeros, a presença de um potencial- ζ positivo nos polímeros permite a interacção com a membrana celular e as biomoléculas, e a solubilização dos complexos. No entanto, um valor muito elevado ou muito baixo do potencial- ζ pode levar a uma agregação das partículas [26]. Diversas estratégias, mais à frente referidas, estão a ser utilizadas para se otimizar a carga presente nos complexos.

Grande parte dos estudos de terapia genética referem o termo como NP. Este pode representar duas coisas: o quociente entre o número de moles de azoto do polímero e o número de moles de fósforo do ácido nucleico ou o número de moles de amins primárias do polímero e o número de moles de fosfato do ácido nucleico, sendo este último a situação considerada para a realização deste trabalho.

Os polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, apresentam composições químicas distintas, estrutura tridimensional, carga, peso molecular e tamanho diferentes. A manipulação de todos estes parâmetros torna possível o desenvolvimento de vectores genéticos com as características desejadas, para a entrega de material, sejam genes ou ON-AS [20, 29, 30, 84].

4.2.2.1.1. Polímeros naturais

Começando pelos polímeros naturais, estes consistem em polímeros de origem animal ou vegetal [14]. Temos por exemplo o alginato, gelatina, quitosano, pululano, entre outros [8, 14, 20, 26, 27, 29, 30, 84]. Estes, por serem de origem natural, e apresentarem baixa citotoxicidade, biocompatibilidade, estabilidade e biodegradabilidade [14], têm sido utilizados numa panóplia de estudos, desde a entrega de material genético até à construção de matrizes tridimensionais para a proliferação e regeneração de tecidos [29, 30, 84]. Além disso, podem ser funcionalizados com grupos moleculares que conferem à molécula características importantes para a aplicação em questão [14, 19].

O quitosano é um polissacarídeo linear encontrado na natureza, que deriva da quitina encontrada no exoesqueleto de crustáceos e que tem sido dos mais explorados para a entrega de material genético. Este caracteriza-se por ser policatiónico, devido aos grupos amina que se encontram protonados a pH fisiológico, pelo que apresenta uma forte afinidade por ácidos nucleicos [26]. A transfecção com este polímero depende de diversos factores, sendo o mais importante o pH do meio, pois irá condicionar a protonação deste e, consequentemente, a condensação do material genético.

Este polímero tem sido alvo de modificações químicas como a adição de cadeias de PEG ou a desacetilação em diferentes percentagens. A taxa de transfecção utilizando esta molécula não é a melhor, no entanto, a citotoxicidade é baixa [13, 14]. Outras modificações realizadas no quitosano são a adição de cadeias PGA, de forma a transportar siRNA [85].

Outros polímeros naturais têm sido utilizados para a entrega de material genético, sejam eles utilizados como sistema de transporte ou como uma matrizes tridimensionais nas quais os ácidos nucleicos estão dispersos [14], promovendo uma libertação lenta e controlada, à medida que são biodegradados. Estes polímeros são, por exemplo, o alginato, a gelatina (colagénio desnaturado) e o pululano [14, 26]. Muitas destas moléculas foram modificadas com espermina [81], uma poliamina natural envolvida no metabolismo celular que a pH fisiológico se encontra protonada, apresentando resultados de transfecção melhores [14].

4.2.2.1.2. Polímeros sintéticos

No que diz respeito aos polímeros sintéticos, ou polímeros clássicos, estes são das moléculas mais utilizadas para a terapia genética.

Poli-L-Lisina (PLL) e polipéptidos

O primeiro polímero sintético a ser utilizado para a entrega de material genético em células foi o poli-L-lisina (PLL) [18, 19], que consiste num polipéptido de aminoácidos L-lisina. Este possui outras aplicações, como o recobrimento de placas de cultura, de modo a aumentar a adesão celular, através da sua polimerização por radiação UV.

Nos primeiros estudos *in vitro* para transfecção de células, o PLL revelou alguma toxicidade e dependendo da força iónica da solução, demonstrou tendência para agregar e precipitar [14, 26]. Os resultados foram melhorados quando conjugado com moléculas de ácido palmítico (um ácido gordo natural,

com 16 carbonos). A presença desta cadeia hidrofóbica melhorou a interacção dos complexos com a membrana celular [86].

Este polímero tem sido também utilizado em conjugação com outras moléculas como açúcares (lactose), outros polímeros (PEG) e péptidos [13, 73]. No entanto, há que considerar, que a substituição de átomos de azoto diminui o número de cargas positivas no polímero, podendo resultar numa interacção mais fraca com o ácido nucleico [26].

Na terapia genética têm sido utilizados diversos polipéptidos, de carácter natural ou semi-sintético [15]. Estas terão que apresentar certas e determinadas características que permitam a transfecção de células. Por um lado, estas terão que ser policatiónicas de forma a permitir a condensação de ácidos nucleicos, enquanto por outro, terão que ser reconhecidos por receptores na membrana ou no invólucro nuclear de uma célula.

Os polipéptidos semi-sintéticos resultam da conjugação dos polipéptidos, como por exemplo a protamina ou PLL com moléculas como a ferritina, a transferrina, a insulina ou um anticorpo [12, 15]. A protamina e PLL são responsáveis pela condensação de ácidos nucleicos, uma vez que são péptidos ricos em aminoácidos (arginina e lisina, respectivamente) protonados a pH fisiológico. Relativamente à ferritina (envolvida no transporte e armazenamento de ferro no organismo) e à insulina (hormona responsável pelo consumo de glucose por parte das células) conduzem a uma terapia direccionada e internalização dos complexos polipéptido-ácido nucleico pelas células [13, 15].

Um conjugado de glicerol, transferrina e PLL revelou melhores resultados de transfecção quando comparado com um material de referência comercializado de natureza lipossómica, o Lipofectamine® [13].

Polietileneimina (PEI)

O segundo polímero descoberto, com utilidade na transfecção de células, foi o polietileneimina (PEI), sintetizado por polimerização de moléculas de

etilenimina. Este é o mais popular de entre todos os polímeros sintéticos, sendo considerado um clássico [7, 14, 26].

O PEI pode ser uma molécula com diferentes estruturas e pesos moleculares. Este pode ser de baixo, médio ou elevado peso molecular, tanto na forma linear ou ramificada [13, 18, 26, 36, 87]. A forma linear possui apenas aminas secundárias, sendo que a forma ramificada possui aminas primárias, secundárias e terciárias.

A presença de grupos como aminas nas moléculas de PEI têm um papel importante na condensação do material genético e na libertação dos poliplexos do endo-lisossoma para o citoplasma, como anteriormente referido. As aminas primárias e secundárias, protonadas a pH fisiológico são responsáveis pela condensação de ácidos nucleicos [13, 26]. Já as aminas terciárias actuam como "esponja de protões", processo descrito numa secção anterior do trabalho.

Este polímero é tão eficaz que existem diversos materiais referência comercializados, baseados em PEI, como por exemplo jetPEI™ (Polyplus Transfection SA) [88], ExGen 500 (Thermo Scientific, Fermentas Molecular Biology Tools) [89] e Fluorescent Arrest-In (Thermo Scientific Open Biosystems) [90], alguns deles com versões para aplicação *in vitro* e *in vivo*.

Há que salientar que estes ou outros materiais de referência mais à frente mencionados, apesar de apresentarem melhores resultados de transfecção, também apresentam alguma citotoxicidade, pelo que o aumento da quantidade utilizada para obtenção de melhores resultados não é solução.

Comparando estes dois primeiros polímeros catiónicos, PLL e PEI, este último é efectivamente o mais eficiente quanto à transfecção e protecção contra a acção de enzimas e durante mais tempo, possivelmente pelo facto deste ser entregue ao núcleo sem sofrer degradação, enquanto o PLL é degradado no endo-lisossoma [13].

Apesar das vantagens apresentadas pelo PEI e de muitos estudos já realizados [91, 92], este não é o vector ideal para transfecção pois apresenta alguma citotoxicidade, devido às cargas positivas [13, 93]. A formação de complexos a razões NP elevadas revela citotoxicidade devido à presença de

elevada concentração de cargas positivas, que resultam num potencial- ζ muito elevado.

De modo a reduzir o potencial- ζ deste polímero, têm sido conjugadas moléculas neutras como cadeia de polietilenoglicol (PEG) ao PEI [13, 36, 80]. Este tipo de conjugação leva a uma diminuição da agregação de complexos, interacção com proteínas séricas e toxicidade [13]. Igualmente, a carga positiva de PEI pode ser reduzida através da utilização de moléculas com carga negativa, como o ácido hialurónico (HA). Isto mostrou ser mais biocompatível e com eficiência de transfecção superior [14], no entanto ainda não foi descoberto como é que estes segmentos não interferem na interacção dos ácidos nucleicos com a estrutura policatiónica do polímero [26].

Outras modificações (como a ligação de açúcares) têm sido realizadas, como por exemplo manose, galactose, maltose e maltotriose para uma terapia genética direccionada, apesar da eficiência alcançada ter sido baixa [13, 94]. A ligação com péptidos RGD também já foi realizada, depois de se verificar a sua importância nos receptores de integrinas [14, 36], importantes para a adesão e comunicação celular.

Outros polímeros clássicos

Comparando os polímeros naturais com o sintéticos, os últimos, como seria de esperar, apresentam maior citotoxicidade devido a interacções com proteínas séricas, razão pelo qual a sua utilização *in vivo* se encontra limitada [14, 15]. Há, então, a necessidade incessante de se desenvolver novos vectores poliméricos com melhores propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Note-se que, não só o vector não poderá ser citotóxico, assim como os seu produtos de degradação. Exemplos desses polímeros são derivados de PLL e PEI anteriormente referidos [20, 29, 30, 84], assim como poliésteres, poliuretanos, polivinilpirrolidona (PVP) e poli((2-dimetilamino)etilmetacrilato) (PDMAEMA) [20, 26, 29, 30, 84], poli(ácido etilacrílico) (PEAA), PEG, poli(ácido láctico) (PLA) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) [14, 19, 26, 80].

A combinação de vários polímeros pode dar origem a vectores copolímericos [80] com propriedades aceitáveis para aplicação na terapia genética. Temos por exemplo, a combinação PEG-PLL e PHPMA-PTMAEMA [13, 26].

Resumindo, os polímeros catiónicos (naturais ou sintéticos), na sua forma nativa ou modificados com grupos funcionais ou ligandos de forma a melhorar a interacção com o material genético, internalização e transfecção, têm se revelado importantes para a terapia genética. As modificações por eles sofridas envolvem a conjugação de moléculas como anticorpos, receptores ou péptidos, visando uma terapia direccionada. Têm a vantagem de não transmitirem doenças e serem fáceis de sintetizar e armazenar [13].

4.2.2.1.3. Dendrímeros

Uma das desvantagens da utilização de polímeros clássicos é a possibilidade de não haver resultados reproductíveis, uma vez que os seus pesos moleculares não são definidos, mas sim correspondem a um intervalo de valores, cujos limites podem ser distantes [14]. Uma massa molecular reproductível é, também, muito importante para aplicações biomédicas.

Ainda dentro dos polímeros sintéticos, temos os dendrímeros que apresentam como vantagem possírem uma massa molecular definida [7]. Estas moléculas são especiais pelas características que exibem. De uma forma geral, estes são geralmente macromoléculas altamente ramificadas, que crescem a partir de um centro. A sua síntese pode seguir dois caminhos [80, 95-99], convergente ou divergente (Figura 10).

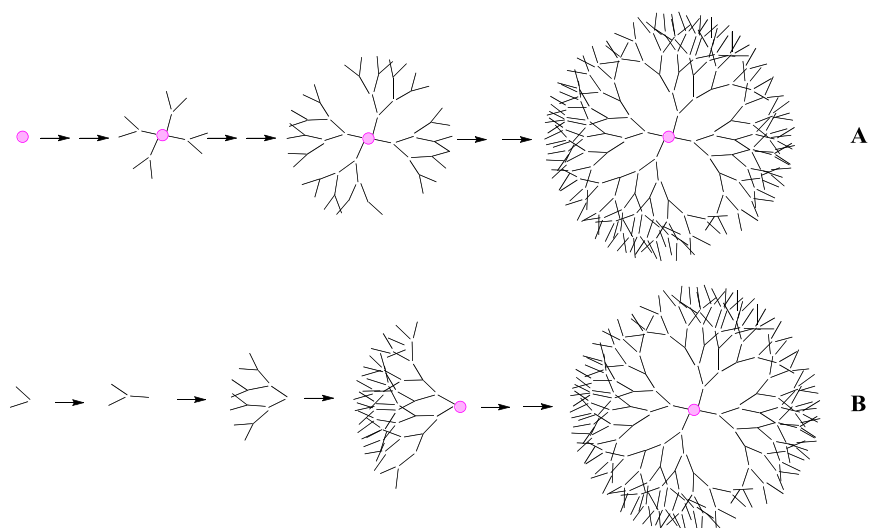


Figura 10 - Síntese de dendrímeros; (A) método divergente e (B) método convergente.

Estas moléculas crescem de uma forma ordenada e organizada, em gerações, adicionando uma nova camada à geração anterior. A sua estrutura é relativamente uniforme, esférica e de arquitectura e peso molecular bem definidos, com ramificações no seu interior e grupos terminais à superfície [14, 80]. O crescimento destas moléculas é limitado pelo número de gerações, pois quanto maior a geração, maior é o impedimento estérico devido à proximidade dos "ramos" [80].

Estas macromoléculas, por serem ramificadas, possuem espaços no seu interior [80], e dependendo dos grupos funcionais no interior e periferia, assim como do pH do meio, estes podem ser policatiões [14, 18, 19].

Todas estas características revelam que os dendrímeros podem ser utilizados como sistemas de entrega para drogas e material genético em células [14, 36, 80].

Existem diversos tipos de dendrímeros, que se diferenciam na estrutura físico-química, composição, número e tipo de grupos terminais como grupos aromáticos, carboxilatos, hidroxilos, acetilados, etc. [80, 95, 100-106]. Inclusivamente, existem os designados dendrímeros parcialmente degradados ou activados [107]. Um exemplo destes é o material de referência Superfect® e Polyfect (Qiagen) [108].

Os dendrímeros mais descritos na literatura são os poli(amidoamina) (PAMAM) e os poli(propileneimina) (PPI) [99], havendo, no entanto, um maior

destaque para os PAMAM por terem sido os primeiros a serem sintetizados, caracterizados e comercializados [95].

Os dendrímeros, assim como todas as outras macromoléculas utilizadas para a terapia genética, têm sido alvo de modificações [14, 80, 109]. Estes têm sido alvo de conjugação a moléculas que melhoram o seu desempenho quanto à internalização por parte das células-alvo, como por exemplo ligando com afinidade a receptores membranares e nucleares [14, 26]. Inclusive, dendrímeros e dendrons (unidades ramificadas que constituem partes de dendrímeros) têm sido alvo de modificações com aminoácidos hidrofóbicos, cadeias hidrofóbicas [23], colesterol, espermina, aminoácidos, PEG [110], ciclodextrinas [102, 111], anticorpos [112], glucocorticóides, açúcares [102], biotina e avidina [29], péptidos [102, 113], sondas fluorescentes [100], lípidos [114], entre outros, o que é permitido pela reactividade das aminas primárias [12-14, 80], como acontece com os dendrímeros PAMAM. Estas, e muitas mais modificações visam melhorar as suas propriedades como a eficiência de transfecção, citotoxicidade, internalização, direcção das moléculas para as células-alvo, etc. quaisquer que sejam as condições, *in vitro* ou *in vivo* [99, 106].

Neste projecto, foram utilizados dendrímeros PAMAM G5 nativos e modificados com ácidos gordos e usando diferentes graus de funcionalização [14].

Os dendrímeros PAMAM são macromoléculas ramificadas que crescem, neste caso, a partir de uma molécula central (síntese divergente), a etilenodiamina (EDA) [95]. Esta molécula central é uma diamina. Este dendrímero, possui aminas terciárias nas ramificações e aminas primárias na periferia. O aumento de uma geração no dendrímero leva ao aumento exponencial de aminas primárias, assim como um incremento de cerca de 10Å no seu diâmetro (Figura 11).

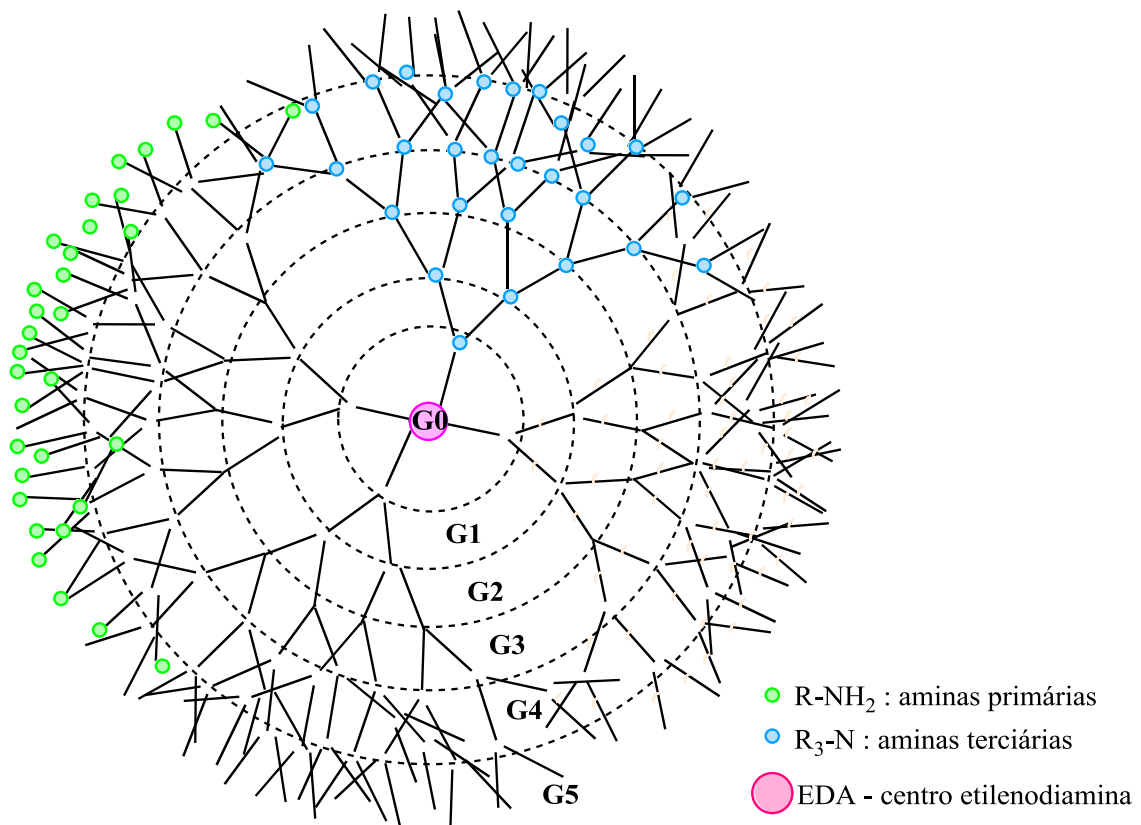


Figura 11 - Dendrímero PAMAM, com as diferentes camadas que correspondem às gerações. A adição de uma geração aumenta o número de aminas primárias de forma exponencial. Podemos constatar que este dendrímero tem uma forma em "estrela" de 4 "braços" (denominados *dendrons*), que são iguais uns aos outros. Por isso, os pontos a verde e a azul são também localizados em todo o dendrímero (estes não estão representados para facilitar a visualização).

Assim sendo, os dendrímeros PAMAM caracterizam-se por possuírem um número crescente (de forma exponencial) de aminas primárias. Temos, por exemplo, 64 aminas terminais para um dendrímero PAMAM de geração 4, e por conseguinte, 128 aminas terminais para PAMAM G5 [81].

Os PAMAM com aminas à superfície são as moléculas, desta classe de polímeros dendríticos, mais utilizadas para a entrega de material genético. Estas, devido à presença de aminas primárias protonadas a pH fisiológico (pK_a 7-9), são capazes de se associar e condensar material genético de forma eficiente. Por outro lado, as aminas terciárias existentes no interior (pK_a 3-6) [115] são responsáveis pela absorção de prótons no interior do endo-lisossoma (efeito "esponja de prótons"), aquando da acidificação deste organelo [14,

26]. Este fenómeno faz com que as amins terciárias fiquem protonadas e a força iónica aumente, levando à libertação do material genético [81].

A transfecção de células com dendrímeros é baixa e depende de inúmeros factores como a geração, razão NP, tipo de célula, origem, passagem, solução tampão, concentração de iões, ordem de adição, etc. [14]. Estes são capazes de entregar material genético às células sem produzir grandes efeitos citotóxicos e resposta imune [14].

Diversos trabalhos demonstram que os PAMAM podem ser, efectivamente, utilizados para a entrega da material genético, seja ele plasmídico, simples cadeias oligonucleotídicas, siRNA, ou genes [103], tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* [98, 116]. Em estudos *in vivo*, foram descritos efeitos hemolíticos [81], provocados pelo dendrímero a concentrações de 10 µg/mL, sendo esta situação melhorada com a funcionalização do dendrímero [117].

A estabilidade dos dendrímeros PAMAM é afectada pelo pH, uma vez que este influencia a protonação, e consequentemente a sua solubilidade [101].

Os dendrímeros PAMAM apresentam biocompatibilidade, apesar de poderem evidenciar alguma citotoxicidade [99, 100, 114], que depende do número de gerações, concentração e tempo de exposição às células, em grande parte devido à presença de cargas positivas à superfície conferida pelas amins primárias protonadas a pH fisiológico.

Existem já alguns dendrímeros comercializados e que são utilizados em estudos de transfecção como material de referência [14]. É o que acontece com o Superfect®, que consiste em dendrímeros PAMAM parcialmente degradados ou activados [14, 118, 119].

No trabalho desenvolvido por Pandita [120], dendrímeros PAMAM foram funcionalizados com péptidos RGD, ligandos estes, que possuem afinidade pelas integrinas existentes na superfície da membrana celular e que são importantes na adesão das células ao substrato. Os resultados com genes repórter como GFP e luciferase revelaram níveis superiores de expressão em células estaminais mesenquimatosas quando comparados com a transfecção mediada pelos dendrímeros nativos. Estudos semelhantes foram também realizados por estes investigadores, para averiguar se a baixa eficiência de

transfecção seria suficiente para induzir a diferenciação osteogénica, o que efectivamente foi verificado [121].

