

DM

**Sistema de Entrega Génica de pBMP-2
baseado em Carbon Dots/Polietilenimina
para Diferenciação Osteogénica de hMSCs**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bárbara Micaela Ponte Pedra

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2024

**Sistema de Entrega Génica de pBMP-2
baseado em Carbon Dots/Polietilenimina
para Diferenciação Osteogénica de hMSCs**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bárbara Micaela Ponte Pedra

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTAÇÃO

Rita Maria de Castro

COORIENTAÇÃO

Helena Maria Pires Gaspar Tomás



**Sistema de Entrega Génica de pBMP-2 baseado em Carbon
Dots/Polietilenimina para Diferenciação Osteogénica de
hMSCs**

Esta dissertação foi apresentada à Universidade da Madeira, para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Aplicada

Bárbara Micaela Ponte Pedra

Trabalho desenvolvido sob orientação de Dra. Rita Maria de Castro e co-orientação da Professora Dra. Helena Maria Pires Gaspar Tomás

Faculdade de Ciências Exatas e de Engenharia, Centro de Química da Madeira, Campus
Universitário da Penteada, 9000-390 Funchal, Portugal

Setembro 2024

Declaração

O plágio consiste na apresentação, como sendo suas/seus e mesmo que tenha havido tradução, de ideias, opiniões, frases/textos, resultados ou conclusões de outros. A prática de plágio constitui uma grave violação da ética acadêmica, além de poder levar à reprovação ou à retirada do grau, assim como a responsabilidade civil, criminal e disciplinar.

Assim, declaro por minha honra que a presente dissertação de mestrado é da minha exclusiva autoria, é original, e nela referenciei e citei todas as fontes utilizadas.

Setembro 2024

Barbara Pedra

Agradecimentos

Esta tese não seria possível sem a ajuda e o apoio de muitas pessoas, tanto na vida académica como pessoal. Assim, gostaria de demonstrar o meu mais sincero reconhecimento e gratidão a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a minha formação, quer a nível académico, quer a nível pessoal.

Agradeço à minha orientadora, Doutora Rita Castro, por todo o apoio, incentivo, dedicação e supervisão durante este ano. Uma profissional exemplar, sábia, prestativa e sempre disponível para ajudar. À minha co-orientadora, Professora Doutora Helena Tomás, pelo incentivo, interesse e apoio manifestados ao longo deste ano!

Agradeço à Doutora Mara Gonçalves e Doutora Dina Maciel por toda a amabilidade, incentivo, disponibilidade e ajuda. Ao estudante de doutoramento Ivo Martins pela ajuda e disponibilidade para trabalhar com os *carbon dots*.

Um especial agradecimento aos meus amigos. À Jéni Monroy por me ter ajudado a resolver alguns problemas enquanto estava a desesperar e por toda a paciência comigo nas horas menos boas. Ao João Carreira por estar sempre pronto para arranjar uma explicação para tudo, por ser o meu grande amigo nesta aventura que foi estes dois anos de mestrado, e ao Emanuel Costa por nos fazer rir com as suas histórias proporcionando momentos de descontração nos momentos menos bons. Sem dúvida que sem o incentivo, apoio e momentos de descontração com os amigos tudo isto teria sido mais difícil. Agradeço-vos imenso por nunca me deixarem baixar a cabeça e me incentivarem para seguir em frente.

Agradeço também às técnicas de laboratório Ana Paula Temtem e Ana Paula Vieira por toda a ajuda e assistência prestada, assim como os meus colegas de sala, Lydia, Duarte, Fátima e demais colegas.

Agradeço ao Centro de Química da Madeira (CQM) e à Universidade da Madeira (UMa), que proporcionaram os meios necessários para a elaboração desta dissertação. Ao Professor Doutor João Rodrigues por me ter recebido neste centro. Igualmente, gostaria de agradecer às instituições envolvidas: Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através de fundo base do CQM – UIDB/00674/2020 (DOI:10.54499/UIDB/00674/2020), do fundo programático UIDP/00674/2020 (DOI:10.54499/UIDP/00674/2020), e através da Agência Regional para o

Desenvolvimento da Investigação, Tecnologia e Inovação (ARDITI) através do projeto M1420-01-0145-FEDER-000005 – CQM+ (Madeira 14-20).

Agradeço à minha família, nomeadamente aos meus pais, por todo o amor, carinho e sacrifício para que eu pudesse atingir esta etapa da minha vida e me tornar a pessoa que sou hoje, e ao meu irmão, por todo o carinho e apoio.

Um agradecimento especial à minha tia Mercedes por ser a pessoa incrível, lutadora, amiga e estar sempre do meu lado em todas as minhas aventuras contando sempre com o seu apoio e ajuda incondicional.

Não poderia deixar de agradecer ao meu namorado, Álvaro, que me incentivou a alcançar esta etapa e esteve sempre presente com apoio, carinho e paciência ao longo deste percurso.

Um sincero muito obrigada, a todos os que contribuíram para a minha formação e para a pessoa que me tornei.

Resumo

A aplicação da técnica de manipulação génica a células estaminais, tornando possível o controle da diferenciação celular, tem aberto novos caminhos à medicina regenerativa. Neste contexto, uma vez que as células mesenquimais humanas (hMSCs) são difíceis de transfetar, é importante desenvolver estratégias capazes de facilitar esse processo. O objetivo principal desta dissertação foi, pois, desenvolver um sistema, à base de pontos de carbono (*carbon dots*, CDs) e polietilenimina (PEI) para a entrega do gene da proteína morfogénica do osso-2 (BMP-2) em hMSCs, com a finalidade de induzir a sua diferenciação osteogénica. Este sistema apresenta a vantagem de associar os CDs (nanopartículas fluorescentes que apresentam pequeno tamanho, biocompatibilidade e facilidade de funcionalização) ao PEI (um polímero catiónico amplamente utilizado como sistema de entrega de genes devido à sua capacidade de compactar o DNA e facilitar a sua entrada nas células), tirando partido das qualidades dos dois componentes. Os nanoveículos CDs/PEI formados a diferentes proporções mássicas (1CDs/1PEI, 1CDs/2PEI e 1CDs/4PEI) mostraram capacidade de complexar e neutralizar o DNA plasmídico (pDNA). Os nanoplexos assim formados mostraram, ainda, capacidade de transfetar o pDNA codificante da proteína verde fluorescente e da luciferase (pEGFP_{Luc}), a diferentes razões N/P, tanto em células HEK293T, como nas hMSCs. Adicionalmente, estes nanoplexos foram aplicados ao transporte do gene da BMP-2 em hMSCs e, nas razões N/P10 e N/P15, foi estudada a citotoxicidade e diferenciação osteogénica. Estes estudos mostraram que se obteve transfeção do pBMP-2 com os nanoplexos CDs/PEI em estudo onde, houve um aumento da atividade metabólica ao longo do tempo, propondo a ocorrência da diferenciação celular. Aparentemente, ocorreu uma expressão inicial da BMP-2, suficiente para aumentar a atividade metabólica celular e expressar a ALP no período inicial da diferenciação (7 dias), não sendo claramente evidente, a formação de depósitos de cálcio/fosfato, mesmo após os 21 dias.

Palavras-chave: Manipulação génica, Células estaminais mesenquimais humanas (hMSCs), Pontos de carbono (CDs), polietilenimina (PEI), BMP-2 (proteína morfogenética óssea), diferenciação osteogénica.

Abstract

The application of gene manipulation techniques to stem cells, making it possible to control cell differentiation, has opened up new avenues for regenerative medicine. In this context, since human mesenchymal stem cells (hMSCs) are difficult to transfect, it is important to develop strategies capable of facilitating this process. The main aim of this dissertation was therefore to develop a system based on carbon dots (CDs) and polyethylenimine (PEI) for the delivery of the bone morphogenic protein-2 (BMP2) gene into hMSCs, with the aim of inducing their osteogenic differentiation. This system has the advantage of combining CDs (fluorescent nanoparticles that are small in size, biocompatible and easy to functionalize) with PEI (a cationic polymer widely used as a gene delivery system due to its ability to compact DNA and facilitate its entry into cells), taking advantage of the qualities of both components. The CDs/PEI nanovehicles formed at different mass ratios (1CDs/1PEI, 1CDs/2PEI and 1CDs/4PEI) showed the ability to complex and neutralize plasmid DNA (pDNA). The nanoplexes thus formed also showed the ability to transfect the pDNA coding for green fluorescent protein and luciferase (pEGFP/Luc), at different N/P ratios, in both HEK293T cells and hMSCs. In addition, these nanoplexes were applied to the transport of the BMP-2 gene in hMSCs and, at N/P10 and N/P15 ratios, cytotoxicity and osteogenic differentiation were studied. These studies showed that pBMP2 was transfected with the CDs/PEI nanoplexes under study, where there was an increase in metabolic activity over time, suggesting that cell differentiation was occurring. Apparently, there was an initial expression of BMP-2, sufficient to increase cellular metabolic activity and expressing ALP in the initial period of differentiation (7 days), and the formation of calcium/phosphate deposits was not clearly evident, even after 21 days.

Keywords: Gene manipulation, human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs), Carbon dots (CDs), polyethylenimine (PEI), BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2), osteogenic differentiation.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xv
Capítulo I - Introdução	1
1. Células estaminais.....	2
1.1. Células estaminais mesenquimais	3
1.1.1. Diferenciação osteogénica.....	5
1.1.2. Aplicações terapêuticas	9
2. Entrega de genes.....	12
2.1. Sistemas de entrega de genes	13
2.1.1. Sistemas de entrega de genes não virais.....	14
2.1.2. Barreiras biológicas à entrega de genes	15
3. Polímeros de polietilenimina (PEI).....	18
3.1. Aplicações do PEI	21
4. Pontos de carbono (Carbon Dots).....	23
4.1. Síntese de CDs.....	25
4.1.1. Métodos.....	25
4.1.2. Precursores	28
4.2. Propriedades dos CDs	29
4.3. Caraterização dos CDs.....	31
4.4. Aplicações dos CDs.....	33
5. Nano híbridos à base de pontos de carbono e PEI	37
6. Objetivos gerais da Tese.....	39
CAPÍTULO II – Secção experimental	41
1. Amplificação, extração e quantificação de pDNA Síntese de CDs e preparação de nanoplexos Estudos de caraterização e compactação do pDNA	42
1.1. Materiais e reagentes	42
1.2. Amplificação, extração e quantificação de pDNA.....	43
1.3. Síntese de CDs.....	43
1.4. Preparação dos nanoplexos CDs/PEI	44
1.5. Caraterização	45

1.5.1.	Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear (RMN)	45
1.5.2.	Espectroscopia de radiação Infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)	45
1.5.3.	Espalhamento dinâmico da luz/Espalhamento eletroforético da luz (DLS/ELS)	45
1.5.4.	Espectroscopia UV-vis e Fluorescência.....	45
1.6.	Estudo da compactação do pDNA	46
1.6.1.	DLS/ELS	47
1.6.2.	Eletroforese em gel de agarose	47
1.6.3.	Ensaio do PicoGreen®	47
2.	Estudos in vitro de viabilidade celular e de entrega da proteína verde fluorescente (EGFP), em células HEK293T e hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI	48
2.1.	Cultura de Células HEK293T e hMSCs	48
2.2.	Plasmídeo EGFP e estudos de transfeção	49
2.2.1.	Estudos de viabilidade celular	51
2.3.	Células, materiais e reagentes	52
2.4.	Cultura celular	52
2.5.	Estudo da atividade metabólica e transfeção em HEK 293T e hMSCs – Ensaio da atividade metabólica através da resazurina e expressão de EGFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.....	53
2.6.	Estudo da expressão do gene da luciferase em HEK 293T e hMSCs.....	55
3.	Estudos in vitro da viabilidade celular e de entrega de gene codificante da BMP-2, em hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI para indução da diferenciação osteogénica.....	57
3.1.	Plasmídeo da BMP-2	57
3.2.	Materiais e reagentes	58
3.3.	Estudo da diferenciação osteogénica	58
3.4.	Avaliação da atividade metabólica	59
3.5.	Avaliação histoquímica – Ensaio qualitativos.....	59
3.6.	Avaliação bioquímica – Ensaio quantitativos	61
CAPÍTULO III – Resultados e Discussão		63
1.	Amplificação, extração e quantificação de pDNA Síntese de CDs e preparação de nanoplexos Estudos de caracterização e compactação do pDNA	64
1.1.	Caraterização	64
1.1.1.	RMN (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear).....	64

1.1.2.	FTIR (Espectroscopia de radiação Infravermelha com transformada de Fourier)	66
1.1.3.	DLS/ELS (Espalhamento dinâmico da luz/Espalhamento eletroforético da luz)	67
1.1.4.	Espectroscopia UV-Vis	70
1.2.	Estudo da compactação com o pDNA.....	73
1.2.1.	DLS/ELS	73
1.2.2.	Eletroforese em gel de agarose	75
1.2.3.	Ensaio do PicoGreen®	76
2.	Estudos in vitro de viabilidade celular e de entrega da proteína verde fluorescente (EGFP), em células HEK293T e hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI	78
2.1.	Estudo da atividade metabólica e transfeção em HEK 293T – Ensaio da atividade metabólica através da resazurina e expressão de EGFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.....	78
2.2.	Estudo da expressão do gene da luciferase em HEK 293T	81
2.3.	Estudo da atividade metabólica e transfeção em hMSCs – Ensaio da atividade metabólica através da resazurina e expressão de EGFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.....	82
2.4.	Estudo da expressão do gene da luciferase em hMSCs.....	85
3.	Estudos in vitro da viabilidade celular e de entrega de gene codificante da BMP-2, em hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI para indução da diferenciação osteogénica.....	87
3.1.	Estudo da diferenciação osteogénica	87
3.2.	Avaliação da atividade metabólica	87
3.3.	Avaliação histoquímica – Ensaio qualitativos.....	88
3.4.	Avaliação bioquímica – Ensaio quantitativos	91
	Conclusão e perspectivas futuras	93
	Referências bibliográficas	95
	ANEXOS	118