Uma nova família de dendrímeros PAMAM foi também desenvolvida por Santos, do mesmo grupo de investigadores, através da funcionalização destes com cadeias alquilo hidrofóbicas de diferentes comprimentos em diversos graus de funcionalização (4 e 8 cadeias por dendrímero) [86]. A presença de cadeias lipídicas melhorou a interacção destes complexos com a membrana celular, e facilitou a internalização destes por parte das células. Os resultados demonstraram uma maior capacidade de transfecção, sendo que a transfecção é superior para os dendrímeros com maior grau de substituição, mas cadeias menores. Estes revelaram também citotoxicidade mais baixa e eficiência de transfecção superior aos dendrímeros nativos e Superfect®.

A combinação de lipofilicidade (cadeias hidrofóbicas) com a natureza catiónica (aminas primárias) nos dendrímeros, pode pois resultar em propriedades que facilitam a interacção com a membrana celular, aumentam a internalização e libertação do DNA do endossoma, e conseqüentemente, aumenta a eficiência de transfecção [14].

Mas as modificações não se ficam por conjugação de moléculas via ligação covalente. Os dendrímeros podem ser também associados a outros polímeros como o PEG [14, 122, 123], nanopartículas, nanotubos de carbono [124], podendo ainda serem utilizados como "contentores" para nanopartículas, drogas [102], ou servirem de matriz para a construção de outras partículas [109].

Os dendrímeros têm sido utilizados em diversas áreas da ciência como a electrónica e a medicina (como por exemplo, sistemas de transporte de material genético, transporte de fármacos, moléculas fluorescentes, bem como para fins de diagnóstico e tratamento) [14, 99-102, 109, 114, 125].

4.2.2.2. Lipossomas e lípidos catiónicos

Outra classe de moléculas utilizadas na terapia genética são os lipossomas e lípidos catiónicos [7, 13, 15, 18, 19, 26]. Os lipossomas são formados por lípidos catiónicos ou neutros, com grupos polares e cadeias apolares [27, 39]. A sua estrutura é muito semelhante à de uma célula, pois são vesículas com um centro aquoso [14] e podem atingir dimensões de 100 nm a 2,5 µm, se forem unicompartimentadas ou multicompartimentadas, respectivamente [27, 80]. Existem também lipossomas com carga neutra ou negativa, que são mais utilizados para a entrega de drogas, porque não são capazes de encapsular eficientemente ácidos nucleicos [19, 27, 73].

A membrana da vesícula é formada por uma bicamada lipídica, onde os grupos polares estão virados para o centro aquoso e para o exterior, e os grupos apolares para o interior da membrana.

Durante a sua formação, o material genético pode interagir com estas vesículas de duas formas. Por um lado, os ácidos nucleicos podem ficar à superfície da vesícula por interacção electrostática com as cargas positivas dos lípidos ou ficarem encapsulados no espaço aquoso no seu interior [12]. Formam-se assim, os "lipoplexos". As moléculas lipídicas utilizadas para a formação destes sistemas podem ser lípidos catiónicos como oleoil ornitinato (OLON), cloreto de N-[1-(2,3-dioxi(propil]-N,N,N-trimetilamónio (DOTMA), brometo de dimetildioctadecilamónio (DDAB), lipoproteína de baixa densidade (LDL), DC-colesterol, misturados em diferentes concentrações com 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) [8, 13, 27, 73].

Os "lipoplexos" em contacto com as células, podem entrar através de dois mecanismos, por endocitose ou por fusão com a membrana celular, uma vez que ambos possuem a mesma natureza lipídica [8, 13, 73]. Por endocitose [73], os "lipoplexos" desestabilizam a membrana dos endossomas, levando à libertação do material genético para o citoplasma [14].

A transfecção mediada por lipossomas e lípidos catiónicos é denominada "lipofecção" [14], e é um dos métodos mais populares para a entrega de ácidos nucleicos em células [126]. A transfecção de células utilizando este sistema

de transporte depende de parâmetros como a quantidade de lípidos e DNA, assim como o tempo de exposição das células aos "lipoplexos" [27].

A transferência de ácidos nucleicos utilizando lípidos só é eficiente se as vesículas formadas tiverem um potencial- ζ positivo, permitindo a condensação do material genético e interação com a membrana. No entanto, isto leva a uma encruzilhada, pois o excesso de cargas positivas leva a uma interação intensa com a membrana celular, resultando em alguma citotoxicidade [8, 27], assim como dificulta a libertação do ácido nucleico já dentro da célula por interação electrostática intensa [15].

A transfecção de células utilizando esta classe de moléculas é uma alternativa que se tem revelado atractiva quando comparada com outros métodos, pelo facto da sua aplicação ser fácil, consistindo apenas da mistura dos componentes [15]. É verdade que muitos parâmetros terão de ser controlados e optimizados, mas uma vez isto ultrapassado, a "lipofecção" pode ser aplicada a qualquer tipo de célula [15].

Os lipossomas têm também sido alvo de modificações de forma a obter uma terapia direccionada e toxicidade mais baixa [7, 15, 73, 80]. A eficiência de internalização de ácidos nucleicos utilizando lipossomas pode ser, igualmente, melhorada com a mistura de proteínas de fusão, lípidos sensíveis a variações de pH [73] e, ainda, estabilizados com uma cobertura de PEG [12, 80].

Existem actualmente diversos materiais de referência já comercializados, sejam eles sistemas lipossómicos ou apenas baseados em lípidos, como por exemplo, o Lipofectamine™, Lipofectin™, 293Fectin™, Cellfectin®, DMRIE-C, Freestyle™ MAX, InvivoFectamine™, Oligofectamine™ e Optifect™ (Invitrogen) [127], HiPerFect, TransMessenger, Attractene e Effectene (Qiagen) [108], TransFast™ e FuGENE®, (Promega) [128], DOTAP® (Roche) [129], NeuroPORTER™ e BioPORTER™ (Sigma-Aldrich) [130], entre muitos outros [27].

Como se pode observar, o desenvolvimento de novos sistemas de transporte de material genético para células tem centrado atenções em sistemas lipídicos, sejam eles na forma de lipossomas ou não.

Alguns estudos de silenciamento de genes já utilizaram lípidos catiónicos para a entrega de oligonucleótidos *antisense* e siRNA [12, 28, 46, 131].

4.2.2.3. Nanopartículas inorgânicas

Nanopartículas são partículas com dimensões na ordem de grandeza dos nanómetros. As características apresentadas por estas partículas são diferentes das apresentadas por micro e macro partículas constituídas pelo mesmo material.

As nanopartículas, devido às suas dimensões, são facilmente internalizadas pelas células [18]. Por esta razão, estas têm sido utilizadas na entrega de drogas, assim como na terapia genética [19].

De entre inúmeros tipos de nanopartículas, as mais utilizadas são as de fosfato de cálcio, ouro [132], prata, sílica, óxidos de ferro, *quantum dots*, nanotubos de carbono [133], entre outras [14, 80, 134].

As nanopartículas têm sido empregues em diversas áreas da investigação como a óptica, a electrónica, a medicina, etc.. As nanopartículas podem exibir diversas formas e dimensões [80]. A utilização de partículas de fosfato de cálcio para transfecção de células é muito conhecida, tendo surgido em 1973 [8, 27]. A formação dos complexos entre o ácido nucleico e as nanopartículas de fosfato de cálcio dá-se por um processo de co-precipitação [15], com a neutralização de cargas contrárias, que correspondem ao ácido nucleico (polianião) e iões fosfato, na presença de iões cálcio. A co-precipitação dá origem a precipitados à escala nanométrica, que depois são internalizados pelas células [15].

A transfecção mediada por fosfato de cálcio depende de diversos factores como a quantidade de ácido nucleico, tempo de exposição das células a estas partículas, e utilização de solventes orgânicos como o glicerol ou o DMSO [27]. Uma vez optimizadas as condições, a transfecção poderá atingir níveis muito superiores, quando comparado com outros métodos [27]. A transfecção utilizando nanopartículas de fosfato de cálcio é eficaz a produzir linhas celulares com expressão estável [60, 135], no entanto, a sua

reprodutibilidade é um problema, como por exemplo, devido a alterações do pH da solução tampão após algum tempo de armazenamento [27].

Existem também nanopartículas magnéticas, como as incluídas no produto comercial Magnetofection™, (Chemicell) [136], que são compostas por óxidos de ferro, que sobre um campo magnético são atraídas em direcção às células, acabando por penetrar nas células e serem eficazes na transfecção.

A utilização de nanopartículas na terapia genética é influenciada por propriedades como a forma, a carga, a dimensão, a composição e ligandos acoplados. Por exemplo, a presença de moléculas específicas podem conduzir a uma terapia genética direccionada para as células-alvo, aumentando a eficiência de transfecção e diminuindo possíveis efeitos secundários [19].

Em jeito de conclusão, os sistemas de entrega de material genético para células têm percorrido um longo caminho, tentando sempre ultrapassar da melhor forma possível, os obstáculos que vão surgindo.

Os métodos virais foram, desde sempre, os veículos de transfecção mais eficazes, devido às suas características de infecção. No entanto, estes induzem efeitos secundários como respostas imunogénicas e possibilidade de oncogénese.

Em alternativa aos vírus, surgiram os métodos não-virais (físicos e químicos) apresentando, porém, resultados de transfecção mais baixos. Estes resultados têm vindo a ser melhorados, dando origem a vectores com eficiências de transfecção superiores, mais segurança, menos citotóxicos e nalguns casos biodegradáveis.

O rumo da investigação sobre os possíveis novos vectores debruça-se, neste momento, mais sobre a possibilidade, não de desenvolver novos materiais, mas sim em melhorar e otimizar vectores já existentes [26, 73]. As atenções estão viradas para a utilização de moléculas catiónicas, estáveis, mas capazes de condensarem ácidos nucleicos [12].

Há que ter em conta as interacções dos vectores com o ambiente fisiológico (pH, concentração de iões, temperatura, proteínas), e com receptores celulares (para aplicação de uma terapia genética direccionada)

[7, 12, 14, 15, 18], bem como ter em conta os mecanismos e alterações moleculares que ocorrem aquando da entrega destes sistemas nas células, e a dose e duração da terapêutica [19]. As características dos complexos formados (condensação de ácidos nucleicos, solubilidade, agregação, degradação e dissociação) [26] são igualmente importantes para o desenvolvimento e melhoramento destes vectores. Uma pequena modificação pode fazer com que as propriedades se alterem radicalmente.

O desenvolvimento de melhores sistemas de transporte para os ácidos nucleicos visa, que no futuro, estes sejam utilizados *in vivo*, sendo necessário considerar factores como o tipo e extensão da doença, tipo e número de administrações, toxicidade a curto e longo prazo e farmacocinética.

5. Terapia *antisense*: potenciais aplicações

Actualmente, há inúmeras doenças que afectam a humanidade como o cancro, as doenças cardiovasculares, a depressão e a SIDA. O cancro e a SIDA são das enfermidades mais estudadas pela comunidade científica [8, 16], e nas quais se têm gasto milhões de euros, quer na investigação e desenvolvimento, quer no diagnóstico e tratamento.

A terapia *antisense* é uma abordagem possível para o tratamento de várias doenças. O número de especialidades médicas com possibilidade de utilizar esta metodologia tem vindo a aumentar, abrangendo já a infecciologia, oncologia, neurologia, dermatologia, imunologia e cardiologia [7, 18]. Esta metodologia pode ser utilizada para silenciar a expressão de proteínas exógenas (vírus) ou expressão amplificada de proteínas endógenas (citocinas, mediadores inflamatórios) ou de proteínas activas em passos limitantes no processo de uma doença, como acontece, por exemplo, na psoríase [17].

Inúmeros artigos de revisão abordam o silenciamento de genes mediado por ON-AS para aplicação no tratamento de cancro, como uma das terapias mais promissoras, devido ao seu carácter selectivo, apresentando, por isso, uma menor toxicidade que os fármacos utilizados na quimioterapia. Estes artigos, como muito outros, abordam igualmente, o design dos ON-AS, as modificações que podem sofrer de forma a melhorar propriedades como a resistência à degradação, mecanismos de actuação dos ON-AS, e os seus alvos e efeitos *antisense* em estudos *in vivo* [137-142].

Os ON que lideram a aplicação *in vivo* são os fosforotioatos que, como anteriormente mencionado, apresentam características desejadas como a activação da RNase H e resistência às nucleases [138, 141, 142]. Na Tabela 1, encontram-se reunidos os fármacos *antisense* que se encontram actualmente em desenvolvimento, sendo especificado o fim terapêutico e a fase dos testes em que se encontram.

Tabela 1 - Desenvolvimento de novas drogas *antisense* pela ISIS Pharmaceuticals e parceiros [143].

Droga	Alvo / Doença	Fase de estudos ^[a]
Cardiovascular		
Mipomersen	apoB-100 / colesterol elevado	3
ISIS-CRP _{RX}	CRP / inflamação renal	1
ISIS-APOCIII _{RX}	ApoCIII / triglicéridos elevados	1
ISIS-FXI _{RX}	Factor XI / coagulação	1
BMS-PCSK9 _{RX}	PCSK9 / colesterol	Pré-clínica
Metabolismo		
ISIS-SGLT2 _{RX}	SGLT2 / diabetes tipo 2	1
ISIS-PTP1B _{RX}	PTP-1B / diabetes tipo 2	1
ISIS-GCGR _{RX}	GCGR / diabetes tipo 2	Pré-clínica
ISIS-GCCR _{RX}	GCCR / diabetes tipo 2	Pré-clínica
ISIS-FGFR4 _{RX}	FGFR4 / obesidade	Pré-clínica
Cancro		
OGX-011	Clusterina / cancro	3
LY2181308	Survivina / cancro	2
ISIS-EIF4E _{RX}	eIF-4E / cancro	2
OGX-427	Hsp27 / cancro	2
ISIS-STAT3 _{RX}	STAT3 / cancro	Pré-clínica
Neurodegenerativa		
ISIS-SOD1 _{RX}	SOD1/ esclerose lateral amiotrófica	1
ISIS-TTR _{RX}	TTR / amiloidose	1
ISIS-SMN _{RX}	SMN / atrofia muscular espinal	Pré-clínica
Inflamatória e outras		
Vitravene™	CMV / retinite	Aprovado
Alicaforse	ICAM-1 / colite ulcerosa	2
ACHN-490	Aminoglicosido / inflamação bacteriana severa	2
ATL1102	VLA-4 / esclerose múltipla	2

EXC 001	CTGF / fibrose local	2
iCo-007	iCo / doença ocular	2
ATL1103	Antisense / acromegalia	Pré-clínica

^[a] O desenvolvimento de uma droga consiste em diferentes fases, nomeadamente, uma fase pré-clínica (teste *in silico*, *in vitro* e animais), uma fase clínica (1 - pessoas voluntárias, 2 - centenas de pacientes, 3 - milhares de pacientes) e aprovação.

5.1. Terapia *antisense* na SIDA

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é provocada através da infecção do vírus da imunodeficiência humana (VIH), um vírus de ssRNA que depende da enzima TR, enzima esta que é responsável pela síntese de um ssDNA partindo do ssRNA do vírus. Esta cadeia de DNA integra, em seguida, o genoma da célula hospedeira, sendo depois transcrito e traduzido em proteínas. É desta forma que o vírus se multiplica, utilizando toda a maquinaria da célula, infectando seguidamente outras células.

Usualmente, para reduzir os efeitos da infecção, os pacientes são sujeitos a um *cocktail* vitalício de medicamentos inibidores da enzima TR, a principal responsável pela disseminação viral [16]. No entanto, estes nem sempre resultam, uma vez que este vírus é conhecido por sofrer sucessivas mutações, daí a dificuldade de se descobrir a cura.

A terapia *antisense*, além das drogas convencionais, tem sido utilizada para o tratamento, ou pelo menos, para mitigar os efeitos provocados por este vírus [144]. Exemplo disso são ON-AS com capacidade de formar uma tripla hélice com o DNA, bloqueando a replicação viral ou inibindo a síntese da enzima integrase viral, essencial para a integração no genoma hospedeiro [16, 35].

Um ON-AS fosforotioato, o GEM91, cujo alvo é o mRNA de uma proteína essencial ao ancoramento do vírus às células, tem sido utilizado no tratamento da SIDA [16]. Este é administrado via intravenosa, usualmente, nos doentes com variantes mutantes resistentes à terapia contra a síntese da enzima TR [16]. No entanto, devido aos efeitos secundários, a sua utilização

foi descontinuada e substituída pelo GEM92, mais estável, com toxicidade limitada e administrado via oral [16].

Um problema associado ao VIH é a infecção por parte de outros vírus. É o que acontece, por exemplo, com a infecção pelo CMV, provocando retinite e que, sem tratamento, leva à cegueira [16, 39].

Existe, de momento, um único ON-AS comercializado que é utilizado no tratamento da infecção por CMV, o Vitravene™ [7, 16-18, 39, 73, 143]. Esta droga *antisense* baseia-se num ON fosforotioato de 21 nucleótidos, cujo alvo é o RNA viral. Este é aplicado localmente, limitando a infecção, todavia, a dose administrada provoca efeitos secundários como a inflamação, aumento da pressão ocular, cataratas, sangramento, etc..

5.2. Terapia *antisense* no cancro

O cancro, outra doença cuja incidência aumenta a cada dia, surge após mutações genéticas que resultam em alterações proteómicas, promovendo, desta forma, a sobrevivência e proliferação descontrolada de células, angiogénese e metastização [12].

Um dos problemas do cancro, mais especificamente do seu tratamento, são os bem conhecidos efeitos secundários severos, que se devem à toxicidade dos agentes quimioterapêuticos para com células saudáveis. É, então, urgente o desenvolvimento de agentes selectivos [12, 16, 18], de forma a actuarem apenas contra as células cancerosas, e possuírem efeitos mínimos nas células normais.

Os proto-oncogenes e genes supressores de tumores fazem parte do genoma de qualquer indivíduo e têm sido alvo da terapia *antisense*. Uma mutação num destes tipos de genes é considerada grave e se os mecanismos de reparação não forem capazes de a contrariar, originará tumores. Os proto-oncogenes passarão a oncogenes, levando a uma perda da capacidade de resposta aos sinais de inibição do crescimento (excesso de divisões mitóticas), enquanto os supressores de tumores deixarão de ter a capacidade de suprimi-

los, conduzindo a um retardamento ou impedimento de ocorrer a apoptose (escassa morte celular).

A apoptose, também conhecida como o fenómeno de morte celular programada, é importante para a manutenção da homeostasia. A desregulação deste mecanismo leva ao desenvolvimento de cancros e doenças auto-imunes [18].

Existem inúmeras proteínas responsáveis por esta regulação necessária para se manter o equilíbrio homeostático. Exemplo disso, temos a grande família de proteínas bcl-2, que resultam da activação do gene Bcl-2 através de uma translocação cromossómica [8, 39]. Esta família proteica pode ser dividida em duas grandes classes que são antagónicas: as pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bok, Bik, Bad e Bid) e as anti-apoptóticas (bcl-2, bcl-x, A1, bcl-w e Mcl-1). Todas elas possuem domínios proteicos em comum, que podem ser aproveitados em prol da síntese de ON-AS que actuem simultaneamente contra o mRNA das diferentes proteínas bcl-2 [7, 18]. Estas proteínas estão envolvidas na formação de cancros e resistência destes a tratamentos.

A terapia *antisense*, nestes casos será uma ajuda importante, uma vez que é possível um tratamento direccionado apenas às células cancerígenas, afectando muito menos as células saudáveis, reduzindo os efeitos não específicos.

Alguns testes com ON-AS e taxol ou cisplatina, em linhas celulares cancerígenas, mostraram que estes tornam as células mais sensíveis aos tratamentos de quimioterapia. Por esta razão, a terapia *antisense* tem sido estudada como adjuvante no tratamento de cancro, devido à sua capacidade de sensibilizar as células aos tratamentos de radio e quimioterapia, apresentando resultados promissores [7, 18].

Testes *in vitro* e *in vivo* com um ON fosforotioato complementar aos seis primeiros codões do mRNA da bcl-2, o G3139, têm sido realizados em conjugação com a quimioterapia [12, 16, 18]. Quando administrado com doxorubicina, esta acumula-se duas vezes mais nas células cancerígenas, sendo por isso mais eficaz [7, 16]. Outros ON têm sido utilizados para silenciar a bcl-2- e bcl-x simultaneamente, por apresentarem grande homologia entre si, promovendo a morte celular [12, 18].

Esta família de proteínas tem sido o principal alvo da terapia *antisense* aplicada ao cancro, por estas se encontrarem em concentrações elevadas em mais de metade dos cancros humanos, entre muitos outros, que até agora têm sido alvo de terapia com recurso a drogas anticancerígenas convencionais [145].

Inúmeros cancros têm sido testados para a aplicação da terapia *antisense*, como por exemplo os cancros da mama, pulmão, pele, melanoma, carcinoma de células Merkel, sarcoma de Kaposi, despigmentação da pele, tendo eles em comum a expressão elevada de proteínas importantes para a regulação da proliferação, diferenciação, e sobrevivência celular, como por exemplo, as proteínas da família bcl-2, c-raf e c-myc [17, 39].

5.3. Outras doenças

Muitas outras doenças e problemas têm também sido alvo de tratamento através da terapia *antisense*, como o herpes [146], a fibrose cística [81], a hiperplasia epidérmica psoriaca, doenças de pele de origem viral, feridas (controlo de cicatrizes excessivas) [147], hepatite B, patologia de Crohn (gastrointestinal), etc. [17, 39, 73]. Apresentando exemplos, alguns estudos para o tratamento de hepatite B [148] e herpes [149] mostraram uma inibição da replicação viral em 90%. Isto demonstra o elevado potencial destas moléculas para atenuarem a infecção viral.

No caso da psoríase, existe um caso de sucesso, o ON ISIS2303 que representa uma esperança para os pacientes que se têm submetido a todo e qualquer tipo de tratamentos [17].

Têm sido vários os alvos terapêuticos do silenciamento de genes através da terapia *antisense* [40-42, 46, 150]. Alguns dos mais estudados encontram-se resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Outros genes estudados com maior frequência para aplicação da terapia antisense [7, 12, 16, 17, 39].

Gene / proteína	Proteína	Função
Ras	G membranas (envolvida na via da MAPK)	Manutenção da mitogénese Sobrevivência celular
c-Raf	PKC e PKA (Serina-treonina proteínas cinases)	Proto-oncogene relacionados com via MAPK, bcl-2 e Ras (carcinogénese, malignidade, diferenciação)
c-myc	Factores de transcrição	Proto-oncogenes (replicação, crescimento, metabolismo, diferenciação e apoptose)
TGF	Polipéptido de crescimento de transformação	Papel na imunossupressão dos efeitos citotóxicos junto ao tumor
Ki-67	Proteína nuclear em células proliferativas	Proliferação celular
p53	Supressor de tumor (antiproliferativa)	Regulação da proliferação, controlo do ciclo celular e metabolismo
vEGF	Factor de crescimento	Formação de novos vasos sanguíneos no tecido tumoral

5.4. Efeitos secundários dos oligonucleótidos *in vivo*

Alguns ensaios clínicos têm demonstrado relativa segurança e toxicidade moderada dos ON-AS, que podem depender ou não da sequência de nucleótidos no ON. A presença de quartetos de G ou sequências CG, estas últimas também conhecidas como motivos CpG, são responsáveis por

estimular o sistema imunitário, ter uma acção antiproliferativa, assim como induzirem a acção de citocinas, factores necróticos tumorais e interferões, bem como a proliferação de células B, macrófagos, células NK, e linfócitos [7, 8, 12, 16, 18, 42, 45]. Estas sequências devem ser, por isso, evitadas ou metiladas. Os quartetos de G podem ser considerados como uma "faca de dois gumes", porque, apesar de provocarem efeitos antiproliferativos, também podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento de cancros [7, 16].

A dose administrada de ON-AS *in vivo* é limitada por alguns efeitos secundários como a degeneração hepatocelular e a trombocitopenia, devido a interacções do ON (como fosforotioatos), com determinadas proteínas [7, 16, 17]. A terapia *antisense* tem sido aplicada *in vivo* de diversas formas, que podem ir desde a exposição dérmica, intravenosa, intraocular e inalação até à oral, sendo que cada uma delas representa um desafio. Quando aplicada via dérmica, a terapia *antisense* apresenta algumas vantagens, como por exemplo, rapidez e menor toxicidade sistémica e desconforto.

Apesar dos avanços verificados no silenciamento de genes em células cancerígenas, a entrega de ON continua a necessitar das modificações químicas tanto no ON em si, como nos sistemas de transporte de modo a melhorar propriedades como o tempo de meia-vida e a interacção com proteínas [151]. No entanto, em muitos estudos *in vivo*, a entrega de ON tem sido conseguida na sua forma livre, sem a utilização de sistemas de transporte, o que realmente é inesperado e é totalmente contrário ao que se verifica *in vitro* [12, 46]. Pensa-se que estes interagem com proteínas séricas através de pontes dissulfito, o que os protege da degradação por parte das nucleases no plasma [16].

A terapia *antisense* tem vindo a ganhar terreno nos estudos *in vitro* e *in vivo*. O número de doenças cujo tratamento ambiciona a aplicação da terapia *antisense* tem vindo a aumentar, e isso revela-se no número de ensaios clínicos a decorrer nos dias de hoje [40, 41]. Sabemos que o desenvolvimento de uma droga *antisense*, como qualquer outra molécula, leva o seu tempo. Esta começa o seu percurso em programas de modelação computacional, passando pela síntese, testes *in vitro*, *in vivo* em animais, seguindo-se uma

fase clínica morosa, para depois ser aprovado por entidades reguladoras como a FDA e a EMA, depois de se comprovar a sua eficiência e segurança. Por isso mesmo, presentemente, existe um único ON-AS comercializado, o Vitravene™.

Capítulo II

Estudos *in vitro* de silenciamento do gene da proteína verde fluorescente otimizada (EGFP) utilizando dendrímeros nativos e funcionalizados como vectores

Capítulo II

Estudos *in vitro* de silenciamento do gene da proteína verde fluorescente otimizada (EGFP) utilizando dendrímeros nativos e funcionalizados como vectores

Resumo

O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar a capacidade dos dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM), nativos e funcionalizados à superfície, de actuarem como vectores para a entrega de oligonucleótidos em terapia *antisense*.

Foram utilizados os poli(amidoamina) (PAMAM) de geração G5, funcionalizados à superfície com 4 ou 8 moléculas de ácidos gordos de diferentes comprimentos (ácido láurico - 12 carbonos, ácido mirístico - 14 carbonos, ácido palmítico - 16 carbonos), para a preparação de complexos com oligonucleótidos *antisense* para fins de transfecção de células HeLa pEGFP e silenciamento do gene da proteína verde fluorescente otimizada (EGFP).

Antes da sua exposição às células, os complexos formados entre os dendrímeros e os oligonucleótidos foram caracterizados quanto à sua dimensão, potencial- ζ bem como interacções estabelecidas entre os seus componentes. Uma vez colocados em contacto com as células, os seus efeitos citotóxicos, e capacidade de silenciarem o gene da EGFP foram analisados.

Os resultados mostram que esta família de dendrímeros é capaz de transportar oligonucleótidos para o interior das células, resultando na transfecção e silenciamento do gene da EGFP. Os níveis de silenciamento foram superiores aos verificados na transfecção mediada pelo dendrímero G5

e crescem com o aumento do número de cadeias hidrofóbicas, comprimento e razão NP.

A funcionalização dos dendrímeros à superfície com cadeias hidrofóbicas melhora a transfecção, muito provavelmente em consequência de uma maior interação com a membrana celular, o que conduz a uma melhor internalização e efeito *antisense* do oligonucleótido.

1. Introdução

1.1. Células HeLa com expressão da Proteína Verde Fluorescente Otimizada

A técnica de cultura de células animais consiste na manutenção e crescimento de células fora do organismo da qual provém, em condições ideais de temperatura, meio de cultura, pH e atmosfera [152].

Os meios de cultura onde as células são mantidas são constituídos por uma panóplia de componentes como aminoácidos, vitaminas, sais e hidratos de carbono, fornecendo o essencial para o crescimento e manutenção das células *in vitro*. Apesar disso, para alguns tipos celulares, são acrescentadas proteínas (hormonas, factores de crescimento, enzimas), com a adição de soro, por forma a aumentar a sobrevivência das células.

Existem diferentes tipos de células: as linhas celulares finitas e as linhas celulares contínuas. As primeiras dizem respeito a células que só podem ser subcultivadas até um certo limite, após o qual as células começam a entrar em senescência (envelhecimento), deixando de ter capacidade proliferativa. Por outro lado, as linhas celulares contínuas possuem a característica de poderem se multiplicar indefinidamente, sendo também conhecidas como células imortais [152, 153].

As células HeLa foram estabelecidas como a primeira linha celular contínua humana em 1951 [154]. Estas células, designadas HeLa devido à sua origem ter sido de uma mulher chamada Henriette Lacks, são provenientes de um carcinoma cervical, com uma proliferação fora do normal, quando comparados com outros casos do mesmo tipo de cancro.

Estas células têm sido muito utilizadas (tornaram-se num modelo *standard* de células), não só para investigação na área do cancro, mas também em estudos bioquímicos, genéticos e moleculares [154]. Por exemplo, uma das primeiras aplicações das HeLa foi a produção de uma vacina contra a infecção pelo vírus da poliomielite [154, 155].

As células HeLa, com o seu fenótipo cancerígeno, caracterizam-se por possuírem um crescimento rápido e agressivo. Estas são conhecidas por contaminarem outras culturas celulares, pensando-se inclusivamente, que muitas das linhas celulares em laboratório terão sido originadas por contaminação de células com este tipo celular [154, 156] e até mesmo designações erróneas de células provenientes de outros cancros, mas que são indicadas como um subtipo de HeLa [154].

As células utilizadas neste trabalho são células HeLa modificadas geneticamente para expressarem de forma estável a proteína verde fluorescente otimizada (EGFP), através da introdução de um plasmídeo no seu genoma. O plasmídeo utilizado foi o pcDNA3-EGFP (Figura 12).

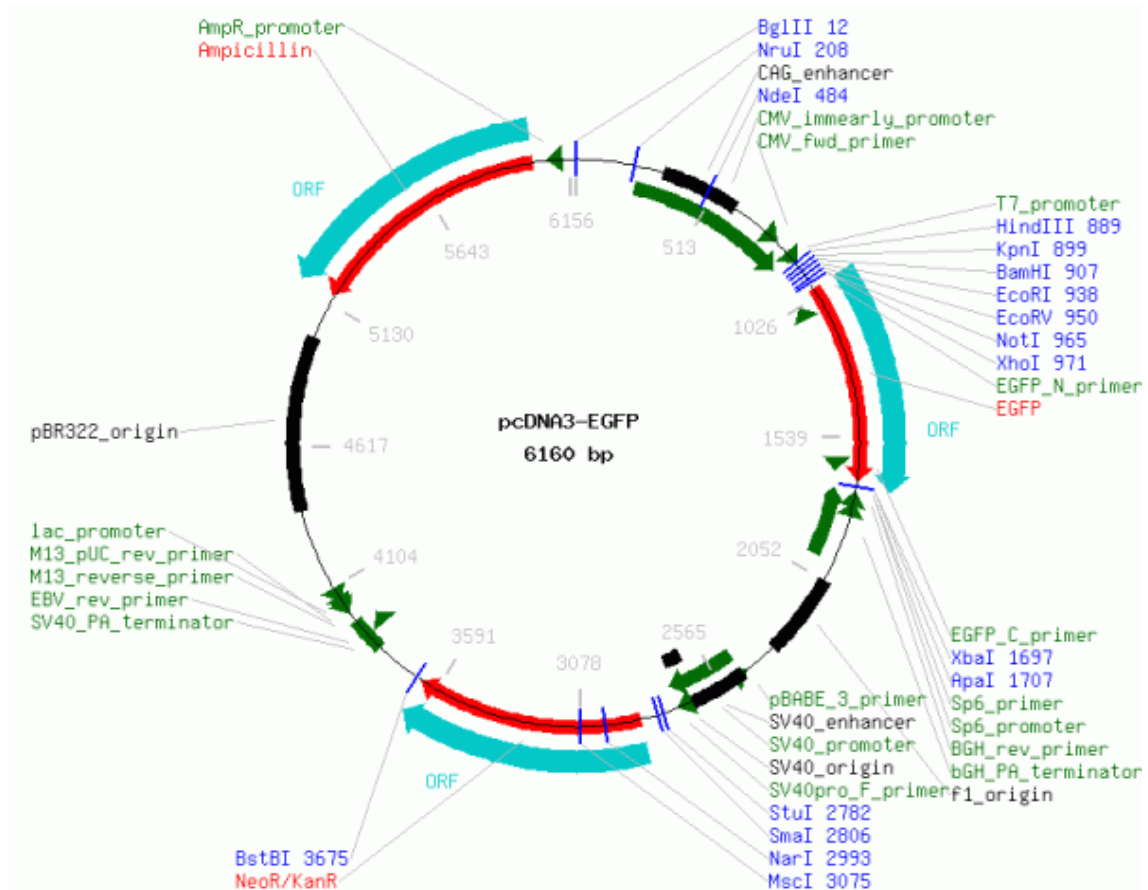


Figura 12 - Plasmídeo pcDNA3-EGFP. Vector com o qual as células HeLa foram transfectadas de forma a expressarem EGFP de forma estável [157].

Neste plasmídeo, além deste gene essencial para a expressão desta proteína, temos também um outro gene que produz uma proteína que confere resistência às células a um antibiótico, o sulfato de G418. Esta é a forma de selecção pois o meio de cultura possui este componente. As células que não possuírem este plasmídeo, não expressam a proteína que lhes confere resistência, acabando por morrer quando expostas ao G418. As células vivas manifestam um fenótipo verde fluorescente quando expostas a radiação no comprimento de onda adequado (488 nm), como acontece na microscopia de fluorescência.

1.2. Proteína verde fluorescente otimizada (EGFP)

A proteína verde fluorescente (GFP) é uma proteína que foi descoberta num animal marinho, a *Aequorea victoria*, vulgarmente conhecido por medusa [158-160]. Esta proteína tem uma propriedade que se tem revelado importante em inúmeros estudos e investigações, a fluorescência.

No animal, existem duas proteínas envolvidas no fenómeno de fluorescência da GFP (Figura 13). A primeira, a aequorina, quando activada por iões cálcio emite quimioluminescência azul. A segunda, a própria GFP, devido a uma pequena sequência serina-tirosina-glicina nas posições 65 a 67, sofre uma ciclização e oxidação depois da sua transcrição, recebe a energia emitida pela primeira proteína e emite fluorescência verde [27, 74].

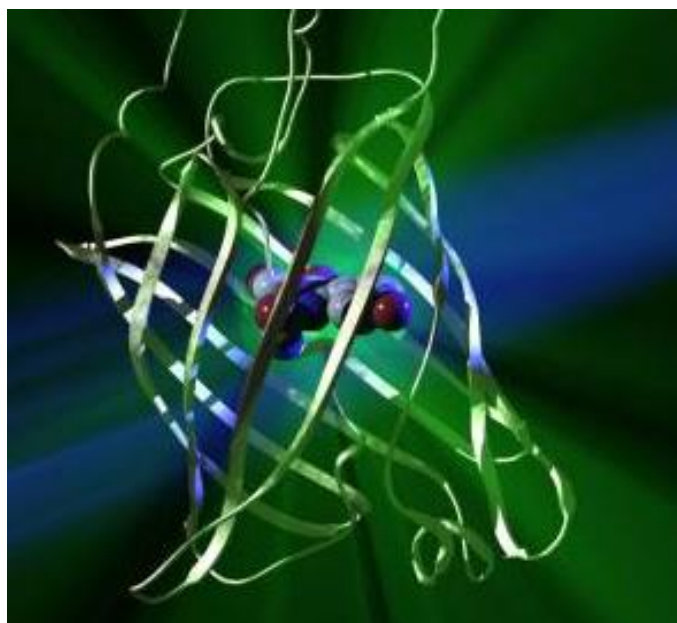


Figura 13 - Fluorescência verde emitida pela GFP após a sua excitação com a luminiscência azul proveniente da aequorina [161].

A GFP é uma proteína que absorve radiação aos 395 nm e 475 nm (na zona do azul), e emite a fluorescência a um comprimento de onda mais baixo, aos 509 nm (na zona do verde) [158-160]. Um dos problemas da GFP é a sua baixa intensidade de fluorescência. Para solucionar este problema, têm sido criadas diversas versões melhoradas desta proteína, como acontece com a EGFP, umas das GFP melhoradas mais utilizadas na investigação e a utilizada neste trabalho. Esta possui mutações S65T (serina passa a treonina) e F64L (fenilalanina passa a leucina), tornando-a mais termoestável e mais brilhante, com comprimento de onda de excitação a 488 nm e comprimento de onda de emissão a 507 nm [74, 158].

Devido à localização interna do cromóforo na proteína, a fluorescência desta proteína não é muito afectada pelo pH, solventes, temperatura e é resistente à atenuação, fenómeno vulgarmente conhecido por "*photobleaching*" devido à exposição contínua à radiação [27, 74].

A transfecção de células com este gene torna possível uma rápida percepção da transfecção, sendo a expressão desta proteína visível cerca de 4 a 5 h após a exposição das células ao vector. A visualização e quantificação da GFP pode ser realizada através de metodologias de microscopia de

fluorescência, citometria de fluxo activada por fluorescência (FACS), fluorimetria, etc. [63, 74, 158].

As características manifestadas por esta proteína fazem com que esta seja das proteínas mais utilizadas na investigação, já tendo sido aplicada e expressa em diversos organismos, como bactérias, fungos, plantas e animais [27]. Existem diversos vetores plasmídicos com o gene que codifica a GFP já comercializados por diversas empresas.

A utilização de moléculas fluorescentes como a GFP tem sido utilizada como agente de localização nas células e tecidos, funcionando como uma proteína repórter. A sua utilização não se limita à sua forma isolada, mas igualmente, em fusão com outras proteínas de interesse, permitindo a localização destas nas células [27]. Têm sido realizados estudos de silenciamento de genes com esta proteína, utilizando moléculas como ON-AS e siRNA [60, 162, 163], atingindo-se valores de silenciamento elevados, sendo superiores para siRNA.

1.3. Oligonucleótidos *antisense*

Neste trabalho, para se atingir um efeito *antisense*, de forma a atingir níveis mais baixos de expressão da EGFP, foram utilizados oligonucleótidos *antisense* (ON-AS). Estes, como anteriormente referido, podem ser pequenas cadeias de DNA ou RNA, nativas ou modificadas. No caso presente, os ON-AS são moléculas de DNA com 18 bases nucleótídicas, nas quais foram realizadas algumas modificações. Antes de mais, foram empregues três tipos de ON-AS, que correspondem ao ON-AS teste, ON-AS *mismatch* (controlo) e ON-AS-TAMRA (utilizado para a localização celular do ON).

O ON-AS teste e o ON-AS-TAMRA possuem a mesma sequência nucleotídica 5' -G*A*GCTGCACGCTGCCGT*C* - 3', sendo que o segundo possui, ligado à extremidade 5', um fluoróforo, o carboxitetrametilrodamina (TAMRA). Relativamente ao ON-AS *mismatch*, este possui uma sequência muito semelhante aos anteriormente referidos, apenas se diferenciando na troca de duas bases nucleótídicas, resultando na sequência (5' -

G*A*GCTCCACGCAGCCGT*C* - 3'), de forma a avaliar se o efeito de silenciamento de genes é, de facto, devido a um mecanismo *antisense*. Note-se que os * localizam os nucleótidos nos quais foram realizadas modificações químicas, nomeadamente a substituição de um oxigénio do grupo fosfato por um átomo de enxofre, resultando em nucleótidos fosforotioato. Como anteriormente exposto, a presença de dois tipos de nucleótidos num ON, faz deste um ON quimérico. A disposição dos nucleótidos fosforotioato apenas nas extremidades fazem deste um ON-AS *gapmer*. Foi referido, igualmente, que ambos os ON fosfodiéster e fosforotioato são capazes de activar a RNase H, e além disso, estes últimos protegem o ON da degradação enzimática por parte das nucleases [81].

A sequência do ON-AS escolhido para o nosso trabalho encontra-se referenciada em alguns artigos de silenciamento do gene da EGFP e o seu alvo é a região interna do mRNA que possui a informação para a EGFP [164, 165]. Hélin [164] demonstra que este é, de entre diversos ON, efectivamente o mais eficaz, atingindo-se valores de 70% de inibição de EGFP.

Aos ON-AS podem ser conjugados diversos tipos de moléculas fluorescentes. Cada molécula fluorescente possui características próprias que as distinguem das outras. Estas consistem, normalmente, num conjunto de anéis aromáticos planares com um sistema de electrões que, quando excitados num determinado comprimento de onda, libertam depois energia na forma de fotões luminosos, originando fluorescência [80].

A fluorescência de um fluoróforo é condicionada pelas condições ambientais como o pH e a concentração de iões. A fluorescência pode ser detectada por microscopia de fluorescência e quantificada por espectrofluorimetria [166].

O TAMRA (Figura 14) é uma molécula que deriva da rodamina, assim como tantas outras utilizadas, como a rodamina B, rodamina 110, rodamina 6G, sulforodamina B, sulforodamina 101, algumas delas conhecidas pelo nome comercial. O TAMRA é um fluoróforo que possui o máximo de absorção aos 546 nm (zona do amarelo) e o máximo de emissão aos 576 nm (zona do laranja-vermelho) [167].

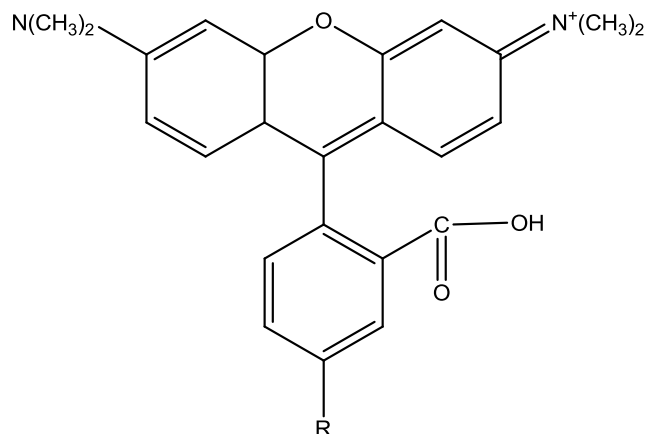


Figura 14 - Fluoróforo TAMRA, derivada da rodamina. A ligação ao ON-AS dá-se na posição R.

A conjugação do fluoróforo TAMRA a um ON-AS permite-nos localizar este ON na célula com técnicas de microscopia de fluorescência e estudar a interação do ON com os dendrímeros [168].

1.4. Dendrímeros PAMAM nativos e modificados

No capítulo anterior, vimos que os dendrímeros têm sido muito utilizados na transfecção de células com material genético devido às suas propriedades químicas e estruturais. Estas moléculas ramificadas, monodispersas e altamente organizadas, têm sido utilizadas em diversos estudos de silenciamento de genes, na sua forma nativa ou modificada [79, 106, 169, 170].

Os dendrímeros mais conhecidos, são, sem dúvida, os dendrímeros poli(amidoamina) (PAMAM), os quais permitem a condensação do material genético devido à presença de uma superfície positiva conferida pelas amins primárias [171, 172]. Além disso, as amins terciárias proporcionam um efeito tampão que tem um papel importante na libertação dos complexos vector/ácido nucleico dos endo-lisossomas. O excesso de dendrímero em relação ao material genético garante que se mantenha uma superfície positiva nos complexos a pH fisiológico, de forma a promover uma interação com a membrana celular. Os dendrímeros PAMAM têm sido utilizados para a entrega

de pDNA (expressão proteica), assim como de ON-AS e si-RNA (silenciamento de um gene específico) [81]. Estudos realizados por Bielinska [173] e Zhou [174] mostram que estes são eficientes na entrega destas moléculas, verificando-se um silenciamento do gene da luciferase de cerca de 25-50% (ON-AS) a 80% (siRNA), sem provocar grandes efeitos citotóxicos.