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação das células estaminais.	2
Figura 2. Microambiente ósseo. Renovação óssea.....	6
Figura 3. Diferenciação osteogénica das MSCs.	7
Figura 4. Propriedades biológicas que apoiam o uso clínico das MSCs.	10
Figura 5. Classificação da terapia génica.	12
Figura 6. Visão geral das barreiras extracelulares e intracelulares para terapia génica não viral após administração sistémica.	16
Figura 7. Estrutura química do polímero de polietilenimina (PEI): (a)linear; (b)ramificada. (Adaptado: Li <i>et al.</i>	18
Figura 8. Hipótese da esponja de protões.	20
Figura 9. Ilustração esquemática das modificações possíveis do PEI quando incorporado em nanossistemas.	21
Figura 10. Classificação dos CDs e suas principais abordagens de síntese.....	24
Figura 11. Visão geral das interações moleculares usadas para exploração de pontos de carbono e as suas aplicações.	25
Figura 12. Métodos de síntese de CDs.	25
Figura 13. Representação da estrutura química do ácido ascórbico.....	29
Figura 14. Propriedades dos CDs.	30
Figura 15. Aplicações biológicas dos CDs.	34
Figura 16. Resumo esquemático da síntese dos CDs.....	44
Figura 17. Plasmídeo pEGFP _{Luc}	49
Figura 18. Representação esquemática do princípio do ensaio da luciferase.....	50
Figura 19. Representação esquemática do princípio do ensaio do BCA.	50
Figura 20. Representação esquemática da conversão da resazurina em resorufina.	51
Figura 21. Diferenciação de MSCs em osteoblastos impulsionada por BMP-2, juntamente com os outros fatores listados. (Adaptado: Halloran <i>et al.</i> ³⁸).....	57
Figura 22. Espectro de RMN ¹ H do ácido ascórbico utilizando o DMSO-d ₆ como solvente.....	64
Figura 23. Espectro de RMN ¹³ C do ácido ascórbico utilizando o DMSO-d ₆ como solvente.....	65
Figura 24. Espectro de RMN ¹ H dos CDs utilizando o DMSO-d ₆ como solvente.....	65
Figura 25. Espectro de RMN ¹³ C dos CDs utilizando o DMSO-d ₆ como solvente.....	66
Figura 26. Espectro do FTIR-ATR relativo ao ácido ascórbico e aos Carbon dots.....	67
Figura 27. Potencial zeta dos nanoplexos preparados nas diferentes proporções massa.	70
Figura 28. Espectro de absorção UV-Vis dos CDs e do seu precursor, concentração final=50µg/mL.....	71
Figura 29. Espectro de absorção UV-Vis dos CDs, PEI e dos vários mix CDs/PEI em estudo, com uma concentração final de 200µg/mL.	71

Figura 30. Espectro de emissão de fluorescência dos CDs (concentração final=50µg/mL).	72
Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência das diferentes proporções com a excitação a 340nm.	73
Figura 32. Diâmetro hidrodinâmico médio dos nanoplexos com o pDNA, assim como dos CDs e PEI individualmente determinados por DLS.....	74
Figura 33. Potencial zeta dos nanoplexos preparados nas diferentes proporções massa com pDNA.	75
Figura 34. Eletroforese em gel de agarose 1% referente às diferentes proporções do nanoplexo CDs/PEI e diferentes razões N/P	76
Figura 35. Ensaio Picogreen® referente às diferentes proporções massa entre CDs e PEI, realizado em triplicado (n=3).....	77
Figura 36. Percentagem de atividade metabólica das células HEK293T expostas 48h a diferentes complexos CDs/PEI/pDNA e PEI/pDNA.	79
Figura 37. Imagens do microscópio ótico de HEK293T vivas após 48h expostas aos nanoplexos CDs/PEI (mix1, mix2 e mix4), a diferentes razões N/P.....	79
Figura 38. Resultados de citometria de fluxo em intensidade de fluorescência da EGFP (u.a.) das HEK293T expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI (mix1, 2 e 4) e PEI, a diferentes razões N/P.....	81
Figura 39. Atividade enzimática da luciferase (RLU/mg proteína) nas células HEK293T expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI e PEI, nas diferentes razões N/P.	82
Figura 40. Percentagem de atividade metabólica das células hMSCs expostas 48h a diferentes complexos CDs/PEI/pDNA e PEI/pDNA.	83
Figura 41. Imagens do microscópio ótico de hMSCs vivas após 48h expostas aos nanoplexos CDs/PEI (mix1, mix2 e mix4), a diferentes razões N/P.....	84
Figura 42. Resultados de citometria de fluxo em intensidade de fluorescência da EGFP (u.a.) das hMSCs expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos em estudo e razões N/P.	85
Figura 43. Atividade enzimática da luciferase (RLU/mg proteína) das hMSCs expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI e PEI, nas diferentes razões N/P.	86
Figura 44. Percentagem de atividade metabólica das hMSCs expostas durante 48h aos polioplexos CDs/PEI/pDNA.	88
Figura 45. Coloração para detecção de atividade de ALP na matriz extracelular, nos dias 7, 14 e 21.....	90
Figura 46. Coloração de alizarina vermelho para detecção de depósitos de cálcio na matriz extracelular, nos dias 7, 14 e 21.....	90
Figura 47. Coloração de <i>von Kossa</i> para detecção de depósitos de fosfato na matriz extracelular, nos dias 7, 14 e 21.....	90

Figura 48. Atividade de ALP (nmol/min/mg proteína) das hMSCs, expostas 48h a diferentes proporções de nanoplexos CDs/PEI..... 91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Métodos adicionais para a preparação de CDs.....	27
Tabela 2. Preparação de complexos de pDNA com os diferentes nanoplexos CDs/PEI, a razões N/P variáveis, considerando 1µg de pDNA.....	46
Tabela 3. Preparação de complexos de pDNA com os diferentes nanoplexos CDs/PEI, a razões N/P variáveis, considerando 2µg de pDNA por condição.....	54
Tabela 4. Preparação de complexos de pDNA com os diferentes nanoplexos CDs/PEI, a razões N/P variáveis, considerando 1µg de pDNA, estudadas para a diferenciação das hMSCs.	59
Tabela 5. Valores médios de intensidade ± desvio padrão e Pdl médio, dos nanoplexos CDs/PEI, CDs e PEI determinados por DLS.....	68

Lista de Abreviaturas

	α -MEM	<i>α-modified Minimum Essential Eagle's Medium /</i> Meio Eagle com modificações alfa
	β -GP	<i>β-glycerophosphates / β-glicerofosfato</i>
	AA	Antibiótico-Antimicótico
A	AD-MSCs	<i>Adipose derivated mesenchymal stem cells/</i> células estaminais mesenquimais derivadas do tecido adiposo
	ALP	<i>Alkaline phosphatase /</i> Fosfatase alcalina
	ATP	<i>Adenosine triphosphate/</i> Adenosina trifosfato
	ATR	Refletância total atenuada
	BCA	<i>Bicinchoninic acid /</i> Ácido bicinconínico
	BHE	Barreira hematoencefálica
	BIE	<i>Intestinal epithelial barrier /</i> Barreira epitelial intestinal
	BLCs	<i>Bone lining cells /</i> células do revestimento ósseo
B	BMP	<i>Bone Morphogenetic protein /</i> Proteína morfogénica óssea
	BMPRs	<i>Bone Morphogenetic protein receptors /</i> Recetores das proteínas morfogénicas ósseas
	BMSCs	<i>Bone marrow mesenchymal steml cells /</i> Células estaminais mesenquimais da medula óssea
	BSA	<i>Bovine serum albumine/</i> Albumina bovina sérica
	CDs	<i>Carbon Dots /</i> Pontos de carbono *
	CMV	<i>Cytomegalovirus /</i> Citomegalovírus
C	CNDs	<i>Carbon nano-dots /</i> Nanopontos de carbono
	COS-7	Linha de células renais de macaco
	Col1 α 1	Colagénio tipo 1 alfa 1
	CQDs	<i>Carbon quantum dots /</i> Pontos quânticos de carbono
D	DEXA	<i>Dexametasone/</i> Dexametasona

	DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> / Difusão dinâmica da luz
	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> / Meio Eagle com modificações Dulbecco
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico *
	DPSCs	<i>Dental pulp stem cells</i> / células estaminais da polpa dentária
	EDA	Etilenodiamina
E	EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> / Ácido etilenodiamino tetraacético
	EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> / Proteína verde fluorescente otimizada
	FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> / Soro bovino fetal
F	FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> / Espetroscopia do Infravermelho com transformada de Fourier
	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> / Proteína verde fluorescente
G	GQDs	<i>Graphene quantum dots</i> / Pontos quânticos de grafeno
	Hep G2	Linha de células de carcinoma hepatocelular humano
H	hMSCs	<i>Human mesenchymal stem cells</i> / Células mesenquimais estaminais humanas
	HSCs	<i>Hematopoietic Stem Cells</i> /Células estaminais hematopoiéticas
	IBSP	<i>Bone sialoprotein gene</i> / gene da sialoproteína óssea
I	ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i> / Sociedade internacional para a terapia celular
M	M - CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i> / Fator estimulador de colônia de macrófagos

	MPS	<i>Mononuclear phagocyte system</i> / sistema fagocitário mononuclear
	MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> / Células estaminais mesenquimais
N	N/P	Razão entre o número de moles de grupos amina e número de moles de grupos fosfato
O	Oc	Osteocalcina
	OPN	Osteopontina
	Osx	Osterix
	PAMAM	<i>Poly(amidoamine)</i> / Poli(amidoamina)
	PB-MSCs	<i>Mesenchymal stem cells derivated from peripheral blood</i> / Células estaminais mesenquimais derivadas de sangue periférico
	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> / Solução salina de tampão fosfato
	PdI	<i>Índice de polidispersão</i>
P	pDNA	<i>Plasmid Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico plasmídico
	PEG	<i>Poly(ethyleneglycol)</i> / polietilenoglicol
	pEGFPLuc	DNA plasmídico que codifica os genes repórteres proteína verde fluorescente otimizada e a luciferase
	PEI	<i>Polyethyleneimine</i> / polietileneimina
	PL	<i>Photoluminescence</i> / Fotoluminescência
	PLL	<i>Poly(L-lysine)</i> / poli(L-lisina)
Q	QY	<i>Quantum Yield</i> / Rendimento quântico
	rBMSCs	<i>Rat bone marrow mesenchymal stem cells</i> / Células estaminais mesenquimais da medula óssea do rato
R	RLU	<i>Relative Light Units</i> / Unidades de Luz Relativa
	RMN	Ressonância Magnética Nuclear
	RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido Ribonucleico

	Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i> / Factor de transcrição relacionado ao runt 2
S	SWCNTs	<i>Single wall carbon nanotubes</i> / Nanotubos de carbono de parede simples
	TAE	Tris-acetato EDTA
T	TE	Tris EDTA
	TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> / Microscópio eletrônico de transmissão
	UC-MSCs	<i>Umbilical cord derivated mesenchymal stem cells</i> / células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical
U	UV	Ultravioleta
	UV-Vis	Ultravioleta - Visível

*Nesta tese, optou-se por usar a terminologia em inglês por ser mais usada no meio científico.

Capítulo I - Introdução

1. Células estaminais

As células estaminais são células não especializadas, capazes de se diferenciarem em qualquer célula de um organismo (**Figura 1**) e com capacidade de autorrenovação.¹ Estas podem ser classificadas como embrionárias ou adultas consoante a sua origem,² e ainda de acordo com o seu potencial de especialização, classificando-se em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes.¹

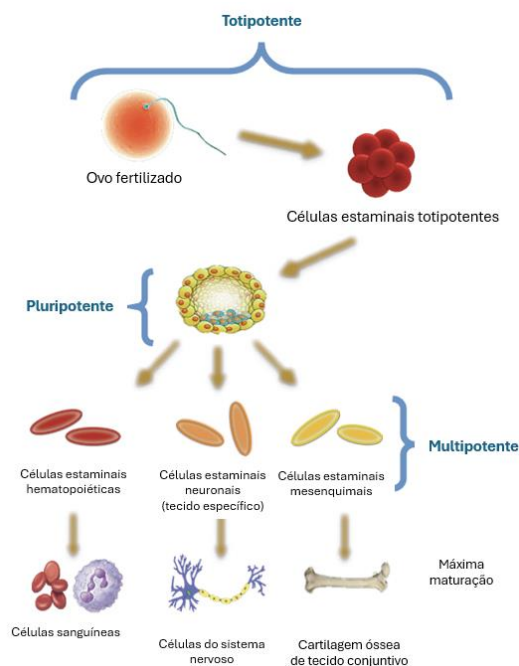


Figura 1. Classificação das células estaminais. (Adaptado: Rajabzadeh *et al.*³)

As células estaminais totipotentes são capazes de se dividir e se diferenciar em células de qualquer parte do organismo. Um exemplo de célula totipotente é o zigoto, resultante da fertilização de um espermatozoide com um óvulo.^{1,4} A totipotência corresponde ao maior potencial de diferenciação, sendo permitido às células formarem estruturas embrionárias e extraembrionárias. Essas células podem desenvolver-se, posteriormente, em qualquer uma das três camadas germinativas ou formar uma placenta. Após 4 dias, a massa celular interna do blastocisto é composta por células pluripotentes.¹ Estas dão origem a células de todas as camadas germinativas, mas não de estruturas extraembrionárias, como a placenta.⁵ Uma das características únicas destas células embrionárias é a sua capacidade de proliferar *in vitro* em culturas a longo prazo,

mantendo a sua natureza pluripotente, podendo ser preservadas através de técnicas de congelamento rápido para evitar uma diferenciação precoce.^{6,7} No entanto, a utilização destas células levanta algumas questões éticas pelo facto de serem isoladas a partir de embriões, razão pela qual a investigação passou a centrar-se nas células estaminais adultas.^{1,2}

As células estaminais adultas, também designadas de multipotentes, possuem uma capacidade de diferenciação limitada quando comparada com as pluripotentes. São células indiferenciadas com capacidade limitada de autorrenovação e diferenciação geralmente restrita aos tipos de células do tecido da sua origem.^{4,6} Podem ser obtidas a partir de tecidos mesodérmicos, como a medula óssea, o músculo, o tecido adiposo, a membrana sinovial e o perióstio.⁷ Um exemplo é uma célula estaminal hematopoiética, a qual se pode transformar em vários tipos de células sanguíneas.¹

As células estaminais unipotentes são também células estaminais adultas, embora caracterizadas por uma capacidade de diferenciação mais limitada, ou seja, são capazes de formar apenas um tipo especializado de células.⁵ Podem, pois, ser igualmente aplicadas na medicina regenerativa.¹ Um exemplo deste tipo de células são as células estaminais musculares adultas.⁴

Alguns estudos demonstraram que células estaminais adultas, como as células hematopoiéticas (HSCs) e as células estaminais mesenquimais (MSCs), libertam muitos fatores moleculares com características anti-apoptóticas, imunorreguladoras, angiogénicas e quimioatrativas que estimulam a regeneração, sendo por isso as mais utilizadas.^{2,8}

1.1. Células estaminais mesenquimais

As células estaminais mesenquimais (MSCs) foram inicialmente identificadas na medula óssea na década de 1960 por Friedenstein e posteriormente caracterizadas e renomeadas por Arnold Caplan.⁹ Friedenstein *et al.*, em 1960, demonstraram a formação ectópica de tecido ósseo por transplante de células da medula óssea e, em 1970, isolaram células aderentes provenientes de medula óssea em cultura, as chamadas, “células estaminais mesenquimais” (MSCs).¹⁰ Em 1991, Caplan *et al.* isolaram, caracterizaram e renomearam as MSCs.¹¹

O primeiro ensaio clínico com MSCs foi realizado em 1995, o qual mostrou ser seguro o transplante de MSCs autólogas. Anos mais tarde, estas células foram então aplicadas pela primeira vez em associação com biomateriais para reconstrução de defeitos ósseos.^{12,13} Em 1999, Pittenger *et al.* mostraram efetivamente a capacidade de diferenciação das MSCs nas linhagens osteogénica, condrogénica e adipogénica e até hoje, diversos ensaios continuam a validar a capacidade de diferenciação destas células.¹⁴