Neste trabalho foram utilizados dendrímeros PAMAM nativos e funcionalizados à superfície com grupos alquilo (por conjugação com os ácidos gordos láurico (La), mirístico (My) e palmítico (Pa)). Os dendrímeros funcionalizados (Figura 15) foram anteriormente sintetizados e caracterizados por Santos [86].

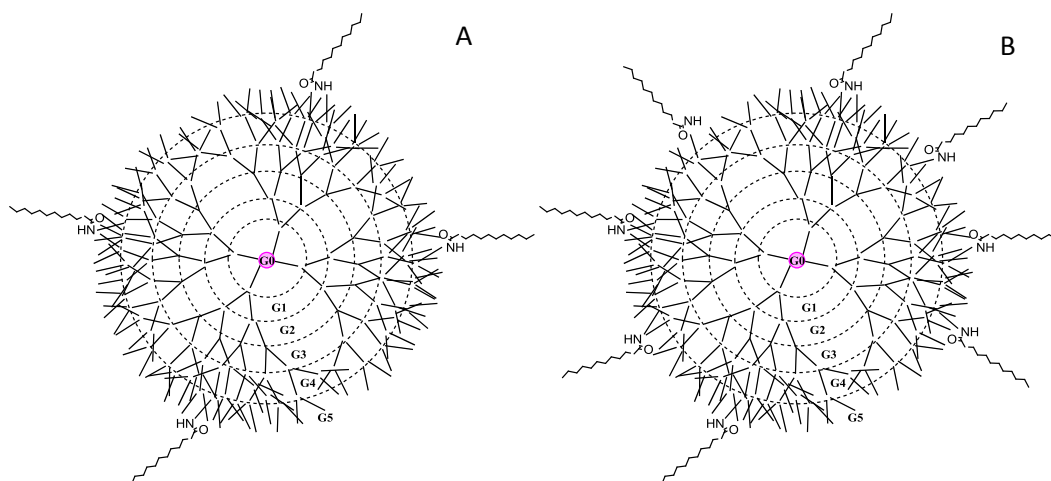


Figura 15 - Representação esquemática dos dendrímeros PAMAM G5 modificados com (A) 4 e (B) 8 moléculas de ácido gordo. Note-se que, a disposição dos ácidos gordos na Figura é uniforme, mas isso poderá não representar o que realmente acontece, uma vez que estes foram modificados de uma forma aleatória, podendo estes se encontrarem mais próximos uns dos outros.

Este trabalho mostrou que complexos formados por DNA plasmídico e estes dendrímeros (geração 5) com grupos hidrofóbicos à superfície eram facilmente internalizados por células estaminais mesenquimatosas, embora nem todos fossem muito eficientes para a entrega de genes. Achou-se, pois, que seria interessante testá-los como vetores para a entrega de ON-AS, uma vez que os ON-AS podem exercer a sua função já no citoplasma, não havendo a necessidade de ser entregues ao núcleo.

1.5. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo principal a avaliação do desempenho de dendrímeros PAMAM (geração 5), nativos e funcionalizados à superfície com grupos alquilo, como vectores para a entrega nas células de oligonucleótidos *antisense* e, conseqüentemente, no silenciamento de genes.

Em maior detalhe, o trabalho pretendeu:

a) Estudar as características dos complexos formados entre os dendrímeros e os oligonucleótidos, nomeadamente o seu tamanho e potencial- ζ ;

b) Avaliar as interacções estabelecidas dos complexos formados entre os dendrímeros e os oligonucleótidos, as quais são de natureza electrostática;

c) Avaliar a citotoxicidade dos complexos formados entre os dendrímeros e os oligonucleótidos usando células HeLa pEGFP em cultura;

d) Estudar o nível de silenciamento do gene da EGFP em células HeLa pEGFP em cultura obtido após transfecção com complexos formados com oligonucleótidos *antisense* e dendrímeros PAMAM (geração 5) nativos e modificados à superfície com grupos alquilo.

2. Secção experimental

2.1. Materiais e reagentes

As células HeLa pEGFP utilizadas neste projecto foram gentilmente oferecidas pelo Doutor Sebastian Neuman (Ruhr-University Bochum, Alemanha).

O ON *antisense*, ON *mismatch* (controlo) e ON *antisense*-TAMRA, para o silenciamento de EGFP foram adquiridos na Biomers (Alemanha), com as seguintes características: ON *antisense* (5' -G*A*GCTGCACGCTGCCGT*C* - 3'), ON *mismatch* (5' -G*A*GCTCCACGCAGCCGT*C* - 3') e ON *antisense*-TAMRA (5' - TAMRA -G*A*GCTGCACGCTGCCGT*C* - 3'), onde * representa uma modificação fosforotioato (nos dois primeiros e dois últimos nucleótidos do ON fosfodiéster). Estes ON são *gapmers* fosforotioato.

A eficiência dos ON *mismatch* e ON *antisense* teste foi comparada com a obtida utilizando sistemas de entrega de material genético já comercializados, nomeadamente PolyMAG do kit Magnetofection™ 2.3 (Chemicell) e Superfect® (Qiagen). Outro material de referência utilizado foi o PEI (25 kDa) da Sigma.

Os dendrímeros PAMAM de geração 5 (G5) com centro EDA e grupos terminais amina, em solução aquosa, foram adquiridos através da Dendritech, Inc. (EUA). Os dendrímeros modificados com ácidos gordos foram anteriormente sintetizados no Centro de Química da Madeira [86]. Aos dendrímeros PAMAM G5 modificados com os diferentes ácidos gordos foi atribuída a seguinte nomenclatura: G5.La4 e G5.La8, G5.My4 e G5.My8, G5.Pa4 e G5.Pa8, especificados na seguinte Tabela 3.

Tabela 3 - Nomenclatura e respectivas características dos dendrímeros PAMAM G5 funcionalizados com grupos alquilo.

Designação	Tipo de ácido gordo conjugado	Nº de moléculas de ácido gordo conjugados
G5.La4	Ácido Láurico (C12)	4
G5.La8	Ácido Láurico (C12)	8
G5.My4	Ácido Mirístico (C14)	4
G5.My8	Ácido Mirístico (C14)	8
G5.Pa4	Ácido Palmítico (C16)	4
G5.Pa8	Ácido Palmítico (C16)	8

A origem de todos os restantes reagentes e materiais utilizados neste trabalho e não referidos nesta secção, será discriminada ao longo da descrição experimental.

2.2. Preparação dos "dendriplexos"

Os complexos entre os ON e os dendrímeros (G5, G5.La4, G5.La8, G5.My4, G5.My8, G5.Pa4, G5.Pa8) foram preparados a diferentes razões de NP, nomeadamente, 2, 6 e 10.

Os complexos foram preparados obedecendo sempre à mesma ordem de adição dos seus componentes. Às quantidades necessárias de ON foi adicionado o volume adequado de uma solução tampão HBG ($7,0 < \text{pH} < 7,2$) constituída por 10 mM Hepes (USB, EUA) e glucose 5% (p/p) (Riedel-de-Haën, Alemanha). Esta solução com o ON foi agitada (usando um vórtex) vigorosamente durante 10 s e incubada durante 15 min à temperatura ambiente. De seguida, foram adicionadas as quantidades necessárias de dendrímeros para a formação de complexos nas diferentes razões de NP. Estas soluções foram, então, agitadas durante 10 s e incubadas durante 20 min à temperatura ambiente.

2.3. Caracterização dos "dendriplexos" por DLS e potencial- ζ

Os complexos entre o ON *antisense* e os dendrímeros (G5, G5.La4, G5.La8, G5.My4, G5.My8, G5.Pa4, G5.Pa8) foram preparados a razões NP 2, 6, e 10, seguindo a metodologia anteriormente descrita. Os complexos foram preparados utilizando 5 μg de ON *antisense*, num volume final de 1 mL de solução tampão.

As dimensões das partículas foram determinadas à temperatura ambiente no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) a 633 nm, utilizando um ângulo de detecção de 173°.

As medições de potencial- ζ foram realizadas no mesmo equipamento, utilizando as mesmas soluções de complexos, a um ângulo de 173°. Os potenciais- ζ foram calculados usando o modelo de Smoluchowsky.

Foram realizadas medições em triplicado e de forma independente. Os resultados do diâmetro são apresentados em nanómetros e os de potencial- ζ em mV.

2.4. Avaliação da interacção do oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA com dendrímeros

Os complexos formados entre o ON *antisense*-TAMRA e os dendrímeros (G5, G5.La4, G5.La8, G5.My4, G5.My8, G5.Pa4, G5.Pa8) foram preparados a razões NP 2, 6, e 10 seguindo a metodologia anteriormente descrita. Os complexos foram preparados utilizando 1 μg de ON *antisense*, num volume final de 200 μL de solução tampão.

Terminada a incubação, as soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços opaca (Corning® Costar®) e a fluorescência emitida pelo fluoróforo TAMRA, em cada amostra, foi medida num leitor de microplacas (modelo Victor³ 1420, PerkinElmer) a $\lambda_{\text{excitação}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 590 \text{ nm}$. Estas medições foram realizadas em triplicado e de forma independente.

A percentagem de fluorescência relativa foi determinada através da fórmula:

$$\% \text{ fluorescência}(F) = \frac{F(\text{amostra}) - F(\text{branco})}{F(\text{DNA}) - F(\text{branco})} \times 100$$

em que F(amostra) corresponde à fluorescência emitida pelo ON *antisense*-TAMRA nos complexos, F(branco) é a fluorescência emitida pela solução tampão e finalmente a F(DNA) a fluorescência emitida pelo ON *antisense*-TAMRA no seu estado livre em solução tampão.

2.5. Avaliação da perda de interacção do oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA com dendrímero G5

Os complexos entre o ON *antisense*-TAMRA e dendrímero G5 foram preparados a NP 2, 6, e 10, como descrito anteriormente, utilizando 5 µg de ON num volume final de 1mL.

Terminada a incubação, a fluorescência emitida pelo fluoróforo TAMRA em cada amostra foi medida numa célula de quartzo (1cm x 0,5 cm) num espectrofluorímetro (LS55, PerkinElmer) a $\lambda_{\text{excitação}} = 544 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 583 \text{ nm}$.

De seguida, foram adicionados 333 µL de uma solução 4% (p/p) dodecil sulfato de sódio (SDS, PlusOne) e homogenizado. Estas soluções incubaram durante 5 min e a fluorescência emitida pelo fluoróforo TAMRA em cada amostra foi medida numa célula de quartzo (1cm x 0,5 cm) num espectrofluorímetro (LS55, PerkinElmer) a $\lambda_{\text{excitação}} = 544 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 583 \text{ nm}$.

De forma a descontar a influência da diluição resultante da adição da solução de SDS, o procedimento foi repetido, sendo que foram adicionados 333 µL de água ultrapura em vez de SDS.

Todas estas medições foram realizadas em triplicado, de forma independente, de modo a verificar a reprodutibilidade dos resultados. Os resultados são apresentados em unidades de fluorescência relativa (RFU).

2.6. Cultura celular de HeLa pEGFP

As células HeLa pEGFP, em passagem 16, foram cultivadas e mantidas a 37°C, numa atmosfera de 5% CO₂, em placas de Petri (Corning ® Costar®) em meio Eagle com modificações Dulbecco (DMEM, ref. 12800-116, GIBCO) com elevado conteúdo de glucose e L-glutamina, suplementado com 10% soro bovino fetal (FBS), 1% antibiótico-antimicótico (AA) e 50 µg/mL sulfato de G418 (SIGMA), até atingirem níveis de confluência de 60 a 80%.

As células foram tripsinizadas utilizando uma solução de tripsina-EDTA (GIBCO) e subcultivadas em placas de poços adequadas para as experiências. Foram usadas células na passagem 17 em todas as experiências de transfecção.

2.7. Transfecção das células HeLa pEGFP

Para os testes de transfecção com os ON *antisense* e *mismatch*, as células HeLa pEGFP foram cultivadas em placas opacas de 96 poços, com fundo transparente (Corning ® Costar®), numa densidade de 4,5x10⁴ células/cm².

Há que salientar que foram cultivadas células suficientes para efectuar 8 réplicas para cada condição de transfecção (Tabela 4), e que foram feitos estudos de citotoxicidade e silenciamento 48h e 72 h após a transfecção.

Nas experiências de transfecção, as células cultivadas proliferaram durante 24 h em 200 µL de meio de cultura completo.

Tabela 4 - Condições de transfecção a que foram sujeitas as células. Para cada uma das situações representadas foram realizados 8 réplicas (8 poços de uma placa de 96 poços), sendo que todas as condições foram feitas em duplicado para os intervalos de tempo 48 h e 72 h, nomeadamente.

Controlos	Testes
Controlo negativo	G5 + <i>antisense</i> , NP2
	G5 + <i>antisense</i> , NP6
Controlo positivo <i>mismatch</i> , NP0	G5 + <i>antisense</i> , NP10
	G5.La4 + <i>antisense</i> , NP2
Controlo positivo <i>antisense</i> , NP0	G5.La4 + <i>antisense</i> , NP6
	G5.La4 + <i>antisense</i> , NP10
Controlo comercial PEI + <i>mismatch</i> , NP5	G5.La8 + <i>antisense</i> , NP2
	G5.La8 + <i>antisense</i> , NP6
Controlo comercial PEI + <i>antisense</i> , NP5	G5.La8 + <i>antisense</i> , NP10
	G5.My4 + <i>antisense</i> , NP2
Controlo comercial Superfect® : <i>mismatch</i> (5:1)	G5.My4 + <i>antisense</i> , NP6
	G5.My4 + <i>antisense</i> , NP10
Controlo comercial Superfect® : <i>antisense</i> (5:1)	G5.My8 + <i>antisense</i> , NP2
	G5.My8 + <i>antisense</i> , NP6
Controlo comercial PolyMAG™ : <i>mismatch</i> (1:1)	G5.My8 + <i>antisense</i> , NP10
	G5.Pa4 + <i>antisense</i> , NP2
Controlo comercial PolyMAG™ : <i>antisense</i> (1:1)	G5.Pa4 + <i>antisense</i> , NP6
	G5.Pa4 + <i>antisense</i> , NP10
	G5.Pa8 + <i>antisense</i> , NP2
	G5.Pa8 + <i>antisense</i> , NP6

Antes da transfecção, o meio de cultura foi substituído por 150 μ L de meio de cultura novo. Os dendriplexos foram preparados como anteriormente especificado e de acordo com a Tabela 4, tendo em conta que se adicionou 50 μ L/poço da solução de complexos. Brevemente, os complexos foram preparados utilizando 2,27 μ g/cm² de ON e, após a adição da solução tampão HBG, dos dendrímeros e posterior incubação, 50 μ L desta solução foram adicionados às células.

Os complexos com PEI foram preparados da mesma forma, na razão NP igual a 5, adicionando-se 50 μ L desta solução a cada poço.

Os complexos com o Superfect® foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, à razão Superfect (μ L) : ON (μ g) igual a 5.

Os complexos com as partículas magnéticas PolyMAG™ foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, utilizando uma razão ON (μ g) : PolyMAG (μ L) igual a 1.

Os controlos positivos ON *antisense* e *mismatch* consistem na exposição das células aos respectivos ON, apenas dissolvidos na solução tampão HBG. Relativamente ao controlo negativo, este refere-se à simples adição de solução tampão HBG às células.

As células estiveram em contacto com os complexos durante 6 h, sendo estes removidos por sucção e adicionados 200 μ L de meio de cultura completo. As células incubaram durante mais 48 h e 72 h, fazendo-se troca de meio de cultura de 24 em 24 h.

2.8. Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos complexos foi avaliada através do teste de redução de resazurina em resorufina, 48 h e 72 h após a transfecção. O meio de cultura foi removido e substituído por 200 μ L de meio de cultura completo contendo 10% v/v de uma solução 0,1mg/mL de resazurina (SIGMA). Após 3 h de incubação, a 37°C e 5% CO₂, 100 μ L deste meio foram retirados e

adicionados a uma placa de 96 poços opaca (NUNC) e a leitura da fluorescência foi feita num leitor de microplacas (modelo Victor³ 1420, PerkinElmer) a $\lambda_{\text{excitação}} = 530\text{nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 590\text{nm}$.

A viabilidade, medida através da actividade metabólica, é expressa em percentagem, considerando o valor obtido pelo controlo negativo como 100%.

2.9. Estudos de silenciamento de EGFP

Antes de se proceder ao teste de citotoxicidade, as células foram sempre observadas e fotografadas num microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE 2000E) equipado com câmara Nikon.

Após os estudos de citotoxicidade, o meio de cultura ainda existente nas placas com as células foi retirado e as células foram lavadas uma vez com 200 μL de PBS (SIGMA). Às células, adicionou-se 50 μL de tampão de lise celular (RLB, Promega) e as placas foram agitadas durante 30 min, de modo a promover a lise celular.

Os extractos celulares foram imediatamente analisados nas mesmas placas (por possuírem o fundo transparente) fazendo uma leitura da fluorescência emitida pela EGFP no leitor de microplacas (modelo Victor³ 1420, PerkinElmer) a $\lambda_{\text{excitação}} = 485\text{nm}$, $\lambda_{\text{emissão}} = 510\text{nm}$.

A quantidade de proteína foi determinada através do teste de quantificação de proteína com ácido bicinconinato (BCA) e utilizando, como padrão de quantificação, a albumina sérica bovina. As placas com os lisados celulares relativas às 48 h foram guardadas a -20°C , de forma a fazer a quantificação de proteína simultaneamente com as de 72 h. Resumidamente, foram transferidos 10 μL dos lisados celulares de 48 h e 72h, para placas de 96 poços transparentes, e foram adicionados 200 μL da solução de BCA. A solução de BCA foi preparada imediatamente antes da utilização, através da mistura de duas soluções (A e B), especificadas na Tabela 5, na numa proporção de 50:1.

Tabela 5 - Composição das soluções A e B, que depois são misturadas numa proporção de 50:1, respectivamente.

Solução A (para 200 mL)	Solução B (para 50 mL)
2 g bicinconinato de sódio (FLUKA)	2 g sulfato de cobre pentahidratado (RIEDEL-DE HÄEN)
4 g carbonato de sódio (PANREAC)	
0,32 g tartrato dissódico (MERCK)	
0,8 g hidróxido de sódio (FLUKA)	
1,90 g bicarbonato de sódio (PANREAC)	

Seguiu-se uma incubação a 37°C, durante 1 h, protegendo as amostras da luz. A absorvância foi medida num leitor de microplacas (modelo Victor³ 1420, PerkinElmer), a $\lambda_{\text{absorção}} = 550$ nm.

A eficiência de entrega dos oligonucleótidos e, conseqüentemente, de silenciamento do gene da EGFP está expressa em RFU/mg proteína.

2.10. Estudos de microscopia de fluorescência para localização celular do oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA

Para se verificar a internalização dos ON por parte da célula, utilizou-se a técnica de microscopia de fluorescência (num microscópio invertido) e o ON *antisense*-TAMRA que emite fluorescência vermelha quando excitado no comprimento de onda adequado.

As células HeLa pEGFP foram cultivadas em placas transparentes de 24 poços, sobre *coverslips* tratados com colagénio, numa densidade de $8,33 \times 10^3$ células/cm². Estas proliferaram durante 24 h em 1 mL de meio de cultura completo, antes de serem transfectadas.

Antes da transfecção, o meio de cultura foi substituído por 900 μ L de meio de cultura completo. Foram apenas preparados complexos utilizando dendrímero G5, nas razões NP 2, 6 e 10, para diferentes tempos de transfecção, nomeadamente, 1 h, 2 h, 4 h e 6 h.

Os dendriplexos foram preparados como anteriormente especificado e em triplicado, tendo em conta que se adicionou 100 µL/poço da solução de complexos.

Resumidamente, os complexos foram preparados utilizando 0,55 µg/cm² de ON *antisense*-TAMRA e, após a adição da solução tampão, do dendrímero e posterior incubação, 100 µL desta solução foram adicionados às células.

As células estiveram em contacto com os complexos durante 1 h, 2 h, 4 h e 6 h, sendo os complexos depois removidos por sucção, e as células lavadas duas vezes com 1 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) e fixadas à temperatura ambiente durante 10 min, com uma solução constituída por 1,5 % (v/v) glutaraldeído (MERCK) e 0,14 M de cacodilado de sódio (SIGMA) preparada em PBS.

As células fixadas foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e, em seguida, os núcleos foram marcados com uma solução 2,5 µg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) em PBS, durante 10 min, à temperatura ambiente.

Os *coverslips* foram montados em lamelas, com as células fixadas para baixo, utilizando como meio de montagem o Vectashield® Mounting Media (Vector Labs, EUA). Foram conseguidas imagens fluorescentes usando o microscópio de fluorescência invertido (Nikon Eclipse TE 2000E) equipado com câmara Nikon, com a objectiva de 100x.

O sinal do oligonucleótido apareceu a vermelho devido ao fluoróforo TAMRA, enquanto as células emitiram fluorescência verde, devido à EGFP, e os núcleos a azul, devido ao DAPI. Foram captadas imagens apenas das preparações onde foi possível detectar sinal vermelho.

2.11. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos resultados foi executado no programa Excel, da Windows. Os resultados são apresentados como a média ± desvio-padrão em relação à média.

3. Resultados e discussão

Nesta secção, apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos no trabalho experimental, tentando sempre relacioná-los com resultados de trabalhos já publicados.

3.1. Caracterização dos "dendriplexos" por DLS e potencial- ζ

Na primeira secção deste trabalho, vimos que factores como a concentração de iões, pH e temperatura das soluções, solubilidade, dimensão e carga dos vectores são importantes para a interacção e/ou condensação dos ácidos nucleicos com os sistemas de entrega [175]. Só assim é possível uma internalização destes complexos por parte das células e uma transfecção eficiente.