As MSCs são células estaminais adultas, multipotentes (não hematopoiéticas) e com elevada capacidade de proliferação e diferenciação celular. Estas células são, ainda, capazes de se multiplicar, mantendo o seu estado indiferenciado, apresentando baixa imunogenicidade e funções de reparação tecidual. Elas também levantam menos questões éticas em comparação com as células estaminais embrionárias.^{2,15-17} Estas células podem ser isoladas da medula óssea (BMSCs)¹⁸, cordão umbilical (UCMSCs)¹⁹, sangue periférico (PB-MSCs)²⁰, placenta fetal²¹, dentes (células estaminais da polpa dentária, DPSCs)²² e tecido adiposo (AD-MSCs)¹⁸, podendo se diferenciar em células ósseas²³, cartilaginosas²⁴ e adiposas.²⁵

Em 2006, a “International Society for Cellular Therapy” (ISCT) descreveu características mínimas estabelecidas e claramente definidas para as células estaminais mesenquimais, nomeadamente a:

- (1) adesão ao substrato plástico sob condições padrão de cultura celular;
- (2) expressão de marcadores de superfície específicos (CD105, CD73, CD90 e Sca-1);
- (3) ausência dos marcadores CD45, CD34, CD11b, CD14;
- (4) capacidade de diferenciação *in vitro* em três linhagens, a saber: osteoblastos (confirmado pela coloração de nódulos mineralizados), condrócitos (com produção de colagénio tipo II ou glicosaminoglicanos) e adipócitos (verificado pela acumulação de gotículas lipídicas).^{26,27}

No entanto, estes critérios não são válidos na maioria das situações uma vez que estas células apresentam diversas variações dependendo das condições de cultura, do tecido e espécie de origem, entre outros.²⁸ Vários estudos relatam que as MSCs de diferentes tecidos podem expressar diferentes tipos de marcadores específicos. No caso das células estaminais derivadas do tecido adiposo, expressam CD10, CD13 e CD49d, enquanto as células MSCs derivadas da medula óssea e de tecido muscular expressam

mais CD73, CD90, CD105 e CD44. Além destes marcadores de superfície específicos, as MSCs também expressam outras moléculas de superfície funcionais como recetores de quimiocinas, recetores de citocinas, moléculas de adesão e moléculas co-inibidoras.^{27,29}

As MSCs derivadas da medula óssea (BMSCs) têm a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens, incluindo a osteogénica, condrogénica, miogénica e adipogénica, sendo relativamente fáceis de isolar e com uma capacidade de expansão significativa.³⁰ Estas podem ser isoladas por vários métodos, sendo o mais frequente por centrifugação de gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares. As células mononucleares isoladas são depois cultivadas em meio contendo soro fetal, daí se obter as MSCs que aderem ao plástico.³¹ Algumas células da linhagem hematopoiética também podem aderir, mas, com o tempo, devido às várias trocas de meio de cultura, são removidas. Desta forma, a heterogeneidade da cultura diminui progressivamente e são obtidas MSCs que se distinguem pela sua forma semelhante aos fibroblastos, ou seja, fusiforme.³¹⁻³³ Estas células também têm capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo o seu potencial de crescimento e pluripotencialidade, com um tempo de duplicação que depende do doador do qual as células foram obtidas e da densidade de cultura inicial, sendo este último um parâmetro crítico para assegurar uma boa taxa de expansão e a manutenção do potencial de diferenciação das MSCs.^{31,34}

1.1.1. Diferenciação osteogénica

A diferenciação osteogénica é um processo biológico crucial para a manutenção da remodelação óssea, sendo a glicólise aeróbica a sua principal fonte de energia.³⁵

A remodelação óssea é um processo dinâmico de formação-reabsorção óssea, pelo qual o osso antigo é substituído por novo, resultando na renovação do esqueleto aproximadamente a cada 10 anos.³⁶ Neste processo, é crucial a interação entre células do tecido ósseo nomeadamente os osteoblastos, responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea e osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea.³⁷ O osso é remodelado pela reabsorção do osso antigo pelos osteoclastos, e pela formação e mineralização de novo osso pelos osteoblastos que são recrutados para o local (**Figura 2**).³⁸ A osteogénese anormal compromete a homeostase óssea, induzindo um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção, levando a distúrbios, como osteoporose e osteoartrite.³⁵

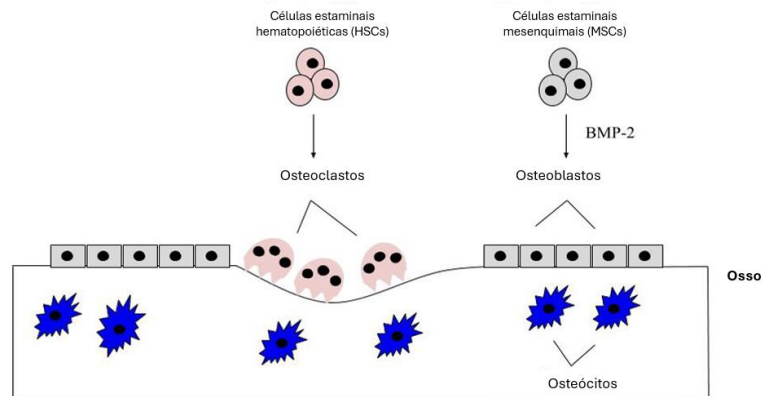


Figura 2. Microambiente ósseo. Renovação óssea. (Adaptado: Halloran *et al.*³⁸)

Quando há necessidade de formar novo tecido ósseo, as MSCs podem diferenciar-se em osteoblastos, os quais ficam depois incorporados no tecido e se transformam em osteócitos.³⁹ Este processo é controlado por várias moléculas sinalizadoras.⁴⁰ A principal responsável por esta diferenciação é a BMP-2, uma proteína que é produzida durante a reabsorção óssea e expressa numa variedade de células, sendo capaz de funcionar e ativar eficazmente muitas vias de sinalização.^{38,41,42} Uma das vias de sinalização é a angiogénese, pois os compostos com atividade anti-angiogénica bloqueiam a formação óssea ectópica induzida por BMP-2.^{43,44} A proteína BMP-2, liga-se a determinados recetores (BMPRs – recetores das proteínas morfogénicas ósseas) nas células alvo e ativam vias de sinalização específicas com a finalidade de ativar determinados genes osteogénicos, como o *Runt-Related Transcription Factor 2* (Runx-2) e o *osterix* (Osx). Esta proteína mostra uma atividade osteogénica elevada devido à presença de vários mediadores na formação da cartilagem e do osso.^{38,45,46}

O papel da BMP-2 na osteogénese foi demonstrado por vários investigadores. Em 1990, Wang *et al.*⁴⁷ demonstraram que a BMP-2 tem um papel importante na cicatrização de defeitos ósseos quando combinada com um transportador. Em 2010, Huang *et al.*⁴⁸ provaram que um curto período de expressão de BMP-2 é suficiente para induzir a regeneração óssea. Estas evidências sugerem a hipótese de que a BMP-2 é um dos promotores mais ativos para a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos *in vitro*, além de poder induzir a formação óssea *in vivo*.^{44,49}

O processo de osteogênese é compreendido por várias fases com expressão de diferentes marcadores específicos de cada uma delas. Nos estágios iniciais da osteogênese, as MSCs proliferam ativamente mas, ao longo do tempo, a sua velocidade de proliferação diminui (**Figura 3**) e iniciam a expressão de marcadores osteogênicos precoces como a fosfatase alcalina (ALP) segregada pelos osteoblastos (fase de maturação da matriz), e, posteriormente, marcadores osteogênicos tardios, como a osteocalcina (OCN) (fase de mineralização), provocando uma acumulação de cálcio.⁵⁰ Tanto a atividade enzimática da ALP como o teor de cálcio podem ser quantificados por ensaios colorimétricos.^{51,52} Ao nível molecular, a osteogênese é controlada por interações entre várias hormonas e fatores de transcrição como o Runx-2. O fator de transcrição Runx-2 inicializa a expressão de genes específicos do osso, por exemplo, os genes do *osterix* (*Osx*), do colagénio tipo 1 alfa-1 (*Col1α1*), da osteocalcina (OCN) e da sialoproteína óssea (IBSP), através da ligação aos promotores destes genes.⁵⁰ Runx-2, ALP, *Col1α1* são marcadores precoces da diferenciação osteoblástica, enquanto a OC e a OPN são expressas posteriormente no processo de diferenciação. No final da fase de formação óssea, as células podem tornar-se em células do revestimento ósseo (*bone lining cells*, BLCs), osteócitos ou entrar no processo de apoptose.⁵³

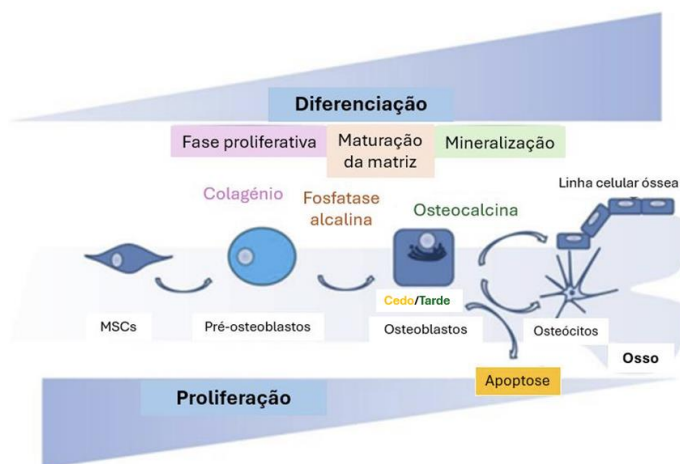


Figura 3. Diferenciação osteogénica das MSCs. (Adaptado: Infante *et al.*⁵³)

O processo de diferenciação das MSCs é, pois, controlado por proteínas e biomoléculas reguladoras específicas, diferenciando-se de forma aleatória e não

direcional, sem a intervenção de estimuladores ou fatores físico/químicos específicos. A sua rápida proliferação e a diferenciação descontrolada podem limitar grandemente a sua aplicação em certos casos clínicos, pelo que há a grande necessidade de regular a diferenciação nas células alvo e monitorizar a migração, distribuição, sobrevivência, diferenciação e outros comportamentos das MSCs *in vivo*, para poderem ser aplicadas em engenharia de tecidos e terapia celular.^{17,44}

Em laboratório, com recurso à cultura *in vitro* de células em monocamada, é necessário um período mínimo de 3 semanas de tratamento contínuo de uma monocamada confluenta de células com meio de cultura suplementado com Dexametasona (DEXA) em combinação com β -glicerofosfato e ácido ascórbico para induzir o fenótipo osteogénico de osteoblastos.⁴⁵

A DEXA é um glicocorticoide sintético que, dependendo da dosagem, promove efeitos distintos. Quando utilizada em altas dosagens, promove a diferenciação osteogénica, condrogénica e adipogénica das MSCs, enquanto baixas dosagens são utilizadas para promover a proliferação das MSCs.⁵⁴ A DEXA induz a transcrição de genes específicos do osso, como o da sialoproteína óssea (IBSP), e melhora a expressão das integrinas que promovem a diferenciação osteoblástica das MSCs.^{45,50} Esta molécula é capaz de levar à diferenciação osteogénica, regulando positivamente o fator de transcrição do Runx-2, necessários para o processo de osteogénese, sendo responsável pela ativação de genes de diferenciação de osteoblastos.^{50,55}

O impacto da DEXA sobre as MSCs não só parece estar relacionado com a sua concentração, mas também com a duração do tratamento e estágio de diferenciação osteoblástica. Como referido num estudo feito numa linhagem semelhante às MSCs, por Sordi *et al.*⁵⁶, doses baixas de DEXA (0,1 μ M) favoreceram a proliferação e a angiogénese *in vitro*, oferecendo proteção contra a apoptose.

O ácido ascórbico (vitamina C) tem sido amplamente utilizado como suplemento no meio de cultura para crescimento e diferenciação celular, sendo importante durante todos os estágios de diferenciação osteogénica.⁵⁷ Este serve de cofator para a hidroxilação da prolina envolvida na síntese do colagénio.⁵⁵ Thaler *et al.*⁵⁸ demonstraram a importância do ácido ascórbico e as suas funções epigenéticas que precedem à deposição e maturação do colagénio e que promovem a diferenciação. Bhandi *et al.*⁵⁹ estudou a utilização do ácido ascórbico para a diferenciação adipogénica, osteogénica e

condrogénica. Uma das conclusões retiradas deste trabalho foi o facto do ácido ascórbico promover o aumento na secreção da maioria dos fatores envolvidos no desenvolvimento e crescimento do tecido ósseo e, desta forma, aumentar o potencial de diferenciação osteogénico.

O β -glicerofosfato, que é enzimaticamente hidrolisado pela fosfatase alcalina, fornece uma fonte de fosfato orgânico para mineralização da matriz extracelular *in vitro*.⁵⁵ Em 1992, Chung *et al.*⁶⁰ demonstraram que o cultivo de células semelhantes a osteoblastos com β -glicerofosfato promoveu a formação de minerais, a produção de lactato, o aumento da atividade de ALP, bem como a síntese de proteínas e fosfolípidos, indicando diferenciação osteogénica melhorada.

Ao se diferenciarem em osteoblastos, as MSCs passam de um formato fibroblástico para a forma de cubo, produzem matriz composta principalmente por colagénio tipo I, e num estágio posterior, formam agregados ou nódulos que podem ser corados positivamente pelas técnicas de vermelho de alizarina e *von Kossa*.^{50,61}

Santos *et al.*⁶² modificaram MSCs para expressar a BMP-2 com o objetivo de promover a diferenciação osteogénica, utilizando dendrímeros PAMAM como o veículo de entrega de genes. Para avaliar a transfeção das MSCs, foram utilizados marcadores osteogénicos quantitativos (atividade da fosfatase alcalina, secreção de osteocalcina e deposição de cálcio) e qualitativos (coloração de *von Kossa*), sendo estes marcadores significativamente mais fortes nas células transfetadas. Os autores demonstraram transfeção nestas condições e concluíram não ser necessário uma elevada eficiência de transfeção para a osteogénese ocorrer.

1.1.2. Aplicações terapêuticas

São vários os estudos que demonstram que as MSCs têm uma importância relevante, tanto na engenharia genética, como na engenharia de tecidos.² A sua multipotência, proliferação *in vitro*, efeito imunorregulador e capacidade de migrar para o local exato da lesão são das propriedades mais importantes para o seu uso clínico (**Figura 4**).^{2,63} As MSCs podem ser administradas por via intravenosa⁶⁴ ou diretamente no local de interesse⁶⁵. Esta variedade de propriedades permite que as MSCs desempenhem um papel de elevada importância na terapia celular e reconstrução de tecidos humanos.^{2,17}

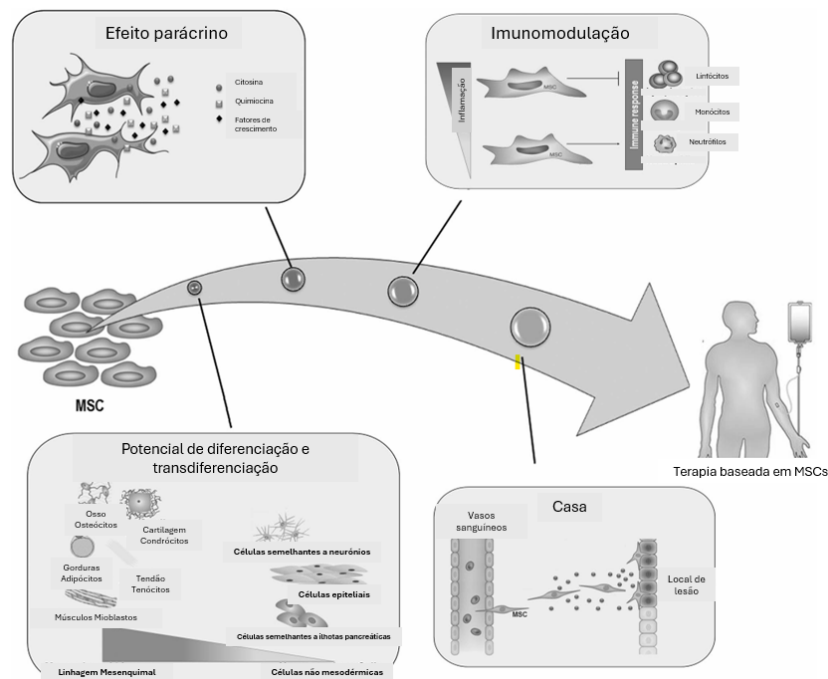


Figura 4. Propriedades biológicas que apoiam o uso clínico das MSCs. (Adaptado: Squillaro *et al.*⁶³)

Dadas as propriedades destas células e com recurso à engenharia genética, é possível introduzir genes exógenos nas MSCs e, posteriormente, reintroduzi-las no indivíduo, promovendo assim a estimulação da produção de proteínas específicas.^{66–68}

Na engenharia de tecidos, o uso das MSCs apoia-se em três vertentes: (1) células, geralmente de origem autóloga; (2) matriz, que fornece suporte, proliferação e função das células; e (3) sinais químicos ou estímulos que simulem *in vitro* o microambiente existente *in vivo* para a regeneração da forma ou função de um tecido ou órgão lesado. Assim, estas células podem ser cultivadas em biomateriais que vão servir de suporte temporário para produzir um tecido funcional, o qual será posteriormente transplantado.^{69–71}

As MSCs, por possuírem um comportamento imunológico privilegiado e propriedades anti-inflamatórias, podem também ser utilizadas em aplicações sistémicas. As evidências atuais mostram que as MSCs podem melhorar o envelhecimento, promovendo as funções de múltiplos órgãos importantes, incluindo cérebro, músculos, coração e sistema endócrino.⁷² Li *et al.*⁷³ fazem um apanhado de inúmeros estudos relacionados com o uso de MSCs para a reparação de órgãos. Por outro lado, outros autores descreveram o tratamento de diversas doenças com recurso às MSCs.^{74,75}

Gugliandolo *et al.* demonstraram que as MSCs podem ser utilizadas para o tratamento da doença de Parkinson.⁷⁶ Constantinescu *et al.* evidenciaram que a esclerose múltipla é outra das doenças que pode ser tratada com recurso a MSCs.⁷⁷ Sato *et al.* demonstraram que as MSCs podem diferenciar-se em hepatócitos, podendo ser úteis no tratamento de doenças hepáticas.⁷⁸ Jung *et al.* investigaram o uso das MSCs associadas com nanopartículas de óxido de ferro para o tratamento da doença do Alzheimer em ratos e concluiu que este sistema tinha potencial para ser usado no seu tratamento.⁷⁹ Estudos sobre osteoartrite mostraram resultados clínicos positivos, com melhoria da função articular, nível de dor e qualidade de vida, isto devido às suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras e regenerativas das MSCs.⁸⁰

2. Entrega de genes

No final da década de 1970 e início dos anos 80, surgiram os primeiros trabalhos sobre técnicas de transferência de genes em células de mamíferos utilizando retrovírus como sistemas de entrega de genes.⁸¹

Muitas doenças surgem como resultado de alterações genéticas e a descoberta de novas tecnologias de DNA recombinante levaram ao tratamento dessas doenças através da manipulação e alteração dos ácidos nucleicos das células doentes, mostrando-se assim a terapia génica como uma abordagem muito promissora no tratamento de muitas doenças hereditárias, assim como noutros distúrbios/doenças como infarto de miocárdio, infeções virais, cancro, insuficiência cardíaca, doenças neurodegenerativas e metabólicas e síndrome da imunodeficiência adquirida.^{44,81-83}

Com base nas técnicas usadas na entrega de genes, estas podem ser classificadas como *in vivo* ou *ex vivo* (**Figura 5**). Na terapia génica *in vivo*, o material genético é administrado diretamente ao paciente utilizando abordagens físicas e químicas. Na terapia génica *ex vivo*, as células-alvo são coletadas do paciente e, em seguida, o material genético é administrado às células *in vitro*, as quais são programadas antes de re-administradas no corpo do paciente.⁸⁴

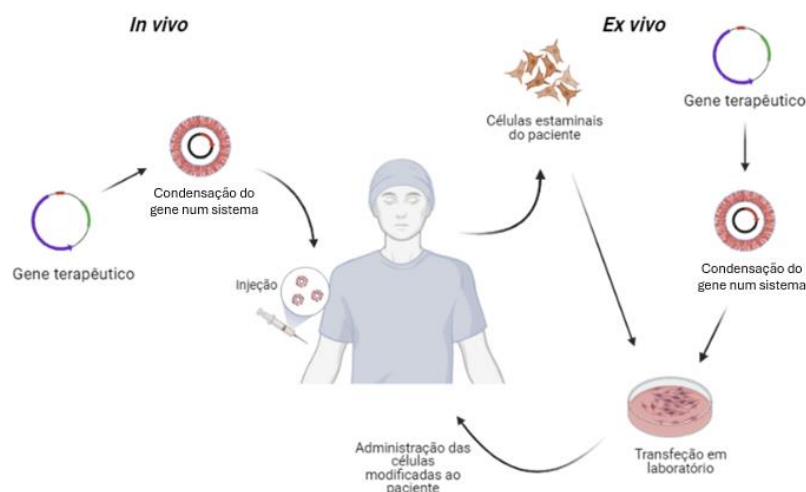


Figura 5. Classificação da terapia génica.

Um sistema ideal de entrega de genes deve atender a três critérios: a transferência do ácido nucleico para o tecido alvo deve ser eficiente (daí ser impraticável a administração sistêmica de genes desprotegidos devido à sua vulnerabilidade, degradação por nucleases, rápida depuração por macrófagos e ausência de especificidade para as células-alvo);⁸⁵ o material genético tem de ser entregue ao compartimento celular alvo, pelo que é necessário ter sempre em atenção a alta densidade de carga negativa, tamanho e forte hidrofiliabilidade dos ácidos nucleicos; e, o processo não deve causar nenhum efeito tóxico. Deste modo, para levar o material genético às células-alvo, esta terapia utiliza sistemas de entrega, os quais podem ser divididos em virais e não virais.^{81,82,84}

2.1. Sistemas de entrega de genes

Os sistemas de entrega de genes têm como objetivo principal a entrega de moléculas terapêuticas ao compartimento celular desejado superando os problemas de internalização criados pelas barreiras existentes. Os sistemas de entrega virais começaram por ser utilizados devido à sua elevada eficiência de transfeção e capacidade de utilizar a maquinaria celular para iniciar a expressão do genoma, sendo os mais comumente utilizados em ensaios clínicos os adenovírus, retrovírus, lentivírus, vírus herpes simplex e vírus da varíola, cada um com propriedades e vantagens específicas. No entanto, quando usados como vetores, os vírus apresentam diversas desvantagens, tais como imunogenicidade, carcinogenicidade, baixa especificidade relativamente ao tipo celular a transfetar e capacidade limitada de empacotamento de DNA.^{82-84,86-89}

Os sistemas de entrega não virais, comparados aos vírus, são menos imunogénicos, possuem a capacidade de compactar materiais genéticos maiores e têm facilidade de serem produzidos em larga escala. Adicionalmente, podem ser desenhados por forma a serem biocompatíveis. Assim, estes sistemas podem levar a estratégias mais vantajosas para o transporte de ácidos nucleicos.^{82-84,86,88}

2.1.1. Sistemas de entrega de genes não virais

Os sistemas de entrega não virais podem ser amplamente classificados em métodos físicos e químicos.⁸⁴

Os métodos físicos, não fazem uso de transportadores e dependem de uma força física que enfraquece a membrana celular permitindo que o DNA entre nas células por difusão, o que oferece várias vantagens, incluindo simplicidade e possibilidade de controlar os parâmetros do processo para necessidades específicas de tratamento. Aqui incluem-se, por exemplo, a injeção por agulha, a eletroporação e os ultrassons. No entanto, estes métodos levam a uma alta taxa de morte celular durante o processo, apresentam baixa eficiência de entrega de genes quando comparados com os sistemas virais, e a transferência de genes para órgãos internos é difícil pois requer um procedimento cirúrgico para atingir o tecido-alvo.^{84,88,90}

Os métodos químicos permitem a entrega de material genético exógeno nas células com recurso a compostos, naturais ou sintéticos, usados como transportadores. Estes podem interagir eletrostaticamente com o material genético, protegendo-o da degradação durante o processo de entrega, e conduzir a uma internalização celular por endocitose.⁹¹ As principais vantagens destes métodos são a sua simplicidade, a capacidade de se poder modificar os compostos de forma a ultrapassar questões de citotoxicidade ou baixa eficiência, e a facilidade de produção em larga escala.⁸⁴

Dentro dos métodos químicos, inclui-se a utilização de polímeros catiónicos como vetores. O quitosano, os polipéptidos catiónicos (por exemplo, a poli(L-lisina) (PLL)) e a polietilenimina (PEI) destacam-se por apresentarem várias vantagens, como a estabilidade, maior resistência às nucleases, facilidade de escape endossomal (alguns apresentam o “efeito esponja de protões”) e promoção de endocitose inespecífica, aumentando assim a eficiência da entrega do material genético. Outras vantagens incluem baixa imunogenicidade do hospedeiro, possibilidade de produção em larga escala e baixo risco de mutação comparativamente com o uso de sistemas de entrega virais. No entanto, este tipo de polímeros têm a desvantagem de apresentar uma eficiência de transfeção mais baixa relativamente aos sistemas de entrega virais.⁹²⁻⁹⁴

2.1.2. Barreiras biológicas à entrega de genes

Os nanosistemas podem ser introduzidos no corpo por várias vias de administração como a entérica (oral, sublingual ou anal), parenteral (intravascular, intramuscular, subcutânea ou inalação), tópica (pele ou membrana mucosa) e por implantação (como componentes de dispositivo de implantes). Consoante o modo de administração e o tecido alvo, os nanosistemas terão sempre de enfrentar barreiras biológicas.^{95,96}

De facto, existem diversas barreiras biológicas ao processo de transfeção, estando elas associadas a mecanismos de defesa dos tecidos e células contra agentes externos. Estas barreiras impedem/dificultam a entrega eficiente de ácidos nucleicos por nanoplexos não virais. Mesmo quando os nanoplexos escapam com sucesso das barreiras extracelulares e atingem a sua célula-alvo, muitas barreiras intracelulares precisam ainda de ser ultrapassadas.⁹⁵⁻⁹⁷

Se a administração dos nanoplexos for por injeção intravenosa, a barreira endotelial pode constituir um obstáculo importante à entrega de genes. A permeabilidade da barreira endotelial varia em diferentes segmentos de microvasculatura, assim como entre os órgãos. Na realidade, os vasos sanguíneos são heterogéneos, podendo classificar-se como contínuos, fenestrados e descontínuos, consoante a sua permeabilidade, podendo o transporte de moléculas ocorrer através deles por via paracelular ou transcelular. Quando a entrega de genes é para ser feita no cérebro, a barreira hematoencefálica é também de extrema relevância. Esta é uma barreira entre o sangue circulante e o fluido extracelular do cérebro no sistema nervoso central cuja principal função é proteger este órgão. Esta restringe o fluxo transvascular de solutos e macromoléculas através dos vasos sanguíneos, o que é atribuído a junções apertadas e transcitose limitada. Esta barreira pode ser ultrapassada através da funcionalização dos nanomateriais para a transcitose mediada por recetores.^{98,99}

A barreira estromal refere-se a estruturas presentes no tecido estromal, que é o tecido de suporte encontrado em vários órgãos do corpo. Esta barreira pode ser ultrapassada com a modificação dos sistemas de entrega tendo em conta o seu tamanho, carga superficial, flexibilidade, funcionalização da superfície, etc.¹⁰⁰

De realçar, no entanto, que quando os nanoplexos são administrados por via sistémica (**Figura 6**), as primeiras barreiras a ser encontradas têm a ver com o seu contacto com os constituintes do sangue (são de natureza extracelular). Estas incluem a

atividade de enzimas (endo e exonucleases) que podem levar à degradação do nanoplexo, a opsonização por parte de proteínas do plasma sanguíneo que se ligam ao nanoplexo alterando a sua carga, ou de anticorpos do sistema imunológico, que ativam o sistema fagocitário mononuclear (MPS), podendo levar à eliminação do nanoplexo ou a respostas imunes indesejadas como consequência da liberação de citocinas.⁹⁷

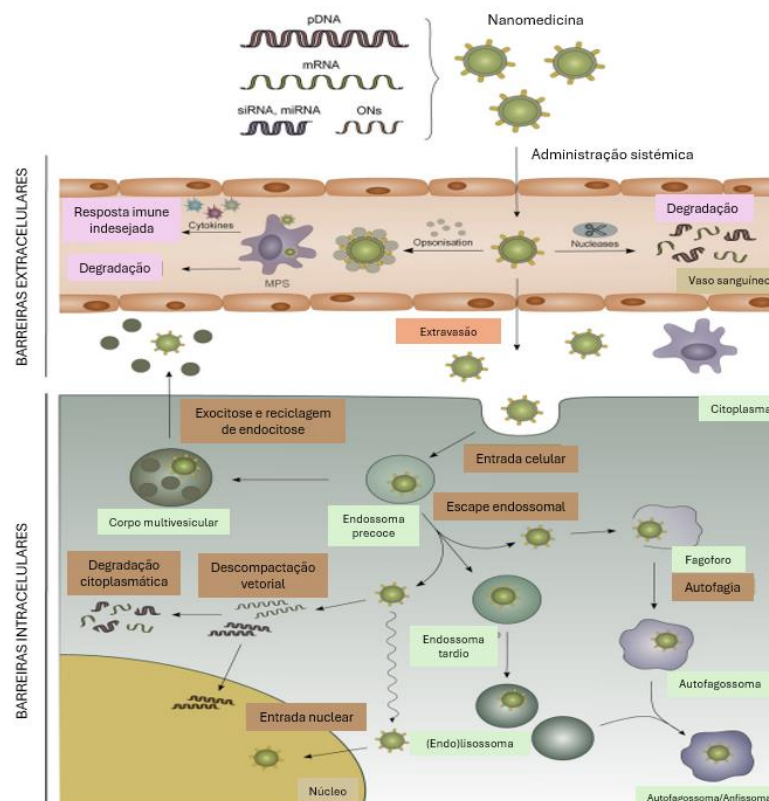


Figura 6. Visão geral das barreiras extracelulares e intracelulares para terapia gênica não viral após administração sistêmica. (Adaptado: Vermeulen *et al.*⁹⁷)