Previamente a qualquer estudo celular, foram preparados dendriplexos a diferentes razões NP utilizando o ON *antisense*, numa solução tampão HBG. Esta solução tampão, com baixa força iónica (baixa concentração de iões) é capaz de manter o pH fisiológico e alguma estabilidade dos complexos, uma vez que os seus componentes não competem para interacção com os ON e dendrímeros.

Os dendriplexos foram preparados nas razões NP 2, 6 e 10, e medições através de difusão dinâmica da luz (DLS) foram realizadas para se determinar a dimensão e PDI das nanopartículas formadas (Figura 16 e Figura 17). Foram igualmente realizadas medições de DLS aos respectivos controlos, que consistem em soluções apenas de dendrímeros em solução tampão HBG, a uma concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a qual corresponde a uma concentração de dendrímeros superior a qualquer das concentrações usadas nas experiências com oligonucleótidos, como podemos verificar pela Tabela 6.

Tabela 6 - Concentrações em µg/mL, de dendrímeros nas respectivas razões NP, considerando 5 µg de ON *antisense*.

Dendrímeros (µg/mL)	Razão NP		
	2	6	10
G5	7,68	23,00	38,34
G5.La4	8,18	24,55	45,82
G5.La8	8,66	25,97	43,28
G5.My4	8,29	24,86	41,43
G5.My8	8,94	26,83	44,71
G5.Pa4	8,41	25,24	42,06
G5.Pa8	9,09	27,26	45,43

Sabe-se, de antemão, que uma molécula de dendrímero PAMAM G5 possui um diâmetro de aproximadamente 50 Å, ou seja, 5 nm [81]. Os dendrímeros modificados com ácidos gordos não terão um diâmetro muito diferente destes, uma vez que apenas possuem 4 ou 8 cadeias alifáticas em toda a molécula. A preparação dos complexos envolve a interação de oligonucleótidos com cerca de 18 bases, moléculas estas, que não terão maior comprimento que o dendrímero, ao contrário do que acontece com um pDNA.

Os complexos foram preparados em solução tampão HBG a diferentes razões NP.

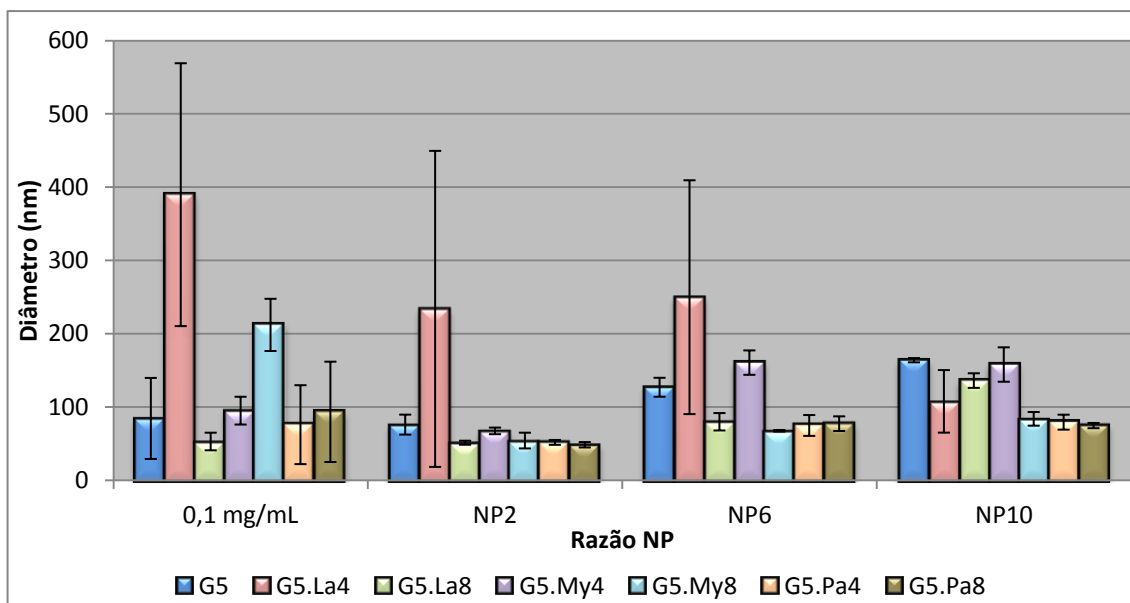


Figura 16 - Diâmetro hidrodinâmico médio dos dendrímeros não complexados (0,1mg/mL) e dos dendríplexos, a diferentes razões NP, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em nm.

Numa primeira visualização dos resultados apresentados na Figura 16, podemos constatar que, no grupo controlo, os diâmetros dos dendrímeros são muito superiores ao valor de 5 nm e que estes apresentam os maiores desvios-padrão. Podemos concluir, então, que os dendrímeros se encontram agregados na solução tampão, formando partículas com diâmetros entre 50 nm e 400 nm. A agregação dos dendrímeros em solução é particularmente importante para o caso dos dendrímeros G5.La4, os quais formam agregados com um diâmetro médio de 400 nm.

Relativamente aos dendríplexos, em geral, o aumento da razão NP leva a pequenos aumentos no seu diâmetro, havendo uma excepção, os dendríplexos formados a partir do G5.La4. Neste caso, o diâmetro é muito elevado quando comparado com o dos outros complexos e a tendência é de diminuição do diâmetro com o aumento da razão NP. Como vimos, os agregados formados apenas por dendrímeros G5.La4 já apresentavam dimensões maiores à partida. Adicionalmente, há que notar os elevados valores de desvio-padrão associados a estes resultados.

Uma vez que a concentração de ON *antisense* é sempre constante e a variável é a concentração de dendrímero, é possível que aumento da razão NP passe a significar que os dendrímeros "competem" pela interacção com o ON, acabando este por funcionar como um agente de agregação dos dendrímeros em solução [26]. Comparando os valores dos complexos com os do grupo controlo, podemos comprovar, para alguns dos casos, que o aumento do diâmetro não se deve ao simples facto de haver maior quantidade de dendrímero em solução. Isto porque, como referido antes, uma concentração de 100 µg/mL de dendrímeros corresponde a uma concentração bastante superior às concentrações de dendrímeros usadas nas diferentes razões NP testadas. Há que ter também em consideração, que os desvios-padrão são elevados, quando comparados com os dos complexos nas diferentes razões NP.

Os dendriplexos, excluindo o G5.La4, possuem diâmetros que vão desde os 49 nm (G5.Pa8, NP2) até aos 164 nm (G5, NP10), ou seja, apresentam, dimensões suficientemente pequenas para poderem entrar nas células por endocitose. De facto, alguns trabalhos publicados e referenciados por De Smedt [26] mostram que partículas com dimensões de 100 nm a 500 nm são capazes de serem internalizadas pelas células.

Por outro lado, os complexos com dendrímero G5 apresentam para todas as razões NP, o maior valor de diâmetro, enquanto os complexos com dendrímero G5.Pa8, para todas as razões NP apresentam o menor valor de diâmetro. Podemos, então estabelecer uma ordem para os diâmetros dos complexos, onde se tem G5.La4 (excepção) > G5 > G5.My4 > G5.La8 > G5.My8 > G5.Pa4 > G5.Pa8. Com isto conclui-se que em termos gerais e para uma razão NP fixa, quanto maior o número de substituições e comprimento da cadeia hidrofóbica, menor é o diâmetro do dendriplexo.

Simultaneamente com a determinação do diâmetro dos complexos, foram obtidos dados referentes ao PDI (Figura 17), que nos informa sobre a homogeneidade das amostras.

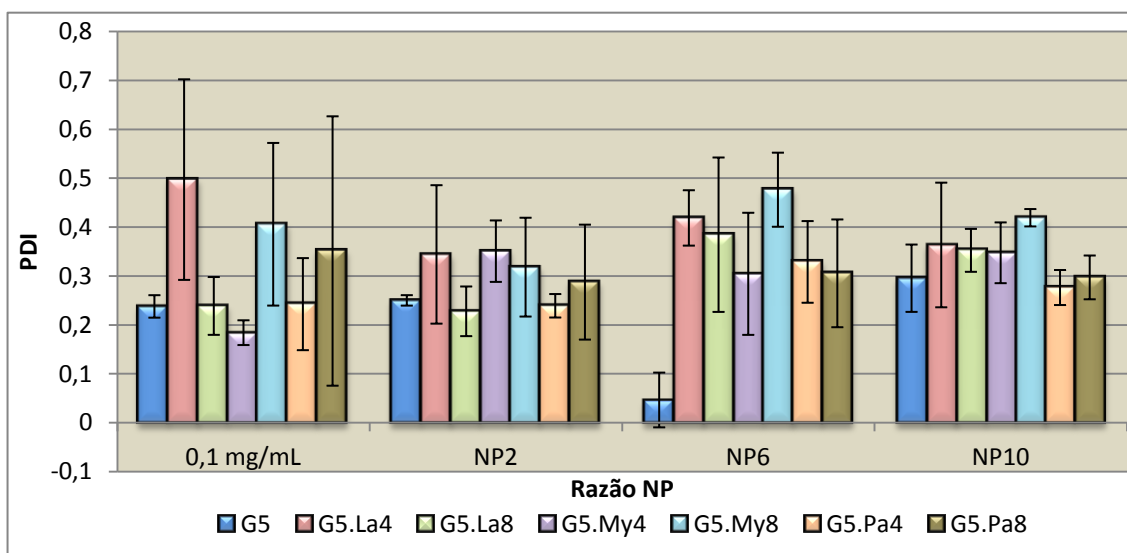


Figura 17 - PDI dos complexos preparados nas diferentes razões NP, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em réplicas independentes e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão.

Podemos observar que os PDI, de uma forma geral, se localizam entre os valores 0,2 e 0,5 o que indica alguma heterogeneidade nas amostras.

Medições de potencial- ζ foram também executadas (Figura 18) para avaliar a carga e estabilidade dos complexos em solução. Estes vêm complementar todos os resultados anteriormente discutidos e, de certa forma, concluir a caracterização dos complexos quando à suas propriedades físicas. O potencial- ζ representa a diferença de potencial entre o meio onde as partículas se encontram dispersas (o solvente) e a camada estacionária de fluido existente em torno dessas partículas [176]. Em termos práticos, quanto maior for o valor absoluto do potencial- ζ , maior a repulsão existente entre as partículas numa solução e maior a resistência à agregação dessas mesmas partículas (há uma maior estabilidade da solução).

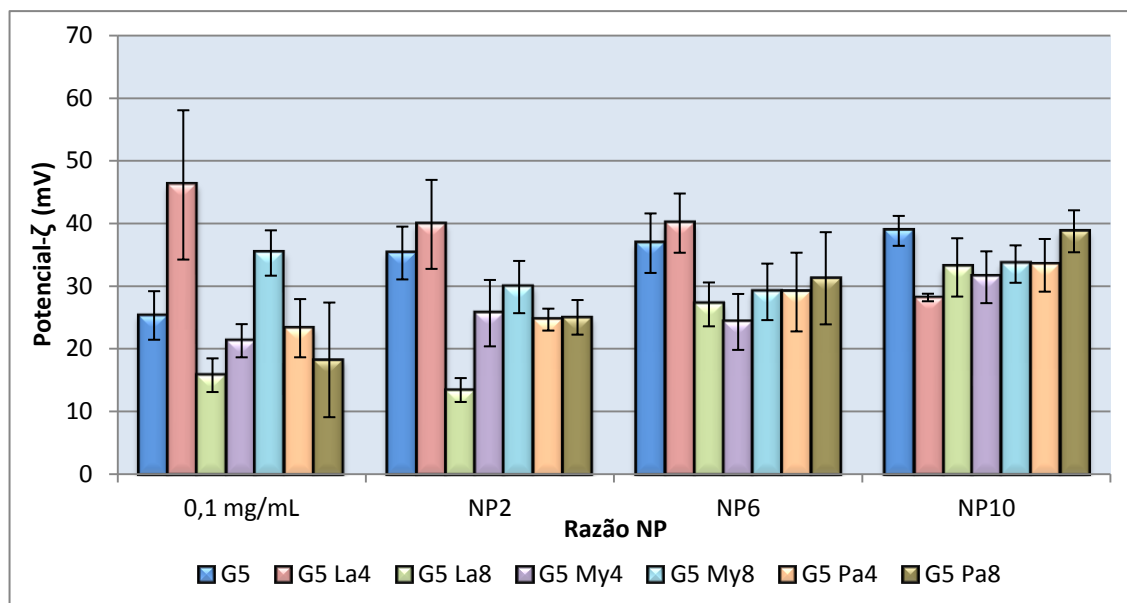


Figura 18 - Potencial- ζ dos dendríplexos preparados nas diferentes razões NP. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em mV.

Através dos resultados representados na Figura 18, evidencia-se um aumento do potencial- ζ nos complexos com o aumento da razão NP o que se traduz num aumento da estabilidade das soluções. Por outro lado, em termos gerais, o potencial- ζ dos complexos formados com G5 é superior aos dos complexos com dendrímeros modificados. Isto está de acordo com as conclusões de Santos [14], de que as cadeias hidrofóbicas exercem um efeito de blindagem sobre as amins primárias, diminuindo a carga à superfície dos dendríplexos.

3.2. Avaliação da interacção do oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA com dendrímeros

Estando os dendrímeros carregados positivamente e os oligonucleótidos negativamente, é de esperar que ocorram interacções de natureza electrostática entre eles. Neste trabalho, procurou-se estudar este processo

utilizando técnicas de fluorescência. Para isso, os ON foram marcados com o fluoróforo TAMRA e a fluorescência emitida por esta molécula foi medida em soluções contendo apenas ON (livre) e soluções com dendriplexos preparados a diversas razões NP.

Os resultados obtidos estão expostos na Figura 19. A intensidade de fluorescência emitida pelo TAMRA apresenta um valor máximo quando o ON está livre, em solução. Após a complexação dos ON com os dendrímeros, a intensidade da fluorescência diminui, sendo mais baixa para menores razões NP e crescendo à medida que a razão NP aumenta.

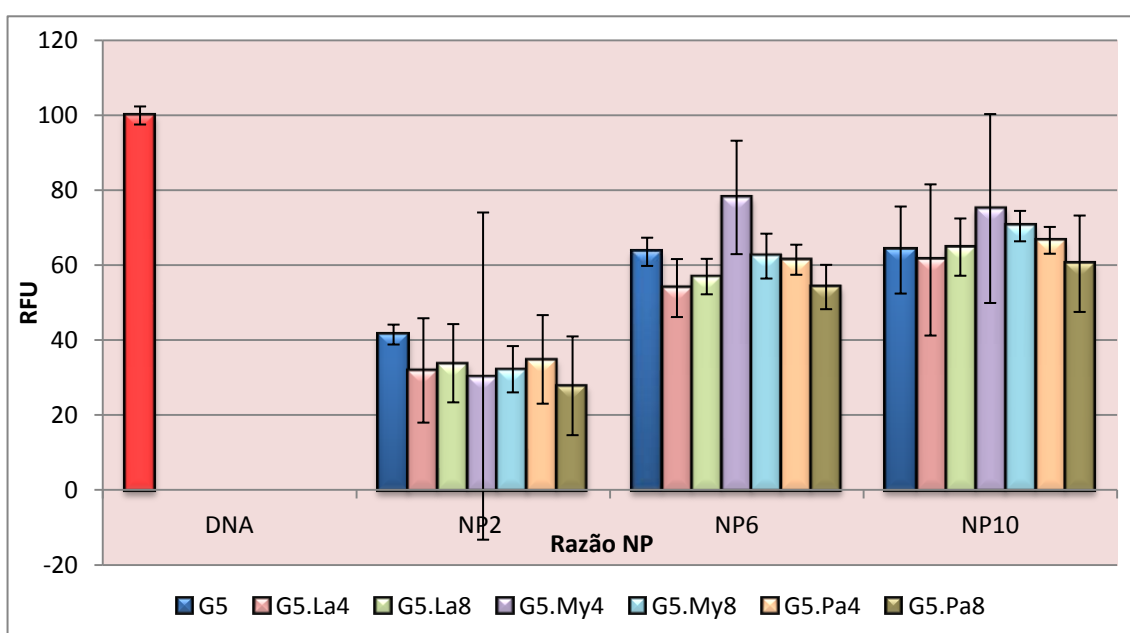


Figura 19 - Avaliação da condensação do ON *antisense*-TAMRA, onde DNA corresponde à fluorescência emitida pelo ON-*antisense*-TAMRA na sua forma livre. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em RFU.

Uma vez que a concentração de ON *antisense* é sempre constante e a variável é a concentração de dendrímero, é provável que uma menor concentração de dendrímeros (NP2) leve à formação de complexos com maior número de ON por dendrímero. Por outro lado, uma concentração mais elevada de dendrímero poderá originar complexos com menor número de ON por dendrímero, ou seja, os dendrímeros competem pelos ON presentes em solução. Como é possível que uma acumulação de ON nos dendrímeros (NP2)

produza um efeito de "*self-quenching*", ou seja, ocorra uma atenuação da fluorescência devido à proximidade das moléculas de ON *antisense*-TAMRA entre si, quanto maior for o número de ON por dendrímero, menor a intensidade da fluorescência.

A literatura refere este fenómeno, inclusive quando um dendrímero é marcado com demasiadas moléculas fluorescentes, ocorrendo depois "*quenching*" da fluorescência [80].

Procurou-se comprovar, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) que a razões de NP mais baixas o nº de fluoróforos associados a cada dendrímero era maior do que a razões de NP mais elevadas, mas os picos característicos do fluoróforo TAMRA apareciam na zona dos picos correspondentes aos constituintes do tampão HBG, sendo completamente mascarados.

3.3. Avaliação da perda de interacção do oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA com dendrímero G5

A adição de uma molécula surfactante, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), a uma solução com complexos formados por simples interacções electrostáticas entre moléculas com carga oposta, faz com que estes componentes dos complexos se separem. Um exemplo prático é a utilização de SDS na electroforese em poliacrilamida, fazendo com que as proteínas se desnaturem.

Neste contexto, pretendeu-se verificar se a interacção entre os ON e os dendrímeros era, de facto, de natureza electrostática e avaliar o efeito da adição de SDS ao sistema, novamente através da medição da fluorescência emitida pelo fluoróforo TAMRA ligado ao ON *antisense*.

Uma vez que os resultados anteriores (de interacção entre os dendrímeros e os ON) se apresentaram uniformes e foi verificada reprodutibilidade, estes estudos foram apenas realizados utilizando complexos com dendrímero nativos.

Estes resultados (Figura 20) vêm complementar os resultados anteriormente discutidos e, de certa forma, confirmar a natureza electrostática das interações estabelecidas entre os ON e os dendrímeros.

Antes de analisar os resultados propriamente ditos, há que salientar que, previamente à medição da fluorescência com complexos, foram feitas medições de alguns controlos para posterior comparação, nomeadamente, a medição da fluorescência da solução tampão HBG, ON *antisense*-TAMRA livre (DNA) e dendrímero G5 livre. Uma vez que, após a medição da fluorescência dos complexos, se adicionou SDS e se mediu novamente a fluorescência, temos que ter em conta o efeito da diluição na intensidade da fluorescência. Assim sendo, este procedimento foi repetido, sendo que nesta segunda vez, foi adicionada água ultrapura na mesma quantidade (mesmo volume) que a solução de SDS.

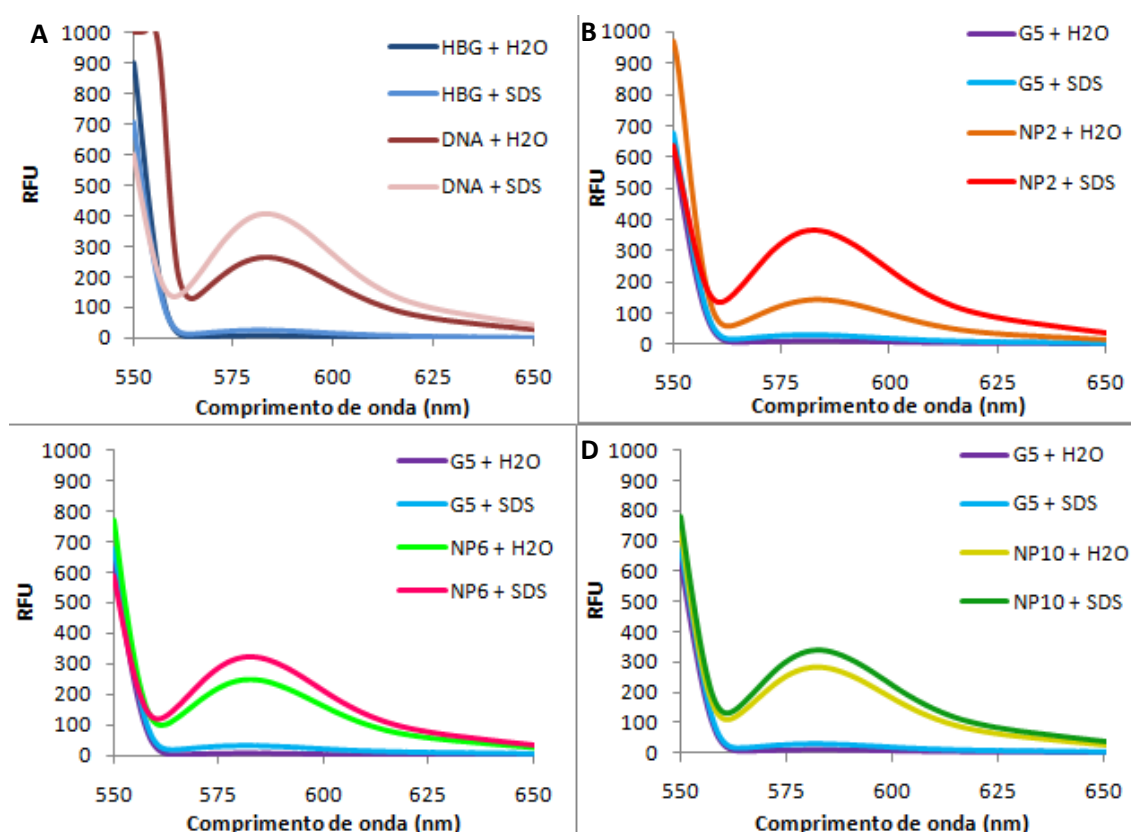


Figura 20 - Estudo do processo de descomplexação entre os ON-*antisense*-TAMRA e os dendrímeros nativos por adição de SDS. (A) Espectros de emissão apresentados pela solução tampão e pela solução de ON livre, na ausência e presença de SDS; (B) Espectros

de emissão apresentados pelas soluções de dendrímero G5 livre e dos seus complexos com ON na razão NP2; (C) Espectros de emissão apresentados pelas soluções de dendrímero G5 livre e dos seus complexos com ON na razão NP6; (D) Espectros de emissão apresentados pelas soluções de dendrímero G5 livre e dos seus complexos com ON na razão NP10. A intensidade de fluorescência está expressa em RFU.