Já nos tecidos, a membrana celular e a membrana dos organelos são as principais barreiras que os nanosistemas têm de enfrentar. A membrana celular é constituída por uma camada fosfolipídica contendo proteínas. Uma vez que os nanoplexos, muitas vezes de natureza hidrofílica, não se conseguem fundir com a membrana, estes são internalizados pelo processo de endocitose.¹⁰¹ Para os ácidos nucleicos atingirem o compartimento celular desejado (o núcleo para o DNA ou o citosol para o RNA), estes têm ainda de ultrapassar a membrana endossomal, que constitui uma barreira para a

libertação de carga genética dos nanoplexos endocitados para o citosol.⁹⁵ Após a endocitose, os nanoplexos encontram-se em vesículas endossomais e fisicamente separados do citosol, daí estes terem de escapar da via endossomal antes que ocorra a degradação nos lisossomas. No citosol, várias outras barreiras devem ser evitadas, incluindo autofagia e degradação citoplasmática. Apenas algumas nanopartículas conseguem escapar à membrana endossomal, pelo que várias estratégias têm sido exploradas, sendo a mais conhecida a baseada em polímeros catiónicos e chamada “efeito esponja de protões”.^{87,95,101} No caso de entrega de DNA, este tem de ser entregue no núcleo, pelo que deve ultrapassar uma barreira extra, a membrana nuclear, e aí sofrer a descompactação e poder interagir com o seu alvo.⁹⁷

3. Polímeros de polietilenimina (PEI)

A polietilenimina (PEI) é um polímero catiónico, alifático e de natureza básica. Os polímeros de PEI são carregados positivamente a pH fisiológico, por possuírem numerosos grupos amina. A abundância de grupos amina pode gerar fortes ligações de hidrogénio com compostos orgânicos contendo grupos funcionais de oxigénio ou nitrogénio.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Estes polímeros são altamente solúveis em água, podendo apresentar-se na forma linear ou ramificada (**Figura 7**) com pesos moleculares que variam de 700Da a 1000kDa.^{102,105} Enquanto o PEI ramificado contém várias aminas primárias, secundárias e terciárias numa proporção de 1:2:1, o PEI linear contém maioritariamente aminas secundárias.^{106,107} De facto, a estrutura e o peso molecular, são os principais fatores que afetam tanto a atividade biológica como a biocompatibilidade dos complexos à base de PEI.¹⁰⁸ O PEI com baixo peso molecular é frequentemente submetido à conjugação com ligandos biodegradáveis para preservar a condensação favorável do ácido nucleico e, ao mesmo tempo promover maior biocompatibilidade.¹⁰⁶

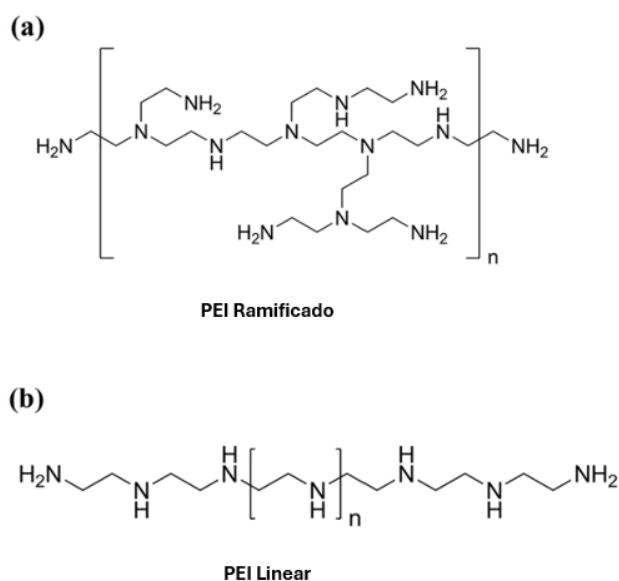


Figura 7. Estrutura química do polímero de polietilenimina (PEI): (a)linear; (b)ramificada. (Adaptado: Li et al.¹⁰⁹)

Comparando os dois tipos de PEI, ramificado e linear, o PEI ramificado apresenta maior capacidade de complexação e tamponamento por possuir mais grupos amina primárias passíveis de protonação.¹⁰⁷ Tanto o PEI ramificado de alto peso molecular

como o de baixo peso molecular são utilizados como transportadores de ácido nucleicos, sendo que o de alto peso molecular demonstrou maior capacidade para formar complexos com o DNA compactos e estáveis e assim maior eficiência de transfeção.¹⁰⁸

O PEI, um sistema de entrega não viral, apresenta várias vantagens como simplicidade de produção e capacidade de entregar materiais genéticos de grande tamanho, sendo considerado um dos mais eficientes entre todos os polímeros. A complexação de ácidos nucleicos por parte do PEI pode ser conseguida de forma fácil e reprodutível. Este polímero apresenta uma excelente capacidade de condensar e estabilizar ácidos nucleicos, resultando nos chamados poliplexos.^{106,110} Os poliplexos de PEI são fáceis de manusear, estáveis à temperatura ambiente e permitem o armazenamento a longo prazo por congelação, mantendo-se totalmente ativos.¹¹¹

A sua alta eficiência de transfeção torna-o um vetor bem conhecido para aplicações biomédicas, e esta alta eficiência de transfeção é devida à capacidade de tamponamento de pH por parte do PEI, o chamado efeito “esponja de protões” (**Figura 8**). O PEI tem a capacidade de estabelecer poros e defeitos na membrana, criando canais para o DNA atravessar para o núcleo da célula. A formação de poros aumenta à medida que a interação eletrostática entre o PEI catiónico e as membranas lipídicas carregadas negativamente se torna mais forte.¹⁰⁹ Os complexos PEI/DNA são geralmente carregados positivamente e interagem eletrostaticamente com a membrana externa da célula, o que permite a captura dos poliplexos por parte de um endossoma.⁹² Após haver esta interação e posteriormente internalização celular do PEI, haverá um influxo de protões assim como de iões cloreto pelas ATPases endossomais levando à redução do pH. O aumento drástico na força iónica dentro do endossoma, cuja entrada de protões é exacerbada com a protonação do PEI (o efeito esponja de protão, que leva a uma expansão da rede polimérica por repulsão de carga), induzirá ao inchaço osmótico do endo-lisossoma e provocará a rutura.⁸⁷ Desta forma, o PEI tem a capacidade de proteger o DNA da degradação enzimática no citoplasma, uma vez que o DNA sozinho não conseguiria ultrapassar esta barreira.¹⁰⁸

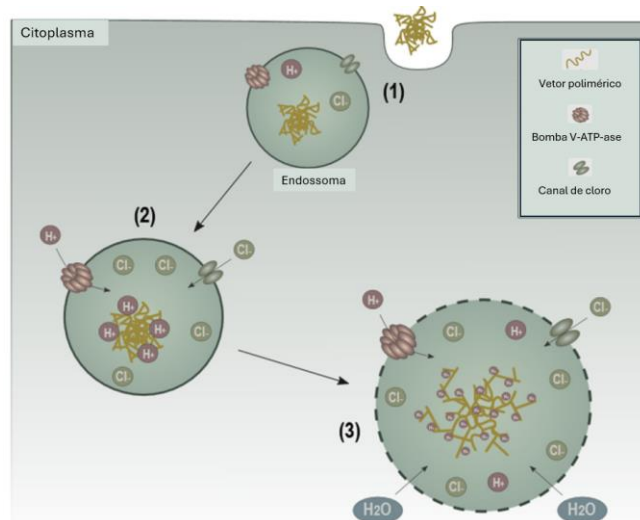


Figura 8. Hipótese da esponja de prótons. (Adaptado: Vermeulen *et al.*⁸⁷) Hipótese descrita em 1997 por Behr *et al.*¹¹²

No entanto, a toxicidade do PEI é um aspecto relevante a ter em consideração. Esta está sobretudo relacionada com o peso molecular e com a sua estrutura.^{113,114} Estudos recentes mostraram que quanto maior o grau de ramificação do PEI ramificado, mais favorável será a formação de pequenos complexos de transfeção, melhorando assim a eficiência do processo. O PEI ramificado mostrou também um tamponamento significativo numa ampla faixa de pH, teve o maior potencial de carga catiônica e condensou o DNA plasmídico (pDNA) em comparação com o PEI linear.^{83,108}

O PEI de alto peso molecular, embora tenha maior eficiência de transfeção, apresenta citotoxicidade significativa em células de mamíferos, devido à sua elevada carga e não degradabilidade, o que limita a sua aplicação clínica. Esta elevada citotoxicidade induz a desestabilização da membrana plasmática e autofagia. Para superar estes problemas, muitas vezes são utilizadas estratégias como a modificação da superfície do PEI, com uma reação de PEGuilação para diminuição da sua carga positiva. Esta modificação do PEI com cadeias de polietilenoglicol (PEG) pode melhorar a estabilidade do sistema e prolongar a circulação sanguínea. Além disso, o efeito de repulsão dos segmentos hidrofílicos de PEG também pode camuflar o excesso de carga positiva, reduzindo assim a toxicidade do material catiônico, fazendo com que o complexo apresente menor toxicidade e maior eficiência de transfeção.^{83,94,110} Outras modificações químicas são também passíveis de serem efetuadas como acetilação,

carboxilação, hidroxilação, e modificação com oligossacáridos, grupos/moléculas para direcionamento ou marcadores fluorescentes (**Figura 9**).¹⁰⁹

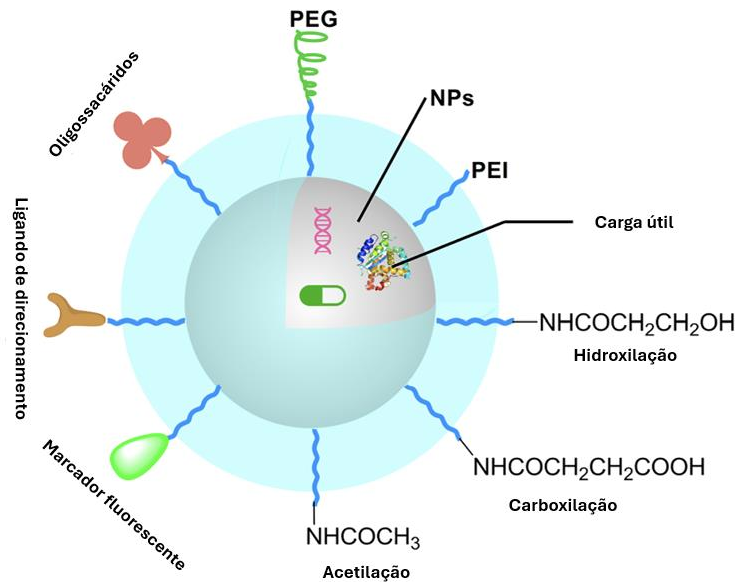


Figura 9. Ilustração esquemática das modificações possíveis do PEI quando incorporado em nanossistemas. (Adaptado: Li *et al.*¹⁰⁹)

O PEI de baixo peso molecular, por ser menos tóxico, tem sido ativamente explorado como alternativa. No entanto, apresenta a desvantagem da tendência a formar complexos com DNA menos condensados e estáveis devido ao pequeno tamanho da cadeia polimérica, geralmente resultando numa eficiência de transfeção insatisfatória. Uma solução viável para este dilema seria expandir reversivelmente o tamanho do PEI de baixo peso molecular, reticulando-o com ligações cliváveis, no entanto, é difícil gerir esta reticulação de uma forma controlada.^{94,110}

3.1. Aplicações do PEI

A aplicação do PEI como reagente de transfeção celular foi relatada pela primeira vez em 1995 por Boussif *et al.*, onde demonstraram que o PEI era capaz de transferir DNA para o cérebro de ratos recém-nascidos, dando assim a primeira evidência para a aplicação *in vivo* do polímero.¹¹⁵ Desde então, tornou-se o segundo sistema de entrega não viral utilizado para transferir ácidos nucleicos para as células. Vários estudos,

utilizando diferentes tipos de PEI, mostraram uma eficiência relativamente alta na expressão génica em comparação com outros sistemas de entrega poliméricos.^{92,116}

O PEI é um polímero com capacidade de se ligar ou interagir com nanomateriais, funcionalizando a sua superfície com o objetivo de melhorar a eficiência de transfeção do sistema de entrega. Este é amplamente utilizado para funcionalizar nanomateriais como CDs ou nanopartículas magnéticas sendo muito eficiente a nível de internalização celular.^{103,117} Os sistemas baseados em PEI para entrega de ácidos nucleicos têm um potencial promissor, em particular nas áreas de oncologia, vacinação e doenças pulmonares.¹⁰⁶ Meher *et al.* funcionalizaram pontos de carbono de heparina com o PEI para facilitar o carregamento de um fármaco anticancerígeno e conseguir administrá-lo de forma mais eficiente.¹¹⁸ Manzoor *et al.* funcionalizaram nanotubos de carbono de parede simples (*single wall carbon nanotubes*, SWCNTs) com PEI e amido para fabricar um sensor para deteção reversível de CO₂ em determinadas condições ambientais.¹¹⁹

O PEI tem sido utilizado para criar modelos/condições de doenças humanas em células. Li *et al.* utilizaram a transfeção com PEI para introduzir mutações em células e estudar o efeito dessas mutações na função celular.¹²⁰ Também tem sido utilizado para estudar a função de proteínas nas células. Zhang *et al.* usaram a transfeção de células com PEI para expressar proteínas fluorescentes e visualizar a localização e a dinâmica das proteínas dentro da célula.¹²¹

Relativamente aos CDs, os quais apresentam propriedades fluorescentes, a sua modificação/funcionalização com PEI fornece cargas superficiais positivas, o que é benéfico para condensar macromoléculas carregadas negativamente, como é o caso do DNA. A alta densidade de grupos amina no PEI não só gera muitos pontos de interação, mas também confere aos CDs uma boa estabilidade coloidal.^{102,103,117}

4. Pontos de carbono (Carbon Dots)

A nanomedicina é uma área de investigação em rápido crescimento que visa aplicar nanopartículas na medicina para o tratamento ou diagnóstico de doenças.^{122–125} Em 2004, Xu *et al.* descobriram nanopartículas de carbono com dimensões inferiores a 18nm.¹²⁶ Estas exibiam propriedades de fluorescência fascinantes dependendo do tamanho e apresentavam capacidade de funcionalização da superfície.^{127–129} Em 2006, Sun *et al.* sintetizaram essas nanopartículas de carbono fluorescente estáveis e com cerca de 5nm de diâmetro a partir de pó de grafite, utilizando a técnica de ablação a laser, denominando-os pela primeira vez de “Carbon Dots” (CDs), que em português se traduz para “pontos de carbono”.¹³⁰ Após esta descoberta, houve uma extensa investigação em torno das propriedades dos CDs e da sua conjugação a polímeros, com a finalidade de perceber melhor as suas aplicações. Li *et al.* realizaram a síntese e purificação de CDs, verificando-se que a fotoluminescência exibida era dependente do tamanho.¹³¹ Com este conhecimento, os CDs foram sintetizados através de diferentes métodos com o objetivo de produzir CDs com níveis de fotoluminescência adequados a cada finalidade. Zhu *et al.*, em 2013, prepararam CDs altamente fotoluminescentes com um rendimento quântico de até 80% pelo método hidrotérmico utilizando, como precursores, ácido cítrico e etilenodiamina (EDA).¹³² Desde então, várias estratégias e tecnologias foram desenvolvidas para sintetizar CDs com melhor rendimento quântico.¹²⁸

Embora a estrutura química dos CDs não seja ainda exatamente clara, sabe-se que pode depender dos precursores usados e, das condições de reação.¹³³ Os CDs podem apresentar carga positiva, negativa ou neutra por possuírem diferentes grupos funcionais à superfície.¹³⁴ Adicionalmente, podem ser funcionalizados através de ligações covalentes, pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas, adquirindo novas propriedades.^{17,128}

Os CDs podem ter átomos de carbono com hibridação sp^2 ou sp^3 e podem apresentar estrutura cristalina ou amorfa. Assim, com base nas suas características e mecanismo de formação, são principalmente classificados como pontos quânticos de carbono (*carbon quantum dots*, CQDs), pontos quânticos de grafeno (*graphene nanodots*, GQDs) e

nanopontos de carbono (*carbon nanodots*, CNDs) (**Figura 10**). Os CQDs têm estrutura cristalina de carbono sp^2/sp^3 e são, geralmente, nanopartículas esféricas. Os GQDs são caracterizados por apresentarem estruturas de carbono sp^2 , sendo descritos como nanopartículas constituídas por uma ou mais camadas de grafeno (inferior a 5 camadas) com grupos funcionais à superfície, e com um diâmetro inferior a 100nm, exibindo propriedades elétricas e óticas interessantes. Os CNDs, por seu lado, possuem núcleos amorfos (não organizados), apresentando dimensões abaixo dos 10nm.^{124,133,135–137}

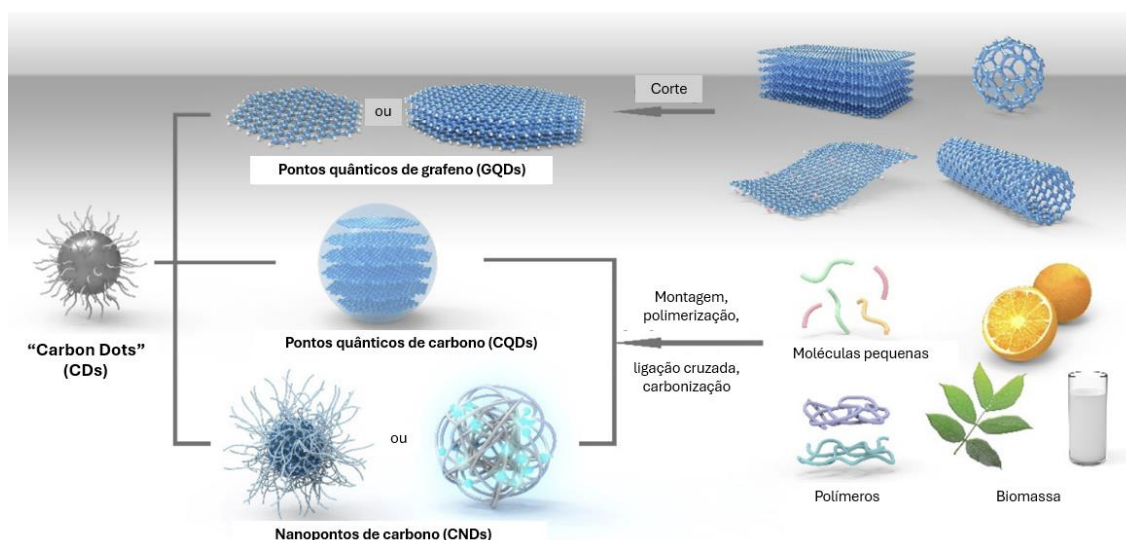


Figura 10. Classificação dos CDs e suas principais abordagens de síntese. (Adaptado: Liu *et al.*¹²²)

Os pontos de carbono são, pois, constituídos por um núcleo e uma camada mais superficial, a qual pode ser composta por grupos funcionais como ácido carboxílico, éter, carbonilo, epóxi, amina e hidroxilo, dependendo do método de síntese, proporcionando-lhes uma alta hidrofiliabilidade e a facilidade de funcionalização com diversas espécies inorgânicas, orgânicas, poliméricas ou biológicas.^{128,129} É esta funcionalização superficial (**Figura 11**) que permite o aperfeiçoamento das suas propriedades físico-químicas como a dispersibilidade em solventes diferenciados, a fotoestabilidade, a área superficial, a condutividade, a atividade catalítica e as propriedades óticas, incluindo fluorescência.^{102,104,123,138}

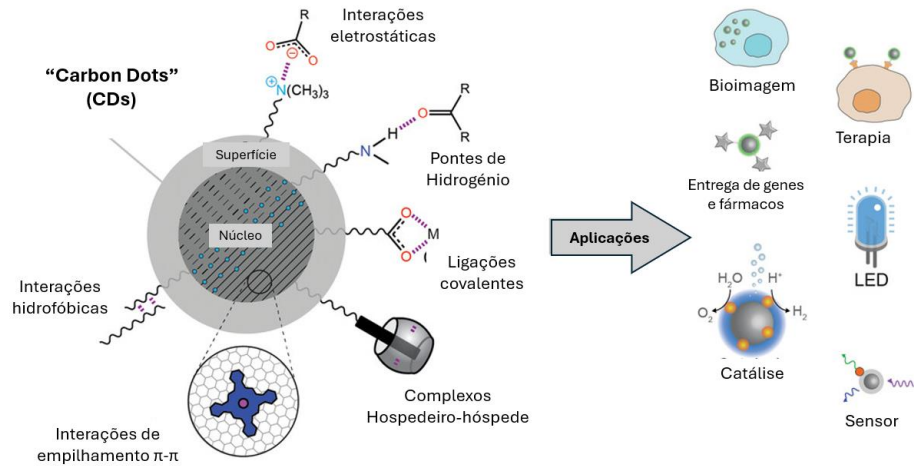


Figura 11. Visão geral das interações moleculares usadas para exploração de pontos de carbono e as suas aplicações. (Adaptado: Arcudi *et al.*¹³⁹)

4.1. Síntese de CDs

4.1.1. Métodos

Os métodos de síntese dos CDs, dependendo da fonte de utilização de carbono utilizada, podem ser divididos em dois tipos: “*top-down*” e “*bottom-up*” (Figura 12).^{127,129}

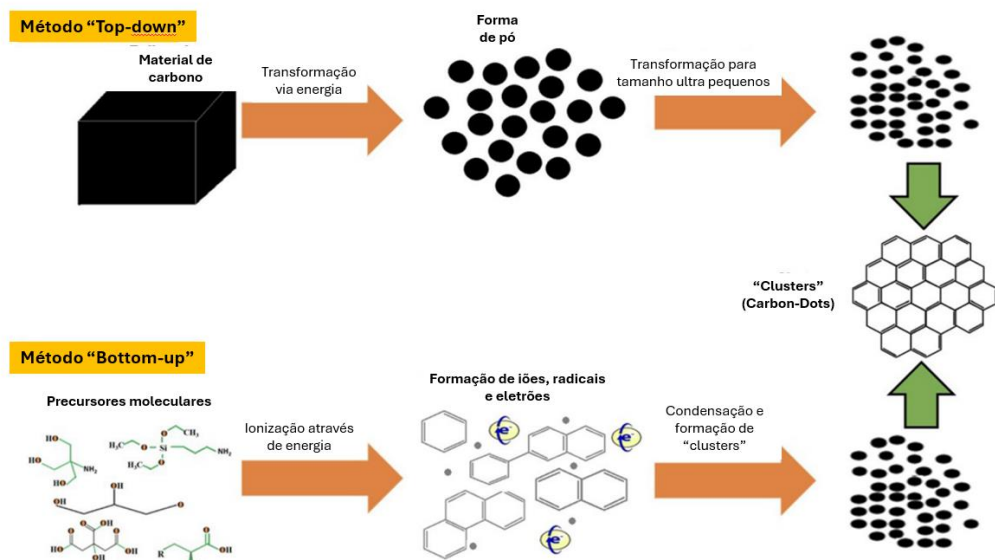


Figura 12. Métodos de síntese de CDs. (Adaptado: Sharma *et al.*¹²⁷)

O método *top-down* refere-se à quebra de estruturas maiores de carbono, como a grafite, para obter estruturas menores de carbono com dimensões inferiores a 10nm. Este pode ser realizado através da oxidação química¹⁴⁰, síntese eletroquímica¹⁴¹, ablação a laser¹⁴² e ultrassons¹⁴³. No entanto, esta técnica exige o uso de equipamentos caros, condições de reações adversas (por exemplo, elevada acidez, energia e tempo de reação) que são relativamente difíceis de controlar.^{127,144-147}

O método *bottom-up*, refere-se à síntese de CDs a partir de precursores moleculares apropriados (normalmente, pequenas moléculas orgânicas) sob condições específicas, tais como oxidação eletroquímica/química¹⁴⁸, tratamento hidrotérmico¹⁴⁶, irradiação de micro-ondas¹⁴⁹, tratamento ultrassónico¹⁵⁰ e técnicas de decomposição térmica/ pirólise/carbonização. Este é o método mais vantajoso em relação ao anterior uma vez que permite obter CDs com uma composição química mais homogénea e com menos defeitos.^{127,145,147}

Dentro dos métodos *bottom-up*, a síntese hidrotérmica é um método ecologicamente correto, de baixo custo, não tóxico e de fácil operação. Este processo de preparação de CDs ocorre numa única etapa, com diversas opções de materiais precursores como fonte de carbono, nomeadamente, ácidos (ascórbico e cítrico), produtos de origem animal (leite de vaca, albumina bovina sérica e albumina do ovo), quitosano, sementes de café, sumo de laranja, banana, mel, leite de soja, celulose, cinza de papel, entre outros. Estes precursores orgânicos reagem num reator hidrotérmico selado, a elevadas temperaturas. Esta síntese apresenta rendimentos baixos e tempos de reação elevados. No entanto, é muito utilizada devido à facilidade e vertente ecológica (*ecofriendly*).^{125,145}

Tabela 1. Métodos adicionais para a preparação de CDs. ^{125,145,151}

Métodos	Princípio	Vantagens
Micro-ondas	Transformação de energia eletromagnética em energia térmica quando a solução é colocada sob micro-ondas.	<ul style="list-style-type: none"> • Económico • Simples • Rápido
Pirólise	Os materiais são submetidos a condições de temperatura e pressão controladas, acima do seu ponto de fusão e na ausência de oxigénio. As propriedades óticas destes CDs obtidos por este método são ajustadas em função da temperatura da reação, duração da reação e pH.	<ul style="list-style-type: none"> • Operação simplificada • Abordagem sem solventes • Maior tolerância ao precursor • Menor tempo de reação • Baixo custo
Ultrassons	Utilização de ultrassons que promovem a quebra de ligações químicas para produzir CDs.	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa temperatura • Ecologicamente correta
Aquecimento simples	Aquecimento dos materiais precursores a elevadas temperaturas para promoção da formação de CDs por cristalização.	<ul style="list-style-type: none"> • Simples • Baixo custo
Síntese química	Utilização de diversos reagentes químicos como ácidos e bases que são utilizados como agentes redutores.	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidade de catalisar as reações
Ablação a laser	Um feixe de luz de alta intensidade incide sobre o material precursor promovendo a sua fragmentação em pequenas partes a serem utilizadas na síntese dos CDs.	<ul style="list-style-type: none"> • Ecologicamente correta • Eficiente • Sem necessidade de produtos químicos

A síntese de CDs com recursos aos métodos acima mencionados requer a utilização de técnicas de separação e purificação como cromatografia, diálise e eletroforese em gel.¹⁴⁵

4.1.2. Precursores

A composição e estrutura dos CDs variam em função dos precursores utilizados e das condições de síntese. Em contraste com outros materiais fluorescentes que podem necessitar de precursores caros, equipamentos complexos ou processos de tratamento elaborados, os CDs podem ser preparados a partir de materiais facilmente disponíveis e baratos, sendo a seleção do precursor baseada na aplicação pretendida. Isto afeta a variação de heteroátomos e grupos funcionais que influenciarão as propriedades óticas e elétricas dos CDs.^{124,134,151}

Os CDs podem ser sintetizados utilizando biomoléculas, biopolímeros e plantas como precursores. Os aminoácidos e proteínas são os precursores mais utilizados por possuírem grupos amina (-NH₂) e grupos funcionais carboxílico (-COOH), e ainda serem abundantes, de baixo preço, com boa solubilidade e biocompatibilidade.^{151,152} De igual forma, glicose, ácidos nucleicos, ácido fólico, glutatona e outras vitaminas são amplamente utilizadas como precursor de CDs devido à sua elevada solubilidade em água, baixo custo e não toxicidade.¹⁵³

Considerando uma vertente de aproveitamento de biomassa, a síntese de CDs pode recorrer a diversos materiais como a biomassa derivada de vegetais, fruta ou de diversas partes das plantas.^{152,154,155} Estes tipos de precursores são ecologicamente sustentáveis e de baixo custo evitando outros componentes no processo de síntese. Estes precursores vegetais são ricos em biomoléculas, metais, não metais e grupos funcionais, fazendo com que os CDs formados possam apresentar propriedades interessantes, como ser não tóxicos, biocompatíveis e altamente luminescentes.¹⁵¹ Muitas plantas têm servido como precursoras de CDs com diferentes tamanhos e comprimentos de onda de emissão. Por exemplo, CDs de diferentes plantas exibem propriedades de superfície e morfologia muito diferentes devido às suas diferentes composição e concentração químicas.¹⁵⁶

4.1.2.1. Ácido ascórbico como precursor

O ácido ascórbico (**Figura 13**), também conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel, abundante em frutas e vegetais e com um papel importante em processos metabólicos complexos como oxidação e redução.¹⁵⁶

Esta molécula orgânica encontra-se entre os precursores mais utilizados como fonte de carbono na síntese de CDs por ser uma fonte barata e por potenciar a sua futura aplicação clínica. O ácido ascórbico torna-se um precursor interessante uma vez que os grupos químicos presentes nesta molécula, nomeadamente, os que contêm oxigénio, podem resultar em CDs com propriedades únicas como a fotoestabilidade.¹³⁶