A análise da Figura 20 mostra que quer a solução tampão (Figura 20A), quer as soluções contendo apenas dendrímeros (Figura 20B) não emitem fluorescência após incidência de luz com comprimento de onda 544 nm. Já as soluções contendo ON não complexados apresentam um pico de emissão a 583 nm que é característico do fluoróforo TAMRA (Figura 20A). De notar que, neste grupo de experiências, se partiu sempre de soluções preparadas em tampão e que os espectros de fluorescência após adição de solução de SDS (preparada em água) foram sempre comparados com os espectros obtidos por adição do mesmo volume de água. Assim, a análise da Figura 20A ainda revela que a presença de SDS em solução faz aumentar a intensidade de fluorescência do TAMRA.

Após complexação dos ON com os dendrímeros e para qualquer das razões NP estudadas, a intensidade de fluorescência do fluoróforo a 583 nm decresce de forma acentuada (Figura 20B-C, fenómeno já referido anteriormente). No entanto, após adição de SDS, a intensidade de fluorescência sobe para valores próximos dos exibidos pela solução contendo apenas ON-*antisense*-TAMRA (na presença de SDS), o que se atribui à quebra da interacção electrostática entre os dendrímeros e os ON (descomplexação). Estas experiências permitiram confirmar a natureza electrostática das interacções estabelecidas entre os ON e os dendrímeros e, adicionalmente, que o decréscimo verificado na intensidade de fluorescência do TAMRA na presença de dendrímeros se deve, efectivamente, à formação de complexos entre os dois tipos de moléculas.

3.4. Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos dendríplexos formados pelos dendrímeros nativos e modificados foi estudada através do teste de redução da resazurina em resorufina e usando as células HeLa pEGFP. Este teste informa sobre a actividade metabólica das células, podendo ser utilizado como um medida indirecta da viabilidade celular.

Os resultados destes estudos, feitos após 48 h e 72 h da transfecção das células, estão expostos na Figura 21.

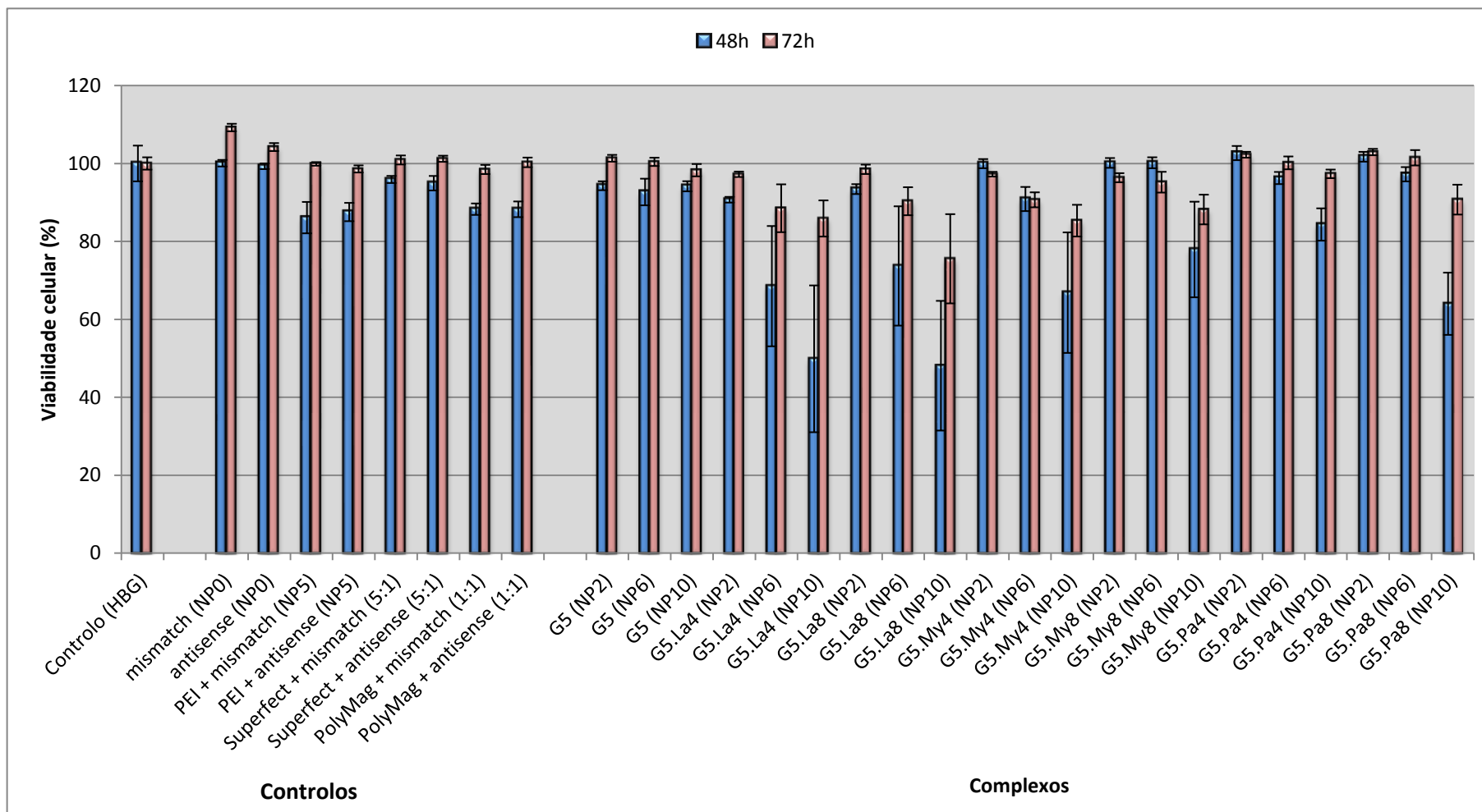


Figura 21 - Estudos de viabilidade celular, 48 h e 72 h após a transfecção. Os resultados estão representados como média \pm desvio-padrão, em percentagem relativamente ao controlo (células apenas expostas à solução tampão). Foram feitas 8 réplicas para cada experiência).

Na Figura 21 é possível observar dois grupos. O mais pequeno corresponde às experiências controlo, que inclui as células expostas apenas à solução tampão HBG, aos ON *mismatch* e *antisense* na sua forma livre, e aos complexos com sistemas de entrega comerciais como o PEI, o Superfect e o PolyMAG. O grupo maior corresponde às experiências utilizando os dendrímeros G5 nativos e modificados com ácidos gordos.

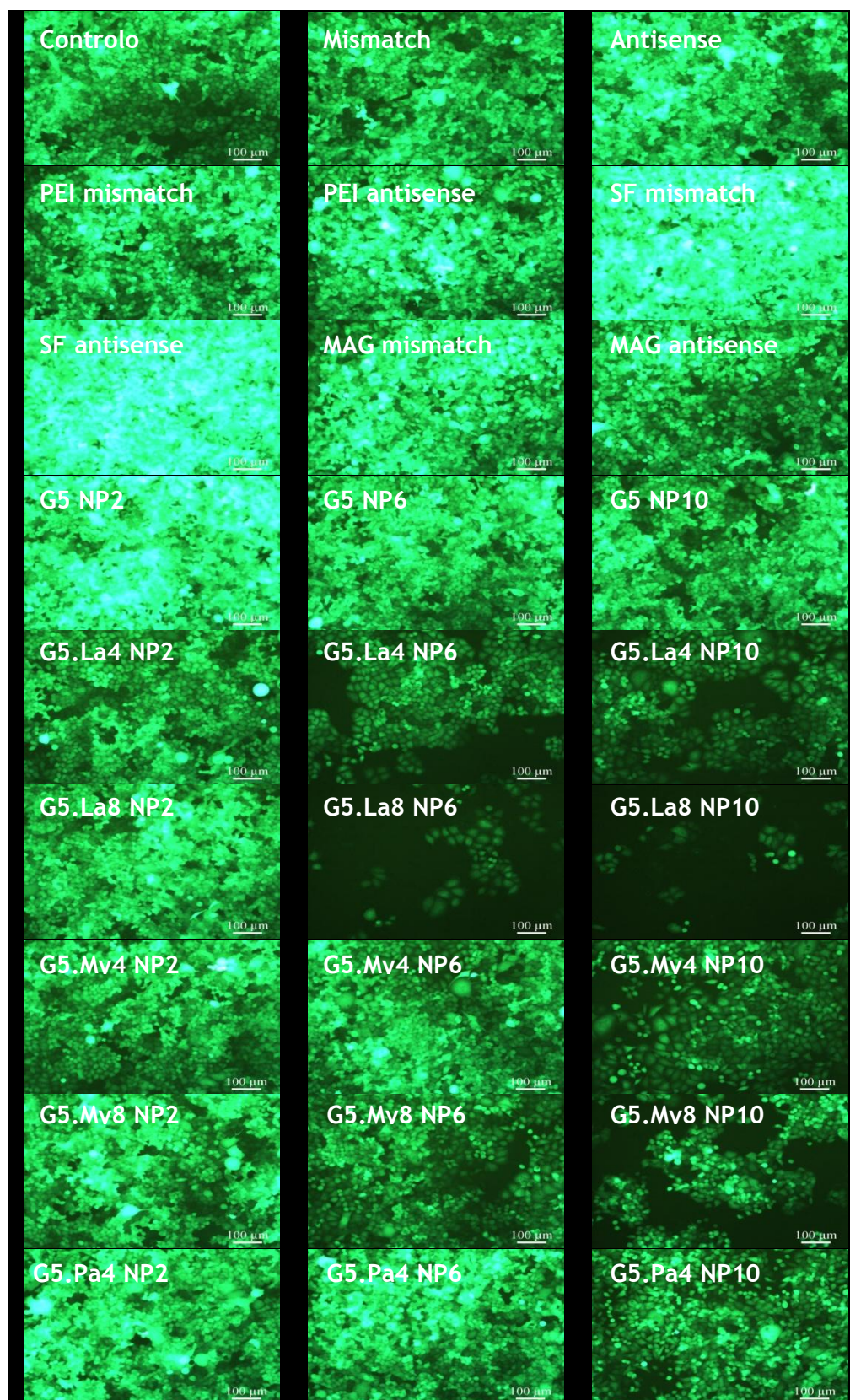
De uma forma geral, a viabilidade celular foi elevada nas condições experimentais utilizadas. Os valores de viabilidade estão, maioritariamente, localizados acima dos 80%, havendo apenas algumas excepções, que correspondem aos complexos formados pelos dendrímeros modificados preparados a razões NP mais elevados, sendo esta situação mais evidente para G5.La4 (NP6, NP10), G5.La8 (NP6, NP10) e G5.My4, G5.My8 e G5.Pa8 a razões NP10. Pode-se, pois, concluir que quer a presença de grupos alquilo na superfície dos dendrímeros, quer o aumento da razão NP, contribuem para a diminuição da viabilidade celular. Torna-se também evidente que as células recuperam após as 72 h.

Outros intervalos de tempo não foram considerados, nomeadamente, as 96 h ou maiores, uma vez que temos uma elevada densidade celular e o prolongamento da experiência levaria a uma elevada morte celular devido à confluência.

3.5. Estudos de silenciamento de EGFP

Após a transfecção das células HeLa pEGFP com os dendríplexos durante 6 h e avaliação da citotoxicidade às 48 h e 72 h, a expressão de EGFP foi quantificada. Antes de qualquer procedimento que afectasse a integridade celular (adição de RLB para provocar a lise celular), as células foram observadas ao microscópio e foram captadas imagens das culturas (Figura 22 e Figura 23). Note-se que a mancha verde presente nas Figuras corresponde às células que estão vivas e que expressam a EGFP. Há que salientar que a "mancha" verde é também dependente da morte celular e que não se podem

retirar, directamente destas imagens, conclusões relativamente ao silenciamento da EGFP.



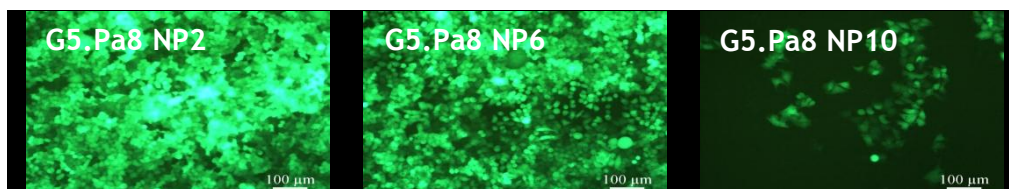
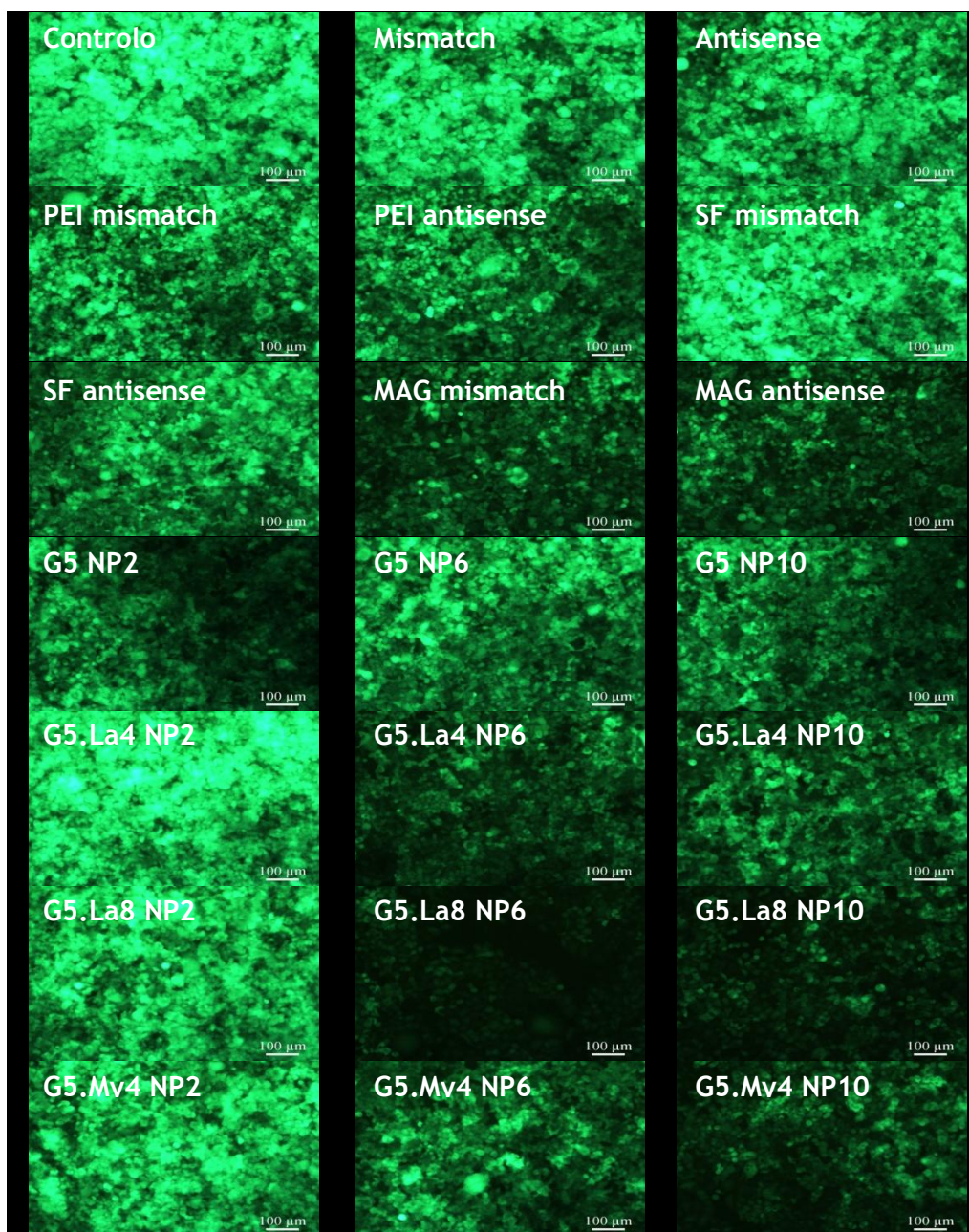


Figura 22 - Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLa pEGFP 48 h após a transfecção. Ampliação: 100x (escala = 100 µm)



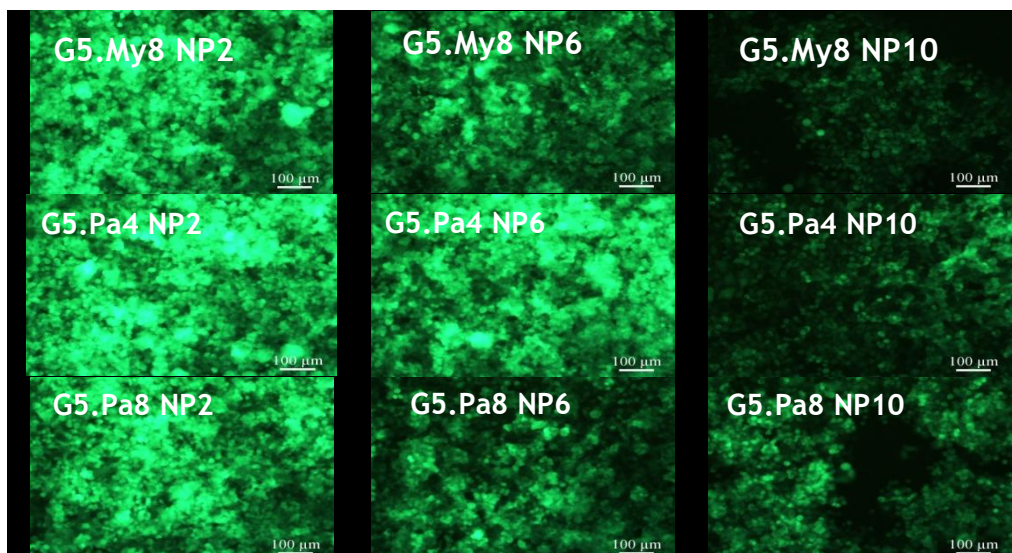


Figura 23 - Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLA pEGFP 72 h após a transfecção. Ampliação: 100x (escala = 100 µm)

A avaliação quantitativa da expressão da EGFP baseia-se, sim, na medição da intensidade da fluorescência de EGFP quando excitada ao comprimento de onda de 485 nm. Estes estudos foram efectuados usando extractos celulares obtidos após a transfecção e lise das células. De forma a retirar a influência de fenómenos como a morte celular, que afecta obviamente a quantidade de EGFP, foi efectuada, igualmente, a quantificação de proteína. Os resultados (Figura 24) são, por isso, apresentados em RFU/mg proteína.

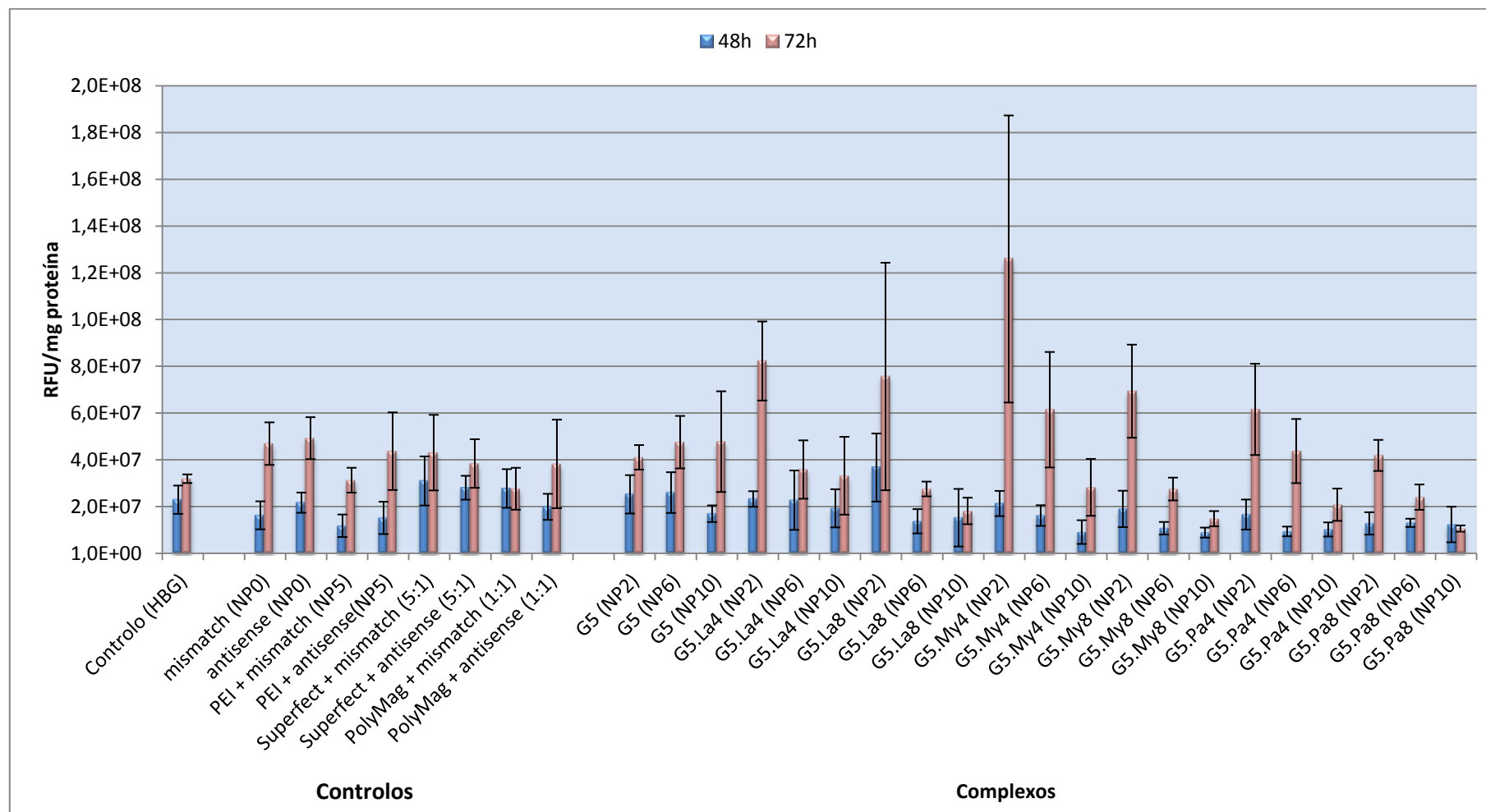


Figura 24 - Avaliação do silenciamento de EGFP nas células HeLa pEGFP, 48h e 72 h após a transfecção. Os resultados estão representados como média \pm desvio-padrão, em RFU/mg proteina.