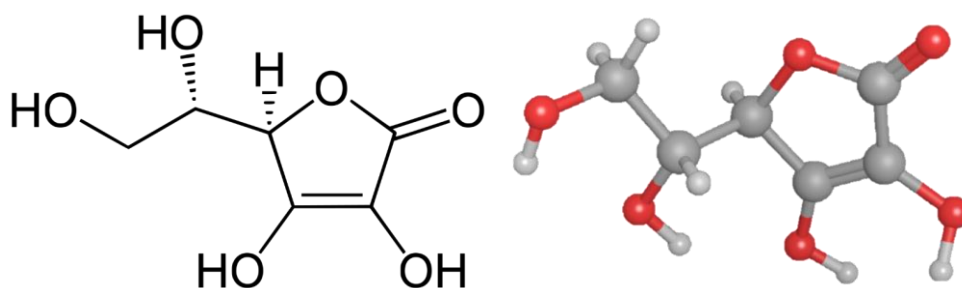


Figura 13. Representação da estrutura química do ácido ascórbico.¹⁵⁷

4.2. Propriedades dos CDs

Os CDs apresentam propriedades que dependem do método de síntese, do tipo de precursor e das condições experimentais utilizadas.^{135,158} Nestas propriedades incluem-se as referidas na **Figura 14**. Estas propriedades fornecem vantagens quando comparados com outros materiais fluorescentes, como moléculas orgânicas, nanopartículas metálicas e pontos quânticos semicondutores (*quantum dots*).^{102,127,128,147,158,159}

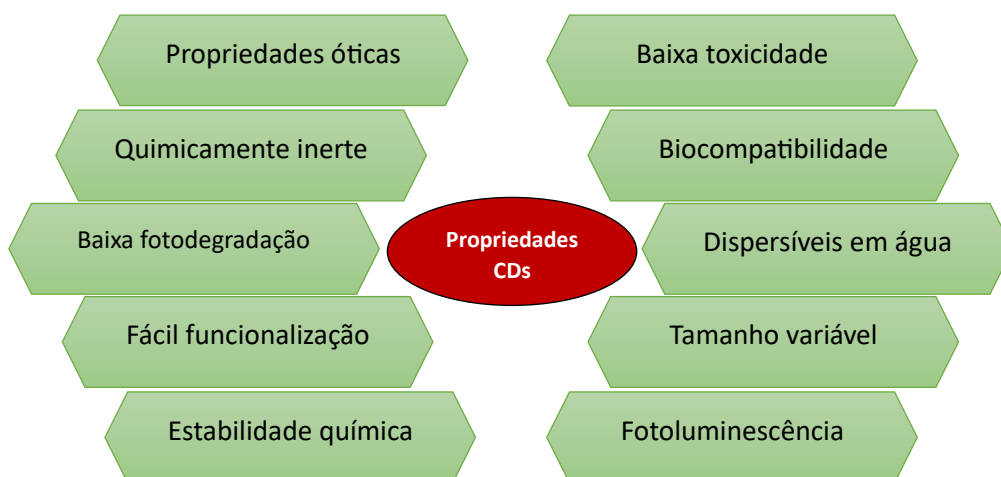


Figura 14. Propriedades dos CDs.

Quando comparamos CDs com outros nanomateriais de carbono, como nanotubos de carbono, nanodiamantes, fulerenos e folhas de grafeno, os CDs são dispersíveis em água e mais estáveis, dependendo dos grupos funcionais que irão apresentar na sua superfície.^{137,160}

Os espectros de emissão de CDs têm uma faixa de comprimentos de onda de 330nm a 475nm, mas como estes são altamente fluorescentes, esta pode ainda ser observada na zona do verde a amarelo (< 550nm-580nm).^{137,160}

Na sequência de várias sínteses de CDs, Ding *et al.*¹⁶¹ descobriram que poderiam sintonizar a fotoluminescência da região do ultravioleta do espectro de luz até á região do infravermelho em vários solventes, utilizando sempre o mesmo comprimento de onda de excitação. Lu *et al.* afirmaram que ao diminuir a temperatura da reação de síntese havia uma mudança observada na emissão de seus CDs da região UV para IR.¹⁶²

Estes pontos de carbono não são facilmente fotobranqueados, ao contrário de alguns corantes e proteínas fluorescentes. Eles mantêm a capacidade de emitir luz de forma eficiente mesmo quando excitados por um laser durante um período prolongado. Uma vez que são, normalmente, sintetizados a elevadas temperaturas, são estáveis em condições ambientais normais e têm a capacidade de suportar valores de pH extremos e elevada força iónica, podendo ser armazenados por um longo período preservando as suas propriedades.¹⁶²

Outra propriedade também muito importante é a biocompatibilidade. O facto de evidenciarem uma “baixa toxicidade” em diferentes estudos, é muito importante para aplicações biológicas. No entanto, deve ter-se em atenção que a “baixa citotoxicidade”

é um termo vago e que estes são relatados como tendo uma toxicidade não negligenciável, visto que acima de uma concentração ideal, os CDs levarão ao comprometimento da integridade da membrana celular, levando à morte celular.^{129,163,164} Os CDs podem ser funcionalizados através de ligações covalentes tornando-os nanomateriais com baixa citotoxicidade e alta estabilidade. Diferentes grupos funcionais na superfície, resultam em CDs com diferentes cargas e com capacidade distinta de serem funcionalizados com moléculas orgânicas ou inorgânicas.^{88,165} Algumas das moléculas comumente utilizadas para funcionalizar os CDs são o polietilenoglicol (PEG) e a polietileneimina (PEI).¹²⁹

Quanto à eletroquímica, os CDs podem desempenhar um papel como aceitadores e doadores de elétrons, participando em reações redox. A presença de uma maior quantidade de grupos funcionais nos CDs pode levar a uma transferência de elétrons mais lenta.¹⁶⁴

4.3. Caracterização dos CDs

Existem várias técnicas que permitem caracterizar os CDs sintetizados com a finalidade de escolher CDs com propriedades pertinentes de acordo com as aplicações necessárias. Para isso, vários parâmetros são estudados e ajustados como tamanho, grupos funcionais, estrutura, composição elementar, fluorescência e muitas outras propriedades físicas e químicas.¹⁵¹

A espectroscopia de UV-Vis é uma técnica que permite medir a absorção de radiação eletromagnética na região UV-Vis e, assim, aferir sobre as propriedades óticas dos CDs. Os CDs apresentam excelente absorção na faixa de 280–380 nm, emitindo fluorescência com um desvio de Stokes muito pequeno (alguns nanômetros). Os espectros de UV-vis normalmente apresentam duas bandas de absorção, uma para a transição π - π^* de anéis aromáticos sp^2 e outra para a transição n - π^* de vários grupos funcionais de superfície, como grupos carbonilo, hidroxilo, éster e carboxilo.^{151,163,166} No entanto, o espectro de absorção varia em função do método de síntese utilizado e da natureza dos grupos de superfícies presentes.¹⁶³

A espectroscopia de fotoluminescência (PL) é outra técnica comum que também permite medir as propriedades óticas dos CDs. Para obter os espectros de emissão, é importante ter um espectro de absorção obtido através do UV-vis, sendo os espectros de

emissão dependentes dos comprimentos de onda de excitação utilizado. Alterações do comprimento de onda de excitação resulta numa mudança no comprimento de onda do pico de emissão, com um desvio de Stokes característico de alguns nanómetros.^{162,164} Além disso, vários outros fatores, como tamanho de partícula, formato, estrutura interna e composição também desempenham um papel importante nas propriedades de fotoluminescência dos CDs.^{151,166}

Estas duas técnicas espectroscópicas, UV-Vis e PL, podem ser usadas juntas para determinar o rendimento quântico dos pontos de carbono. Este rendimento quântico (*quantum yield* (QY)) é determinado por comparação com a do sulfato de quinina, um rendimento quântico conhecido e utilizado como referência.¹⁶⁷

A espectroscopia de radiação Infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) é outra técnica utilizada para caracterização dos CDs. Consiste numa análise qualitativa que se baseia na medição da absorção/transmitância de radiação eletromagnética com comprimentos de onda na região do infravermelho (4000–400 cm^{-1}).¹⁶⁶ Os picos de absorção correspondem a frequências de vibração das ligações entre os átomos que compõem a amostra, útil para a identificação dos grupos funcionais presentes na superfície dos CDs, e a intensidade dos sinais é um indicador direto da concentração dos compostos presentes.^{151,166} Uma vez que a síntese dos CDs é realizada com uma oxidação parcial do precursor de carbono, os grupos apresentados à superfície dos CDs são maioritariamente identificados como grupos carboxilo, ou ácido carboxílico, grupos hidroxilo e éter/epóxi.^{163,167}

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta de análise estrutural, podendo dar informação sobre o tipo de hibridação presente nos átomos de carbono constituintes dos CDs.^{163,166} O RMN possibilita a identificação com precisão dos grupos funcionais de superfície e fornece informação quanto à natureza da sua ligação à superfície da partícula.¹⁶⁷

A Microscopia Eletrónica de Transmissão (*transmission electron microscopy* (TEM)) é uma técnica de microscopia na qual um feixe de eletrões passa através de um material ultrafino e interage com a amostra formando uma imagem a partir dos eletrões transmitidos.¹⁵¹ Esta técnica fornece informações sobre o tamanho real das partículas, distribuição de tamanho e morfologia das amostras.¹⁶⁷

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma tecnologia robusta para caracterizar o tamanho hidrodinâmico das partículas e a distribuição do tamanho na amostra através do índice de polidispersão (PDI).¹⁶⁸ Este baseia-se no movimento browniano das partículas em solução e calcula o tamanho hidrodinâmico de cada partícula através da incidência de um feixe de luz monocromático e detecção da luz dispersa pelas partículas.¹⁶⁹

Para uma melhor compreensão das propriedades fundamentais dos CDs, podem ser usadas outras técnicas analíticas, como as técnicas eletroforéticas. Estas permitem separar partículas dispersas num solvente com base no tamanho, forma e ionização da superfície das nanopartículas, de acordo com os seus comportamentos de migração no gel sob influência de um campo elétrico.^{167,170} O método de centrifugação em gradiente de densidade que é uma técnica muito utilizada para separar biomacromoléculas e isolar nanopartículas com base no seu tamanho, forma ou densidade.¹⁶⁷

4.4. Aplicações dos CDs

Desde a descoberta dos CDs, as suas propriedades únicas têm sido extensivamente estudadas para serem aplicadas em diversos campos científicos, como a fotoquímica, eletroquímica, nanomedicina e na química verde.¹³³

Na nanomedicina, são várias as aplicações biomédicas descritas (**Figura 15**). Os CDs podem ser utilizados no diagnóstico e monitorização de doenças, como agentes de contraste de bioimagem e integrados em biossensores, ou na entrega de fármacos e de genes para o tratamento de doenças e cicatrização de feridas.¹⁴⁷

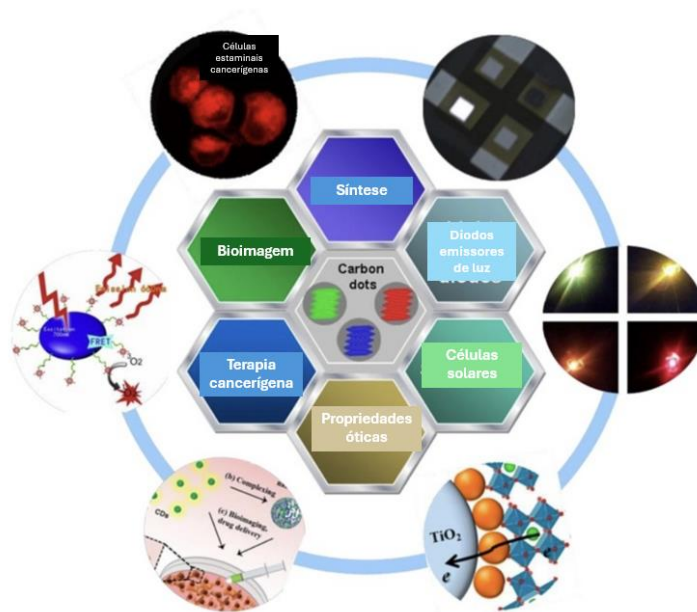


Figura 15. Aplicações biológicas dos CDs. (Adaptado: Yuan *et al.*¹⁷¹)

A bioimagem é a aplicação em que os CDs atuam como agentes de contraste devido à sua capacidade de penetrar nas células vivas, e fornecer sinais fluorescentes nítidos. Isto permite visualizar células e compartimentos celulares e assim compreender melhor as estruturas e funções fisiológicas *in vivo* e *in vitro*.^{137,145} Os CDs têm sido utilizados para rastreamento de células e detecção de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos.^{128,133} A imagem com contraste ótico entre a zona de interesse marcada e a região circundante permite a detecção precoce, triagem e diagnóstico de doenças potencialmente fatais como o cancro, por exemplo, neste caso possibilitando obter informações sobre o tipo, tamanho e localização dos tumores em humanos.^{137,172,173}

A aptidão de emissão de fluorescência dos CDs na zona do infravermelho é de particular destaque porque a luz nesta região do espectro tem capacidade de penetração mais profunda nos tecidos e os sistemas biológicos que são permeáveis para esses comprimentos de onda.^{145,163}

Outra das grandes aplicações é na entrega de fármacos ou genes atuando como sistemas de entrega para o tratamento de diversos tipos de doenças ou para a regeneração de tecidos. O objetivo de atingir o local alvo é desafiador devido às barreiras biológicas existentes no percurso. No entanto, a capacidade de funcionalização dos CDs facilita esta tarefa havendo a possibilidade de criar sistemas otimizados. Curiosamente, foi descrito que os CDs têm a capacidade de atravessar uma das barreiras biológicas mais

difíceis, a barreira hematoencefálica (BHE), necessária a ser ultrapassada no tratamento de várias doenças e distúrbios cerebrais. Os CDs, devido ao seu reduzido tamanho, conseguem penetrar através de difusão passiva e, para além de conseguirem alcançar tecidos profundos onde os fármacos não conseguiriam normalmente chegar, há a possibilidade de serem rastreados devido às suas propriedades óticas únicas, criando imagens do ambiente biológico/celular.^{117,133,162,173,174}

Relativamente à regeneração de tecidos, os CDs podem ser utilizados no estudo da regeneração de tecido ósseo. Segundo Shao *et al.*¹⁷⁵, sintetizaram CDs partindo de ácido cítrico, para marcação e rastreamento de células estaminais de medula óssea de rato. Neste estudo constataram que os CDs não apresentaram elevada citotoxicidade.