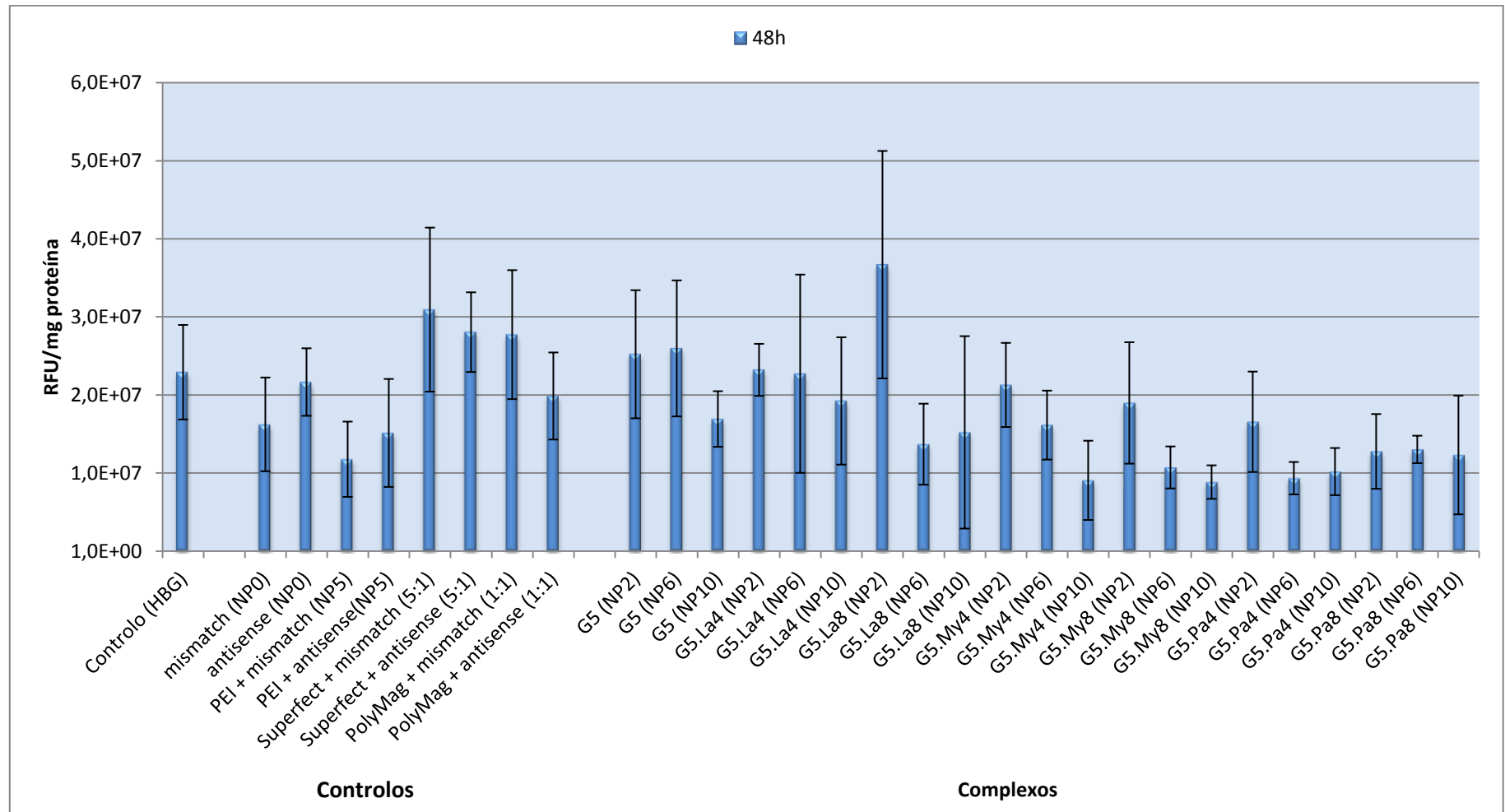


Figura 25 - Avaliação do silenciamento de EGFP nas células HeLa pEGFP, 48h após a transfecção. Os resultados estão representados como média ± desvio-padrão, em RFU/mg proteína.

Olhando de uma forma geral, é unânime afirmar que os valores de intensidade de fluorescência às 72 h são superiores aos das 48 h, o que está, provavelmente, relacionado com o facto destas células apresentarem uma velocidade de proliferação muito elevada. A presença de um oligonucleótido (*mismatch* ou *antisense*) parece, mesmo, ter um efeito estimulatório nesta "recuperação" das células verificada às 72 h após a transfecção. É pois, mais adequado, analisar o efeito de silenciamento do gene da EGFP às 48 h (Figura 25) após a transfecção.

Assim, 48 h após a transfecção, é possível afirmar que para cada tipo de dendrímero, o aumento da razão NP leva a uma maior inibição da expressão de EGFP (menores valores de RFU/mg proteína).

Em relação aos controlos, o que revelou maior efeito de silenciamento foi o complexo preparado com PEI às 48h, registando-se uma redução da expressão de EGFP entre 34%-48%. Isto está de acordo com a literatura, quando se diz que este continua a ser um sistema de transporte para ácidos nucleicos privilegiado [13].

Nos complexos preparados com dendrímeros, os menos eficientes na transfecção e silenciamento da expressão de EGFP foram os preparados com dendrímeros G5 nativos, esperando-se estes resultados após os estudos realizados por Santos [14], devido a uma menor interacção dos dendriplexos com a membrana celular. Quanto aos restantes dendrímeros, chega-se à conclusão de que quanto maior o grau de funcionalização, maior comprimento da cadeia hidrofóbica e maior razão NP, melhores são os resultados de transfecção e silenciamento. Conseguem-se mesmo estabelecer uma ordem crescente de eficiência de silenciamento para os complexos estudados. A ordem é: $G5 \approx G5.La4 < G5.La8 < G5.My4 < G5.My8 < G5.Pa4 < G5.Pa8$. Para os dendrímeros modificados, a eficiência de silenciamento do gene da EGFP aumenta com o aumento do potencial- ζ e a diminuição do diâmetro dos dendriplexos formados, por estarem facilitadas as interacções electrostáticas entre a membrana celular e os dendriplexos. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos realizados [23] que suportam que a presença de cadeias hidrofóbicas numa partícula facilita a interacção com a membrana celular mas

que, simultaneamente, é responsável pela manifestação de alguma citotoxicidade.

De realçar que, no estudo feito por Santos [86], que utilizou o mesmo tipo de dendrímeros para a internalização de pDNA, os dendrímeros funcionalizados com maior conteúdo em grupos -CH₂- foram, também, os mais eficientes na internalização do pDNA (o melhor foi o G5.Pa8), embora a expressão proteica fosse maior com os dendrímeros conjugados com ácido láurico.

No nosso caso, a transfecção revelou-se superior para dendrímeros com Pa. Isto mostra-nos que os complexos formados pelos G5.Pa4 e G5.Pa8 interagem melhor com a membrana celular, facilitando por isso, a internalização dos dendriplexos por parte das células. Além disso o efeito *antisense* dos ON pode ter lugar no citoplasma, não se verificando aqui a necessidade de ultrapassar a barreira imposta pelo invólucro nuclear (limitativa no caso da entrega de genes).

Em termos de percentagem, a redução da expressão de EGFP para os complexos com os diversos dendrímeros encontra-se exposta na Tabela 7.

Tabela 7 - Silenciamento da expressão de EGFP nas células HeLa pEGFP, após transfecção com complexos preparados com os seguintes dendrímeros.

Dendrímeros	Redução de EGFP (%) ^[a]
G5	26
G5.La4	16
G5.La8	43
G5.My4	60
G5.My8	61
G5.Pa4	59
G5.Pa8	67

^[a] Calculados com base na conversão dos valores máximos de silenciamento apresentados na Figura 24 para as 48 e 72h.

Os resultados obtidos nos estudos de silenciamento, mostram que a presença de cadeias hidrofóbicas (como as provenientes dos ácidos gordos

láurico, mirístico e palmítico), pode ser importante para a internalização de ácidos nucleicos, como é o ON *antisense*. Estes resultados são suportados por vários estudos onde a superfície dos dendrímeros foi modificada com cadeias hidrofóbicas [177].

3.6. Estudos de microscopia de fluorescência para localização celular do oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA

A conjugação do material genético com uma molécula que emita fluorescência é importante, pois permite-nos saber se este foi entregue e internalizado pelas células, assim como localizá-lo na célula através da Microscopia de Fluorescência. A informação obtida é apenas qualitativa.

Neste trabalho, tentou-se visualizar a internalização dos ON-*antisense*-TAMRA nas células HeLa pEGFP. Fez-se uma experiência em que os ON foram transfectados com recurso a dendrímeros nativos (G5), usando uma razão NP de 2. A Figura 26 mostra uma imagem de uma célula após 6h de transfecção. Embora não com grande nitidez (na foto impressa), é possível identificar na imagem pontos vermelhos (uma névoa vermelha), especialmente em torno do núcleo. Estes pontos correspondem a ON-*antisense*-TAMRA internalizado.

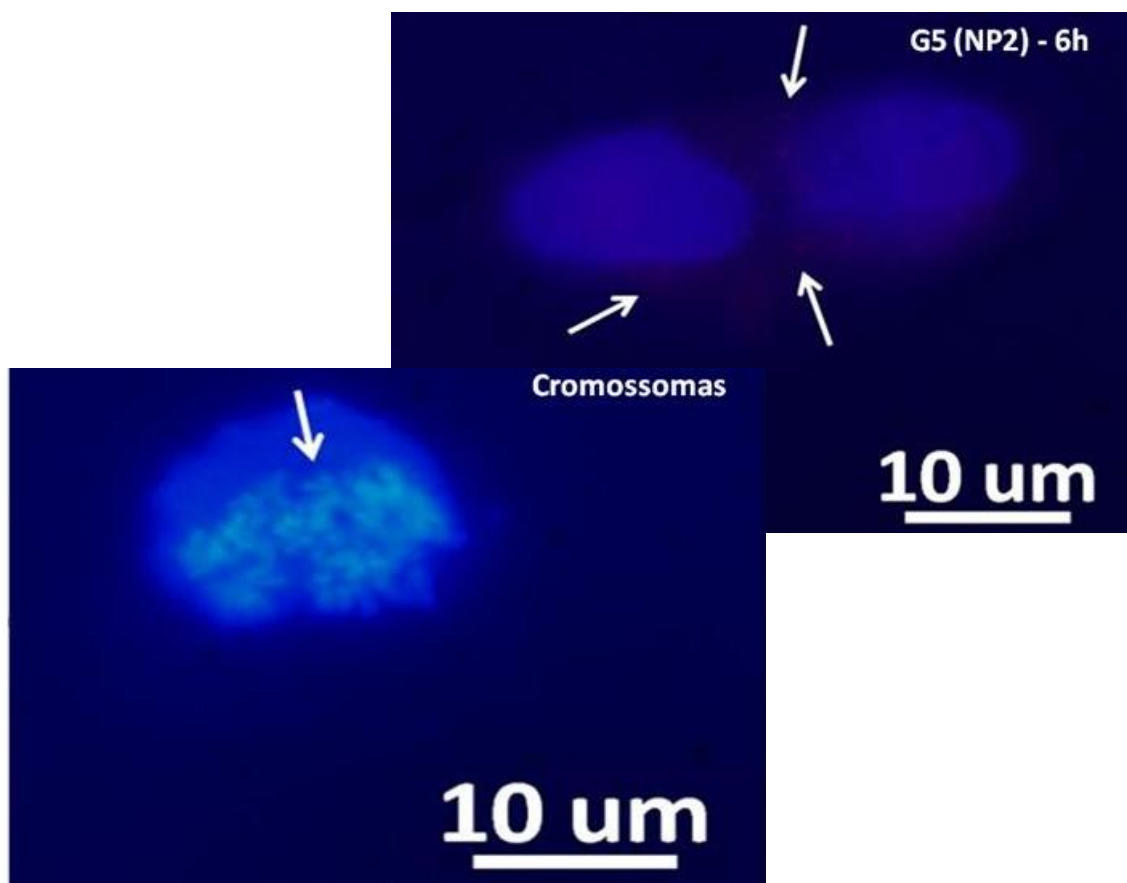


Figura 26 - Imagens de microscopia de fluorescência de células HeLa pEGFP após transfecção com complexos preparados com oligonucleótido *antisense* marcado com TAMRA (vermelho), para fins de visualização do fenômeno de internalização. Os núcleos celulares estão marcados com DAPI (azul). Ampliação = 1000 x (escala = 10 μ m).

Houve alguma dificuldade em captar imagens com alguma qualidade, devido ao efeito de dispersão da fluorescência (efeito "borrão") e ao tempo para localizar células que manifestassem sinais vermelhos (fenômeno "*photobleaching*" devido à exposição contínua à radiação de excitação).

A segunda imagem apresentada mostra apenas uma célula no início da divisão celular ou mitose, onde é possível visualizar os cromossomas fortemente corados com DAPI.

4. Conclusões e perspectivas

Este trabalho mostrou que a família de dendrímeros PAMAM de geração 5 funcionalizados à superfície com grupos alquilo (de natureza hidrofóbica) apresenta potencial para ser usada em terapia *antisense* como sistemas de entrega de oligonucleótidos.

A caracterização dos complexos formados entre os dendrímeros e os oligonucleótidos, de natureza comprovadamente electrostática, revelou que os dendrímeros com maior grau de funcionalização e os dendrímeros contendo cadeias hidrofóbicas mais longas são capazes de formar nanopartículas mais pequenas e com maior potencial- ζ , características estas que facilitam a sua interacção com a membrana celular e internalização.

Por outro lado, experiências de citotoxicidade realizadas *in vitro* com células HeLa pEGFP demonstraram que os dendriplexos exercem baixos efeitos citotóxicos nas condições experimentais usadas. Após a morte celular (diminuição da actividade metabólica) observada 48 h após transfecção com dendriplexos formados a partir de alguns membros desta família de vectores, verificou-se uma recuperação da actividade metabólica em cultura, a qual se apresentou sempre elevada às 72 h.

O silenciamento *in vitro* do gene da EGFP efectuado em células HeLa pEGFP mostrou estar directamente relacionado com o aumento da razão NP, bem como com o número e comprimento das cadeias alquilo à superfície dos dendrímeros. Concluiu-se que os dendrímeros conjugados com 4 e 8 moléculas de ácido palmítico foram os mais eficazes na entrega de ON-AS, atingindo-se valores de silenciamento de EGFP na ordem dos 67%.

Uma vez demonstrada a eficácia da família de dendrímeros usada na entrega de ON *antisense* em células HeLa pEGFP, seria interessante estudar-se, também, o efeito do tipo de ON *antisense* (outras modificações químicas, como por exemplo um ON-AS inteiramente fosforotioato) na eficácia do silenciamento do gene da EGFP. Estes sistemas de entrega poderão ser aplicados, igualmente, para a entrega de siRNA ou ribozimas, uma vez que o

silenciamento mediado por estas moléculas parece ser mais potente por serem moléculas mais estáveis.

Referências bibliográficas

1. Águas AP, Esaguy NM. Membranas biológicas. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 41-52.
2. Carmo-Fonseca M, David-Ferreira JF. A célula. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 1-12.
3. Ferreira HG, Moura T. Transporte transmembranar. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 91-106.
4. Ferreira J, Carmo-Fonseca M. Organização funcional do núcleo celular. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 107-115.
5. Ferreira PM, Silva FF. Biossíntese e processamento de proteínas. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 233-242.
6. Lechner MC. Transcrição: Biossíntese e processamento dos RNA mensageiros (mRNA) e de transferência (tRNA). In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 154-192.
7. Kausch I, Bohle A. Antisense oligonucleotide therapy in urology. *J Urology* 2002;168:239-247.
8. Gibson I. *Antisense and ribozyme methodology*. Weinheim: WILEY-VCH Verlaa GmbH & Co. KGaA, 2002. p. 1-67.
9. Azevedo C, Azevedo JE. Retículos e ribossomas. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 215-224.
10. Sambade C. A morte celular por apoptose. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 553-570.
11. Torres FO. A célula neoplásica. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 503-517.
12. Wacheck V, Zangemeister-Wittke U. Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hemat* 2006;59:65-73.
13. Godbey WT, Mikos AG. Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *J Control Release* 2001;72:115-125.
14. Santos JLS. *Functionalization of dendrimers for improved gene delivery to mesenchymal stem cells*. Ph.D. Thesis. Funchal: Universidade da Madeira, 2009.
15. Behr JP. Synthetic gene-transfer vectors. *Accounts Chem Res* 1993;26:274-278.

16. Jason TL, Koropatnick J, Berg RW. Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol Appl Pharm* 2004;201:66-83.
17. Wraight CJ, White PJ. Antisense oligonucleotides in cutaneous therapy. *Pharmacol Therapeut* 2001;90:89-104.
18. Dias N, Stein CA. Potential roles of antisense oligonucleotides in cancer therapy. The example of bcl-2 antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm* 2002;54:263-269.
19. Labhasetwar V. Nanotechnology for drug and gene therapy: The importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Curr Opin Biotech* 2005;16:674-680.
20. Chirila TV, Rakoczy PE, Garrett KL, Lou X, Constable IJ. The use of synthetic polymers for delivery of therapeutic antisense oligodeoxynucleotides. *Biomaterials* 2002;23:321-342.
21. Ruponen M, Honkakoski P, Ronkko S, Pelkonen J, Tammi M, Urtti A. Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. *J Control Release* 2003;93:213-217.
22. Dan Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000;18:33-37.
23. Albertazzi L, Serresi M, Albanese A, Beltram F. Dendrimer internalization and intracellular trafficking in living cells. *Mol Pharmacol* 2010;7:680-688.
24. Lobo-da-Cunha A. Lisossomas. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 303-311.
25. Mata L. Vesículas e vacúolos nos caminhos da endocitose e da exocitose. In: Azevedo C, editor. *Biologia Celular e Molecular*. Porto: Lidel, 2005. p. 263-269.
26. De Smedt SC, Demeester J, Hennink WE. Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm Res-Dordr* 2000;17:113-126.
27. Kingston RE. Introduction of DNA into mammalian cells. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., 2003. p. 9.0.1-9.15.20.
28. Marcusson EG, Bhat B, Manoharan M, Bennett CF, Dean NM. Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acids Res* 1998;26:2016-2023.
29. Wong SY, Pelet JM, Putnam D. Polymer systems for gene delivery-past, present, and future. *Prog Polym Sci* 2007;32:799-837.
30. Jeong JH, Kim SW, Park TG. Molecular design of functional polymers for gene therapy. *Prog Polym Sci* 2007;32:1239-1274.

31. Stephenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *P Natl Acad Sci-USA* 1978;75:285-288.
32. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *P Natl Acad Sci-USA* 1978;75:280-284.
33. Dagle JM, Weeks DL. Oligonucleotide-based strategies to reduce gene expression. *Differentiation* 2001;69:75-82.
34. Gewirtz AM, Sokol DL, Ratajczak MZ. Nucleic acid therapeutics: State of the art and future prospects. *Blood* 1998;92:712-736.
35. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): High-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry-US* 2004;43:13233-13241.
36. Fattal E, Bochot A. State of the art and perspectives for the delivery of antisense oligonucleotides and siRNA by polymeric nanocarriers. *Int J Pharmaceut* 2008;364:237-248.
37. Sazani P, Vacek MM, Kole R. Short-term and long-term modulation of gene expression by antisense therapeutics. *Curr Opin Biotech* 2002;13:468-472.
38. Urban E, Noe CR. Structural modifications of antisense oligonucleotides. *Farmaco* 2003;58:243-258.
39. Phillips MN. Antisense therapeutics. New Jersey: Humana Press Inc.; 2005. p. 3-309.
40. Cotter FE. Antisense therapy for cancer. *Cent Eur J Chem* 2003;1:19-27.
41. Gleave ME, Monia BP. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2005;5:468-479.
42. Jansen B, Zangemeister-Wittke U. Antisense therapy for cancer-the time of truth. *Lancet Oncol* 2002;3:672-683.
43. Hausen P, Stein H. Ribonuclease H. An enzyme degrading the RNA moiety of DNA-RNA hybrids. *Eur J Biochem* 1970;14:278-283.
44. Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): Fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001;8:1-7.
45. Agrawal S. Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489:53-68.
46. Pirollo KF, Rait A, Slier LS, Chang EH. Antisense therapeutics: From theory to clinical practice. *Pharmacol Therapeut* 2003;99:55-77.
47. Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Method Enzymol* 2000;313:156-164.

48. Pooga M, Land T, Bartfai T, Langel U. PNA oligomers as tools for specific modulation of gene expression. *Biomol Eng* 2001;17:183-192.
49. Sazani P, Kang SH, Maier MA, Wei C, Dillman J, Summerton J, Manoharan M, Kole R. Nuclear antisense effects of neutral, anionic and cationic oligonucleotide analogs. *Nucleic Acids Res* 2001;29:3965-3974.
50. McKay RA, Miraglia LJ, Cummins LL, Owens SR, Sasmor H, Dean NM. Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase c-alpha expression. *J Biol Chem* 1999;274:1715-1722.
51. Summerton J. Morpholino antisense oligomers: The case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489:141-158.
52. Wahlestedt C, Salmi P, Good L, Kela J, Johnsson T, Hokfelt T, Broberger C, Porreca F, Lai J, Ren K, Ossipov M, Koshkin A, Jakobsen N, Skouv J, Oerum H, Jacobsen MH, Wengel J. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *P Natl Acad Sci-USA* 2000;97:5633-5638.
53. Agrawal S, Jiang Z, Zhao Q, Shaw D, Sun D, Saxinger C. Mixed-backbone oligonucleotides containing phosphorothioate and methylphosphonate linkages as second generation antisense oligonucleotide. *Nucleos Nucleot Nucl* 1997;16:927-936.
54. Zhou W, Agrawal S. Mixed-backbone oligonucleotides as second-generation antisense agents with reduced phosphorothioate-related side effects. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:3269-3274.
55. Brown DA, Kang SH, Gryaznod SM, DeDionision L, Heidenreich O, Sullivan S, Xu X, Nerenberg MI. Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein bindin. *J Biol Chem* 1994;269:26801-26805.
56. Bongartz JP, Aubertin AM, Milhaud PG, Lebleu B. Improved biological activity of antisense oligonucleotides conjugated to a fusogenic peptide. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4681-4688.
57. Bachmann AS, Surovoy A, Jung G, Moelling K. Integrin receptor-targeted transfer peptides for efficient delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *J Mol Med* 1998;76:126-132.
58. Jeong JH, Kim SW, Park TG. A new antisense oligonucleotide delivery system based on self-assembled ODN-PEG hybrid conjugate micelles. *J Control Release* 2003;93:183-191.
59. Fattal E, Vauthier C, Aynie I, Nakada Y, Lambert G, Malvy C, Couvreur P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides. *J Control Release* 1998;53:137-143.

60. Sokolova V, Kovtun A, Prymak O, Meyer-Zaika W, Kubareva EA, Romanova EA, Oretskaya TS, Heumann R, Epple M. Functionalisation of calcium phosphate nanoparticles by oligonucleotides and their application for gene silencing. *J Mater Chem* 2007;17:721-727.
61. Toub N, Angiari C, Eboué D, Fattal E, Tenu JP, Le Doan T, Couvreur P. Cellular fate of oligonucleotides when delivered by nanocapsules of poly(isobutylcyanoacrylate). *J Control Release* 2005;106:209-213.
62. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK, Frank-Kamenetskii MD, Southern EM. Oligonucleotide dendrimers: Stable nano-structures. *Nucleic Acids Res* 1999;27:3035-3041.
63. Hirano T, Yamauchi N, Sato F, Soh T, Hattori MA. Evaluation of RNA interference in developing porcine granulosa cells using fluorescence reporter genes. *J Reprod Develop* 2004;50:599-603.
64. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
65. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2003;4:457-467.
66. Kim WJ, Kim SW. Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles. *Pharm Res-Dordr* 2009;26:657-666.
67. Amarzguioui M, Rossi JJ, Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi. *FEBS Lett* 2005;579:5974-5981.
68. Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment. *Adv Drug Deliver Rev* 2009;61:850-862.
69. Gao K, Huang L. Nonviral methods for siRNA delivery. *Mol Pharmacol* 2009;6:651-658.
70. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007;8:173-184.
71. Liu Z, Winters M, Holodniy M, Dai H. siRNA delivery into human t cells and primary cells with carbon-nanotube transporters. *Angew Chem Int Edit* 2007;46:2023-2027.
72. Alexander LM, Sanchez-Martin RM, Bradley M. Knocking (anti)-sense into cells: The microsphere approach to gene silencing. *Bioconjugate Chem* 2009;20:422-426.
73. Johnson LG. Gene therapy for cystic fibrosis. *Chest* 1995;107:775-835.
74. Rieder CL. *Methods in Cell Biology: Mitosis and Meiosis*. Academic Press, 1999. p. 114-381.

75. Partridge M, Vincent A, Matthews P, Puma J, Stein D, Summerton J. A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1996;6:169-175.
76. Flanagan WM, Wagner RW. Potent and selective gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Mol Cell Biochem* 1997;172:213-225.
77. Regnier V, Preat V. Localization of a FITC-labeled phosphorothioate oligodeoxynucleotide in the skin after topical delivery by iontophoresis and electroporation. *Pharm Res-Dordr* 1998;15:1596-1602.
78. Fisher TL, Terhorst T, Cao X, Wagner RW. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3857-3865.
79. Chonco L, Bermejo-Martin JF, Ortega P, Shcharbin D, Pedziwiatr E, Klajnert B, de la Mata FJ, Eritja R, Gomez R, Bryszewska M, Munoz-Fernandez MA. Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org Biomol Chem* 2007;5:1886-1893.
80. Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, Inc., 2008. p. 346-648.
81. Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker Jr JR. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm Sci Techn Today* 2000;3:232-245.
82. Goldman CK, Soroceanu L, Smith N, Gillespie GY, Shaw W, Burgess S, Bilbao G, Curiel DT. In vitro and in vivo gene delivery mediated by a synthetic polycationic amino polymer. *Nat Biotechnol* 1997;15:462-466.
83. Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker JR, Jr. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: Mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta* 1997;1353:180-190.
84. Park TG, Jeong JH, Kim SW. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliver Rev* 2006;58:467-486.
85. Liao ZX, Ho YC, Chen HL, Peng SF, Hsiao CW, Sung HW. Enhancement of efficiencies of the cellular uptake and gene silencing of chitosan/siRNA complexes via the inclusion of a negatively charged poly(γ -glutamic acid). *Biomaterials* 2010;31:8780-8788.
86. Santos JL, Oliveira H, Pandita D, Rodrigues J, P go AP, Granja PL, Tomás H. Functionalization of poly (amidoamine) dendrimers with hydrophobic chains for

- improved gene delivery in mesenchymal stem cells. *J Control Release* 2010;144:55-64.
87. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsässer HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: Effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res-Dordr* 1999;16:1273-1279.
88. Polyplus transfection. [17 Julho 2011]; Disponível em: <http://www.polyplus-transfection.com/transfection-reagents/>.
89. Thermo scientific fermentas molecular biology tools. [17 Julho 2011]; Disponível em: <http://www.fermentas.com/en/products/all/transfection/transfection-reagents>.
90. Thermo scientific open biosystems. [17 Julho 2011]; Disponível em: <http://www.openbiosystems.com/TransfectionReagents/>.
91. Guillem VM, Aliño SF. Transfection pathways of nonspecific and targeted PEI-polyplexes. *Gene Ther Mol Biol* 2004;8:369-384.
92. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *P Natl Acad Sci-USA* 1995;92:7297-7301.
93. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2003;24:1121-1131.
94. Höbel S, Loos A, Appelhans D, Schwarz S, Seidel J, Voit B, Aigner A. Maltose- and maltotriose-modified, hyperbranched poly (ethyleneimine)s (OM-PEIs): Physicochemical and biological properties of DNA and sirna complexes. *J Control Release* 2010;149:146-158.
95. Esfand R, Tomalia DA. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today* 2001;6:427-436.
96. Hawker CJ, Fréchet JM. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *J Am Chem Soc* 1990;112:7638-7647.
97. Wooley KL, Hawker CJ, Frechet JM. Polymers with controlled molecular architecture: Control of surface functionality in the synthesis of dendritic hyperbranched macromolecules using the convergent approach. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1991;5:1059-1076.

98. Mattews OA, Shipway AN, Stoddart JF. Dendrimers-branching out from curiosities into new technologies. *Prog Polym Sci* 1998;23:1-56.
99. Jang WD, Selim KMK, Lee CH, Kang IK. Bioinspired application of dendrimers: From bio-mimicry to biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2009;34:1-23.
100. Oliveira JM, Salgado AJ, Sousa N, Mano JF, Reis RL. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies—a review. *Prog Polym Sci* 2010;35:1163-1194.
101. Gupta U, Agashe HB, Asthana A, Jain NK. Dendrimers: Novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement. *Biomacromolecules* 2006;7:649-658.
102. Cloninger MJ. Biological applications of dendrimers. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:742-748.
103. Shcharbin DG, Klajnert B, Bryszewska M. Dendrimers in gene transfection. *Biochemistry-Mosc* 2009;74:1070-1079.
104. Astruc D, Boisselier E, Ornelas C. Dendrimers designed for functions: From physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. *Chem Rev* 2010;110:1857-1959.
105. Patri AK, Majoros IJ, Baker JR. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:466-471.
106. Waite CL, Sparks SM, Uhrich KE, Roth CM. Acetylation of PAMAM dendrimers for cellular delivery of siRNA. *BMC Biotechnol* 2009;9:38-47.
107. Dennig J, Duncan E. Gene transfer into eukaryotic cells using activated polyamidoamine dendrimers. *J Biotechnol* 2002;90:339-347.
108. Qiagen sample & assay technologies. [17 Julho 2011]; Disponível em: <http://www.qiagen.com/products/transfection/default.aspx>.
109. Tomalia DA, Reyna LA, Svenson S. Dendrimers as multi-purpose nanodevices for oncology drug delivery and diagnostic imaging. *Biochem Soc T* 2007;35:61-67.
110. Luo D, Haverstick K, Belcheva N, Han E, Saltzman WM. Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery. *Macromolecules* 2002;35:3456-33462.
111. Arima H, Kihara F, Hirayama F, Uekama K. Enhancement of gene expression by polyamidoamine dendrimer conjugates with alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins. *Bioconjugate Chem* 2001;12:476-484.
112. Singh P, Moll F, 3rd, Lin SH, Ferzli C, Yu KS, Koski RK, Saul RG, Cronin P. Starburst dendrimers: Enhanced performance and flexibility for immunoassays. *Clin Chem* 1994;40:1845-1849.

113. Haensler J, Szoka FC, Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjugate Chem* 1993;4:372-379.
114. Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Deliver Rev* 2005;57:2215-2237.
115. Kleinman MH, Flory JH, Tomalia DA, Turro NJ. Effect of protonation and PAMAM dendrimer size on the complexation and dynamic mobility of 2-naphthol. *J Phys Chem B* 2000;104:11472-11479.
116. Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2005;57:2177-2202.
117. Dutta T, Jain NK, McMillan NA, Parekh HS. Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery. *Nanomedicine-UK* 2010;6:25-34.
118. Navarro G, Tros de Ilarduya C. Activated and non-activated PAMAM dendrimers for gene delivery in vitro and in vivo. *Nanomedicine-UK* 2009;5:287-297.
119. Hudde T, Rayner SA, Comer RM, Weber M, Isaacs JD, Waldmann H, Larkin DF, George AJ. Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther* 1999;6:939-943.
120. Pandita D, Santos JL, Rodrigues J, Pego AP, Granja PL, Tomás H. Gene delivery into mesenchymal stem cells: A biomimetic approach using RGD nanoclusters based on poly(amidoamine) dendrimers. *Biomacromolecules* 2011;12:472-481.
121. Santos JL, Oramas E, Pego AP, Granja PL, Tomás H. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using PAMAM dendrimers as gene delivery vectors. *J Control Release* 2009;134:141-148.
122. Kim TI, Seo HJ, Choi JS, Jang HS, Baek JU, Kim K, Park JS. PAMAM-PEG-PAMAM: Novel triblock copolymer as a biocompatible and efficient gene delivery carrier. *Biomacromolecules* 2004;5:2487-2492.
123. Pan B, Cui D, Sheng Y, Ozkan C, Gao F, He R, Li Q, Xu P, Huang T. Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Res* 2007;67:8156-8163.
124. Pan B, Cui D, Xu P, Ozkan C, Feng G, Ozkan M, Huang T, Chu B, Li Q, He R, Hu G. Synthesis and characterization of polyamidoamine dendrimer-coated multi-walled carbon nanotubes and their application in gene delivery systems. *Nanotechnology* 2009;20:125101-125109.
125. Lee CC, MacKay JA, Frechet JM, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 2005;23:1517-1526.
126. Lewis JG, Lin KY, Kothavale A, Flanagan WM, Matteucci MD, DePrince RB, Mook RA, Jr., Hendren RW, Wagner RW. A serum-resistant cytofectin for cellular

delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *P Natl Acad Sci-USA* 1996;93:3176-3181.

127. Invitrogen. [17 Julho 2011]; Disponível em:

http://products.invitrogen.com/ivgn/en/US/adirect/invitrogen?cmd=catDisplayStyle&catKey=99601&filterDispName=Transfection%2BReagents&_bcs_=H4slAAAAAAAAAH2Pb0vEMAzGP03fODa6FXT3cu6YiCDiqe9LI9sK%2FUebbezbm4p3iIQEvKkefPL%0AWTPevkQ%2FLgpTwZrb4gRx1QrSP%2FqMGJjoWDNQbNtWabdqjH4CVylvSUwagcqSKIGjNHbhYtjKd1Y%0AXh2boQvBaCVRe5eqGa2hX1gjcvaW4wK553ecSs1rWjgcqN5Q24MxRb8YXCJKtMkJ7b54i9KIM6js%0AWLyCJDT8gx6%2BaX7zi67lNNbr5C787ydKctSRLPPousDEoOzlxPHx4%2BGZLjjqFlzce4kw%2BbgTEYIP%0AsNOLL%2Bafh52lSfmyT2zny%2FGFAQAA.

128. Promega. [17 Julho 2011]; Disponível em:

<http://www.promega.com/products/product-category-search-results/?q=&m1=categories&v1=Reporter+Assays+and+Transfection&f=Transfection+Reagents>.

129. Roche. [17 Julho 2011]; Disponível em: https://www.roche-applied-science.com/sis/transfection/index.jsp?id=tf_n_050000.

130. Sigma-aldrich. [17 Julho 2011]; Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/cloning-and-expression/transfection-reagents.html>.

131. Zelphati O, Szoka FC, Jr. Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids. *Pharm Res-Dordr* 1996;13:1367-1372.

132. DeLong RK, Akhtar U, Sallee M, Parker B, Barber S, Zhang J, Craig M, Garrad R, Hickey AJ, Engstrom E. Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold. *Biomaterials* 2009;30:6451-6459.

133. Vashist SK, Zheng D, Pastorin G, Al-Rubeaan K, Luong JHT, Sheu FS. Delivery of drugs and biomolecules using carbon nanotubes. *Carbon* 2011;49:4077-4097.

134. Narayan RJ, Boehm RD, Sumant AV. Medical applications of diamond particles & surfaces. *Mater Today* 2011;14:154-163.

135. Sokolova V, Neumann S, Kovtun A, Chernousova S, Heumann R, Epple M. An outer shell of positively charged poly(ethyleneimine) strongly increases the transfection efficiency of calcium phosphate/DNA nanoparticles. *J Mater Sci* 2010;45:4952-4957.

136. Chemicell. [17 Julho 2011]; Disponível em:

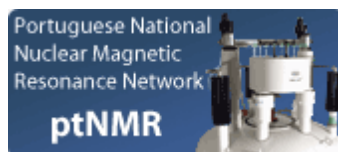
http://www.chemicell.com/products/magnetic_particles/magnetic_particle_separation.html.

137. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002;1:347-355.
138. Agrawal S, Kandimalla ER. Antisense therapeutics: Is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today* 2000;6:72-81.
139. Hughes MD, Hussain M, Nawaz Q, Sayyed P, Akhtar S. The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov Today* 2001;6:303-315.
140. Shi F, Hoekstra D. Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *J Control Release* 2004;97:189-209.
141. Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. The future of antisense therapy: Combination with anticancer treatments. *Oncogene* 2003;22:6579-6588.
142. Crooke ST. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004;55:61-95.
143. Isis pharmaceuticals. [17 Julho 2011]; Disponível em: <http://www.isip.com/Pipeline/index.htm>.
144. Agrawal S, Jiang Z, Zhao Q, Shaw D, Cai Q, Roskey A, Channavajjala L, Saxinger C, Zhang R. Mixed-backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: In vitro and in vivo studies. *P Natl Acad Sci-USA* 1997;94:2620-2625.
145. Buolamwini JK. Novel anticancer drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 1999;3:500-509.
146. Wu GY, Wu CH. Specific inhibition of hepatitis b viral gene expression in vitro by targeted antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1992;267:12436-12439.
147. Choi BM, Kwak HJ, Jun CD, Park SD, Kim KY, Kim HR, Chung HT. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factor-beta 1 oligodeoxynucleotides. *Immunol Cell Biol* 1996;74:144-150.
148. Goodarzi G, Gross SC, Tewari A, Watabe K. Antisense oligodeoxyribonucleotides inhibit the expression of the gene for Hepatitis B virus surface antigen. *J Gen Virol* 1990;71:3021-3025.
149. Gao WY, Hanes RN, Vazquez-Padua MA, Stein CA, Cohen JS, Cheng YC. Inhibition of Herpes simplex virus type 2 growth by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Antimicrob Agents Ch* 1990;34:808-812.
150. Monia BP, Johnston JF, Ecker DJ, Zounes MA, Lima WF, Freier SM. Selective inhibition of mutant Ha-Ras mRNA expression by antisense oligonucleotides. *J Biol Chem* 1992;267:19954-19962.
151. Shcharbin D, Pedziwiatr E, Chonco L, Bermejo-Martin JF, Ortega P, de la Mata FJ, Eritja R, Gomez R, Klajnert B, Bryszewska M, Munoz-Fernandez MA. Analysis of interaction between dendriplexes and bovine serum albumin. *Biomacromolecules* 2007;8:2059-2062.

152. Langdon SP, Macleod KG. Introduction to Cancer Cell Culture. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Medicine. Cancer cell culture: Methods and protocols* New Jersey: Humana Press, 2004. p. 1-17.
153. Freshney RI. Subculture and cell lines. In: Freshney RI, editor. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 199-216.
154. Masters JR. HeLa cells 50 years on: The good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2002;2:315-319.
155. Sima N, Wang S, Wang W, Kong D, Xu Q, Tian X, Luo A, Zhou J, Xu G, Meng L, Lu Y, Ma D. Antisense targeting human Papillomavirus type 16 E6 and E7 genes contributes to apoptosis and senescence in SiHa cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2007;106:299-304.
156. Langdon SP. Cell Culture Contamination: An Overview. In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Medicine. Cancer cell culture: Methods and protocols* New Jersey: Humana Press, 2004. New Jersey: Humana Press; 2004. p. 309-318.
157. Addgene. [17 Julho 2011]; Disponível em: <http://www.addgene.org/13031/>.
158. Arun KH, Kaul CL, Ramarao P. Green fluorescent proteins in receptor research: An emerging tool for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;51:1-23.
159. Gerdes HH, Kaether C. Green fluorescent protein: Applications in cell biology. *FEBS Lett* 1996;389:44-47.
160. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998;67:509-544.
161. Gerritsen VB. Proteinspot light: The greenest of us all. [17 Julho 2011]; Disponível em: http://web.expasy.org/spotlight/back_issues/011/.
162. Kim SH, Mok H, Jeong JH, Kim SW, Park TG. Comparative evaluation of target-specific GFP gene silencing efficiencies for antisense ODN, synthetic siRNA, and siRNA plasmid complexed with PEI-PEG-FOL conjugate. *Bioconjugate Chem* 2006;17:241-244.
163. Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C. Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1000-1004.
164. Helin V, Gottikh M, Mishal Z, Subra F, Malvy C, Lavignon M. Cell cycle-dependent distribution and specific inhibitory effect of vectorized antisense oligonucleotides in cell culture. *Biochem Pharmacol* 1999;58:95-107.

165. Toth J, Boszormenyi I, Majer ZS, Laczko I, Malvy C, Hollosi M, Bertrand JR. A two step model aimed at delivering antisense oligonucleotides in targeted cells. *Biochem Bioph Res Co* 2002;293:18-22.
166. Wingers M, Hooijdonk CAEM, Jongh GJ, Schalkwijk J, Erp PEJ. Flow cytometric and microscopic characterization of the uptake and distribution of phosphorothioate oligonucleotides in human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998;290:119-125.
167. Biomers. [17 Julho 2011]; Disponível em: http://www.biomers.net/en/index/Technical_Information/Modifications/Dyes.html.
168. Yoo H, Juliano RL. Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 2000;28:4225-4231.
169. Kang H, DeLong R, Fisher MH, Juliano RL. Tat-conjugated PAMAM dendrimers as delivery agents for antisense and siRNA oligonucleotides. *Pharm Res-Dordr* 2005;22:2099-2106.
170. Patil ML, Zhang M, Betigeri S, Taratula O, He H, Minko T. Surface-modified and internally cationic polyamidoamine dendrimers for efficient siRNA delivery. *Bioconjugate Chem* 2008;19:1396-1403.
171. Bielinska AU, Chen C, Johnson J, Baker JR, Jr. DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: Implications for transfection. *Bioconjugate Chem* 1999;10:843-850.
172. Fant K, Esbjorner EK, Lincoln P, Norden B. DNA condensation by PAMAM dendrimers: Self-assembly characteristics and effect on transcription. *Biochemistry-US* 2008;47:1732-1740.
173. Bielinska A, Kukowska-Latallo JF, Johnson J, Tomalia DA, Baker JR, Jr. Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 1996;24:2176-2182.
174. Zhou J, Wu J, Hafdi N, Behr JP, Erbacher P, Peng L. PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. *Chem Commun-Camb* 2006:2362-2364.
175. Maiti PK, Çagin T, Lin ST, Goddard WA. Effect of solvent and pH on the structure of PAMAM dendrimers. *Macromolecules* 2005;38:979-991.
176. Shcharbin D, Pedziwiatr E, Bryszewska M. How to study dendriplexes I: Characterization. *J Control Release* 2009;135:186-197.

177. Kono K, Akiyama H, Takahashi T, Takagishi T, Harada A. Transfection activity of polyamidoamine dendrimers having hydrophobic amino acid residues in the periphery. *Bioconjugate Chem* 2005;16:208-214.



REDE/1517/RMN/2005



Governo da República Portuguesa



União Europeia



Região Autónoma da Madeira