Os CDs podem ser utilizados para a deteção de vários parâmetros, como por exemplo: a temperatura, através da alteração da sua intensidade de fluorescência, sendo útil para monitorização de processos metabólicos em células vivas; o pH, podendo ser utilizados em aplicações biológicas e ambientais para a monitorização de processos biológicos intracelulares e controlo da qualidade de alimentos e bebidas; iões metálicos, como o ferro ou o cobre, podendo os CDs serem modificados para se ligarem seletivamente a iões específicos, usados na monitorização eletroquímica em dispositivos médicos; biomoléculas como glicose, sendo os CDs funcionalizados com sondas específicas para a sua deteção, o que é utilizado no diagnóstico médico e controle de qualidade dos alimentos; gases tóxicos, podendo os CDs serem modificados para reagir com gases específicos, o que é útil em aplicações de segurança industrial, monitorização ambiental e diagnóstico médico.^{145,160,162,163,172}

Os CDs têm potencial para o controlo de qualidade, como por exemplo na deteção de bactérias, tornando as abordagens usadas altamente sensíveis, específicas e rápidas. Eles podem ser modificados com um anticorpo específico e fornecer uma análise qualitativa e quantitativa do alvo na amostra.¹⁶² Também podem ser utilizados para interagirem, com sucesso, com diferentes vírus e retardar a infeção.¹⁴⁵ Certos produtos químicos também podem ser detetados e quantificados para fins de monitorização de águas.¹⁷³

Uma outra aplicação dos CDs pode ser a sua utilização como fotocatalisadores. Estes fotocatalisadores baseados em CDs podem ser estimulados pela luz solar para

impulsionar, de forma eficiente, as reações químicas necessárias para promover a degradação de corantes orgânicos nocivos e poluentes.^{162,163}

As sondas são outras das aplicações dos CDs, podendo ser utilizados na segurança alimentar, para determinar vários tipos de contaminantes, como pesticidas, medicamentos veterinários, bactérias e aditivos proibidos.¹²³ Como sensores, permitem identificar e medir concentrações de analitos com base em propriedades como fotoluminescência e condutividade elétrica.^{123,162} Ao interagir com os analitos, levam a alterações da sua intensidade de fluorescência ou comprimento de onda de emissão, o que pode, em última análise, ser útil no ambiente clínico para diagnosticar níveis anormais de parâmetros bioquímicos.^{162,173}

5. Nano híbridos à base de pontos de carbono e PEI

Têm sido descritos na literatura vários estudos com CDs e o polímero PEI com o objetivo de detetar compostos específicos. Zeng *et al.*¹⁰² funcionalizaram CDs com PEI para aplicar como nanosensores fluorescentes com a finalidade de detetar de uma forma simples e seletiva a 6-tioguanina (6-TG), um medicamento anticancerígeno. Também Sen *et al.* complexaram o PEI e os CDs para sintetizar um nanomaterial fluorescente, para a deteção do 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), um composto tóxico e mutagénico perigoso, e prejudicial à saúde humana, à vida selvagem e ao meio ambiente.¹⁶⁰ Ren *et al.* relatam um método eficiente para a deteção de nitrito em vegetais e água utilizando CDs revestidos com PEI.¹⁵⁹

Outras investigações foram realizadas com a finalidade de avaliar a entrega de genes através de um nanosistema CDs/PEI. Em 2012, Liu *et al.* relataram um nanosistema híbrido baseado em CDs sintetizados através da pirólise assistida por micro-ondas, tendo como precursor a glicose, e posteriormente funcionalizado com o PEI. O objetivo foi avaliar a eficácia de transfeção de DNA do nanosistema em células renais de macaco (COS-7) e células do carcinoma hepatocelular humano (HepG2).¹⁰³ Já Thakur *et al.*¹⁷⁶, sintetizaram CDs fluorescentes híbridos com quitosano-PEI 25 kDa (CP25-CDs) e quitosano-PEI 2 kDa (CP2-CDs) para entrega direcionada de pDNA e miRNA em células de adenocarcinoma pulmonar (A549) e carcinoma mamário humano (MDA-MB-231).

Bu *et al.*, sintetizaram CDs com ácido ascórbico utilizando o método de pirólise assistida por micro-ondas e funcionalizaram-nos com PEI. A finalidade deste nanosistema era transportar o miR-2861 para células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMSCs) e aí promover a diferenciação osteogénica. Os resultados indicaram o sucesso da transfeção deste nanoplexo e a sua baixa citotoxicidade.¹⁷⁷

Kong *et al.*, desenvolveram um sistema baseado nos CDs modificados com o aptâmero de DNA AS1411 com PEI direcionado para células cancerígenas com expressão elevada de nucleolina. Os resultados mostraram que o nanossistema CDs-PEI-AS1411 possuía maior eficiência de internalização em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) do que em fibroblastos de ratos (L929). Para células cancerígenas MCF-7, a alta afinidade entre o AS1411 e o recetor de nucleolina relevante levou à libertação

do aptâmero, e a carga superficial do nanossistema aumentou ao mesmo tempo, resultando em maior internalização celular.¹¹⁷

6. Objetivos gerais da Tese

Neste trabalho, o objetivo central foi promover a diferenciação osteogénica de células estaminais mesenquimais humanas (hMSC), com recurso à terapia génica, para potenciais aplicações na estimulação da regeneração óssea. Para isso, foi desenvolvido um nanomaterial híbrido baseado em pontos de carbono (CDs) e PEI (polietilenimina), concebido como um sistema não viral de entrega de genes.

A estratégia adotada visou dotar os CDs de uma carga catiónica suficiente positiva para interagir de forma eficiente com o plasmídeo de DNA (pDNA) codificante da BMP-2 (proteína morfogénica óssea 2). Com este sistema, o objetivo foi garantir o transporte seguro do pDNA até o local-alvo nas hMSCs onde, no núcleo, a expressão do gene da BMP-2 é promover a indução de fatores de transcrição e a expressão de genes de diferenciação osteogénica precoce e tardia.

Assim, os objetivos específicos do estudo foram os seguintes:

- Amplificar em bactérias e purificar o DNA plasmídico codificante dos genes a entregar nas células;
- Sintetizar os CDs pelo método hidrotérmico, utilizando o ácido ascórbico como precursor; ainda, caracterizar os CDs obtidos por técnicas físico-químicas adequadas;
- Preparar e caracterizar os nanossistemas CDs/PEI (nanoplexos), para isso usando diferentes razões CDs:PEI (1CDs/1PEI (mix1), 1CDs/2PEI (mix2) e 1CDs/4PEI (mix4));
- Avaliar a compactação do pDNA e a neutralização da carga alcançada após interação com os nanoplexos (obtenção de poliplexos);
- Avaliar a citotoxicidade dos nanoplexos CDs/PEI e poliplexos CDs/PEI/pDNA;
- Otimizar a transfeção levada a cabo pelos poliplexos *in vitro* em células HEK 293T (células de rim embrionário humano) utilizando um pDNA codificante dos genes repórteres proteína verde fluorescente (EGFP) e luciferase (pEGFP/Luc);

- Utilizar o nanosistema CDs/PEI como sistema de entrega de genes para transfeção em hMSCs com pDNA codificante de BMP-2 e avaliar, qualitativa e quantitativamente, os parâmetros de diferenciação osteogénica.

CAPÍTULO II – Secção experimental

1. Amplificação, extração e quantificação de pDNA | Síntese de CDs e preparação de nanoplexos | Estudos de caracterização e compactação do pDNA

Existem vários métodos de síntese para obter CDs. Neste trabalho, a abordagem sintética para a preparação de CDs será pelo método hidrotérmico (sob pressão e temperaturas elevadas), utilizando o ácido ascórbico como precursor e a água como solvente.

Para caracterizar os CDs sintetizados assim como o seu precursor e os nanoplexos (CDs/PEI), foram utilizadas várias técnicas como: Espalhamento dinâmico da luz/Espalhamento eletroforético da luz (DLS/ELS), Espectroscopia de radiação Infravermelha com transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear (RMN) e espectroscopia UV-Vis e de fluorescência.

1.1. Materiais e reagentes

Neste trabalho foram utilizadas bactérias *E. coli* transformadas, separadamente, com dois pDNA, o pEGFP_{Luc} (6.4 kb) que codifica os genes da proteína verde fluorescente e luciferase (e resistência à canamicina) e o pcDNA3.1/Hist⁺/hBMP2 vector/plasmid (8.5 kb, pBMP-2) (gentilmente doado pelo Prof. Yasuhiko Tabata, Universidade de Kyoto, Japão) que codifica o gene da BMP-2 (e resistência à ampicilina). As bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB broth).

Nesta primeira parte experimental, foi utilizado ácido ascórbico (pureza=99%) adquirido da TCI Chemicals, membrana de diálise de éster de celulose (MWCO 100-500Da) adquirida da SpectrumLabs, água ultrapura purificada pelo sistema de purificação Millipore MilliQ com resistividade superior a 18.2 MΩ cm, kit de extração de pDNA PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep, PBS (constituído por 1,37M de NaCl, 27mM KCl, 100mM Na₂HPO₄ e 18mM KH₂PO₄ fornecidos pela Thermo Fisher Scientific), tampão Tris-EDTA (TE), tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), dimetilsulfóxido (DMSO), Polietilenimina (PEI) ramificado de 25kDa (Sigma), agarose RA™ (VWR), Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), EZ-Vision® Two (Amresco), Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Reagent (Invitrogen).

Diversos equipamentos foram utilizados nomeadamente, espectrofotómetro NanoDrop One Microvolume (ThermoScientific), Shaker Heidolph Unimax 1010, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), Sistema de liofilização Labconco Freeze Zone 4.5L, Espectofotómetro de Fourier transformada de infravermelho acoplado com um sistema de refletância total atenuada (ATR) da PerkinElmer. Espectrofotómetro de fluorescência (LS55) da Perkin-Elmer, espectrofotómetro UV-Vis (Lambda 25) da Perkin-Elmer, 400 MHz NMR (UltraShield™ 400 Plus ULTRA LONG HOLD) da Bruker, Nuair H Autoflow CO₂ Air-Jacketed Incubator, Ultra-freezer (-86°C) da Sanyo MDF, Freeze-Dryer (RVT400, -55 °C), leitor de microplacas (Victor3) da Perkin-Elmer, Centrifuga Sigma 3K30 e o Azure 400 Gel documentation da Azure Biosystems.

1.2. Amplificação, extração e quantificação de pDNA

A primeira etapa deste trabalho experimental correspondeu à obtenção de pDNA para posterior transfeção. Para isso, dois pDNA, o pEGFP_{Luc} e o pBMP2, foram extraídos separadamente, seguindo o mesmo procedimento. As bactérias *Escherichia coli* (E. Coli) transformadas, foram inoculadas a 37°C, em meio LB-agar e antibiótico (100 µg/mL canamicina e 50 µg/mL ampicilina, para pEGFP_{Luc} e pBMP2, respetivamente). Após 24h, as colónias de bactérias foram selecionadas e colocadas durante 18h a crescer em meio LB, a 37°C, 150 rpm. Posteriormente o pDNA foi extraído e purificado utilizando um kit de purificação Pure Link HiPure, seguindo o procedimento recomendado pelo fornecedor. A concentração e a pureza dos pDNA extraídos foram determinadas com o espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop One Microvolume UV-Vis).

1.3. Síntese de CDs

A síntese dos CDs foi realizada através do método hidrotérmico com o ácido ascórbico como precursor de acordo com Martins *et al.*¹³⁶. Dissolveu-se 500mg de ácido ascórbico em 10mL de água ultrapura. Esta solução incolor foi colocada num reator de aço inoxidável de Teflon num banho de óleo a 200°C durante 5h (**Figura 16**). Após as 5h, o reator arrefeceu à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução castanha com odor característico a caramelo contendo CDs foi centrifugada (45000xg, 30min) e o sobrenadante obtido foi depois submetido à diálise com uma membrana de 100-500Da,

durante 4 dias para remover pequenas moléculas fluorescentes livres geradas durante o processo de síntese. Por último, a solução resultante da diálise foi novamente centrifugada (45000xg, 30min) para isolar as partículas insolúveis da solução de CDs. Finalmente, a solução obtida foi liofilizada durante 72h e armazenada a 4°C para posterior caracterização.

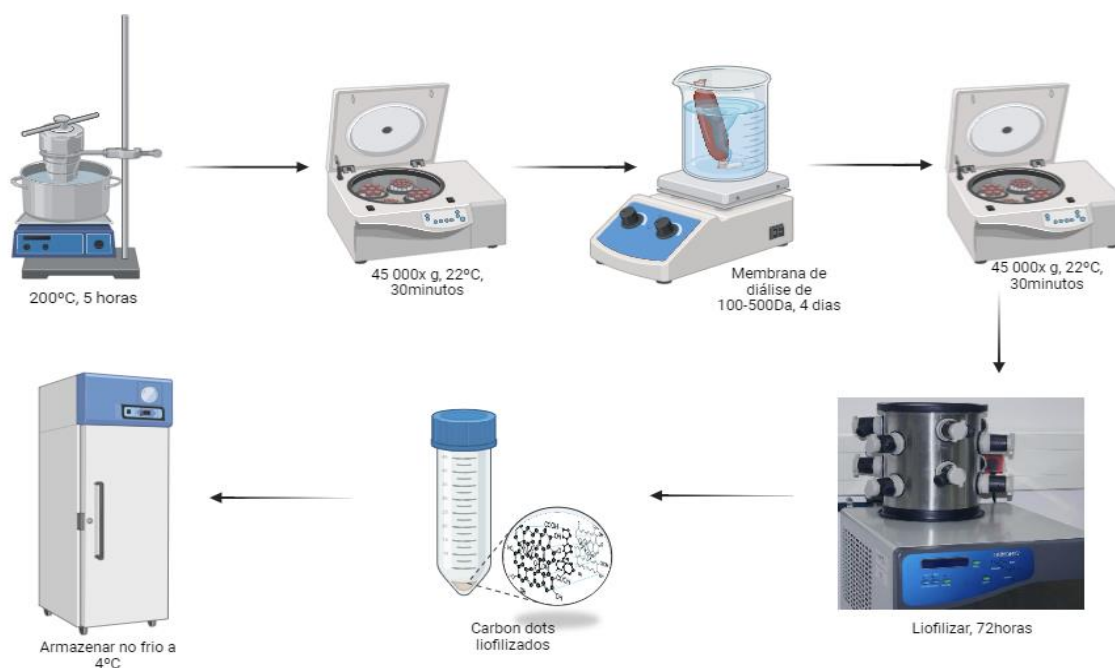


Figura 16. Resumo esquemático da síntese dos CDs.

1.4. Preparação dos nanoplexos CDs/PEI

Uma solução de PEI (8mg/mL em água ultrapura filtrada) foi mantida em banho-maria a 40°C durante 24h. Após este tempo, misturou-se a solução de PEI com uma solução de CDs (2mg/mL em água ultrapura filtrada), a diferentes razões de massa 1CDs/1PEI (mix1), 1CDs/2PEI (mix2) e 1CDs/4PEI (mix4), e deixou-se sob agitação à temperatura ambiente (22°C) durante 5h. Posto isto, as soluções dos nanoplexos CDs/PEI foram liofilizadas durante 72h e de seguida armazenadas a 4°C para posteriores testes de caracterização.

1.5. Caracterização

1.5.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear (RMN)

Para analisar o produto de partida dos CDs (ácido ascórbico) e o produto final (CDs), foram adquiridos espectros de RMN (^1H e ^{13}C), utilizando um equipamento de RMN de 400MHz (UltraShield 400 plus ULTRA LONG HOLD) da Bruker. Cerca de 20mg de amostra foram dissolvidas em 500 μL de DMSO- d_6 e foram obtidos um espectro de ^{13}C e um de ^1H de cada amostra. Os espectros foram tratados com o software TopSpin versão 3.6.5.

1.5.2. Espectroscopia de radiação Infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR permite obter uma análise qualitativa da amostra com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes na superfície das partículas.¹⁶⁶ Para isso, foi colocado cerca de 2mg de cada nanoplexo CDs/PEI (previamente liofilizados) no equipamento FTIR espetrofotômetro Spectrum Two (PerkinElmer) acoplado a um acessório de refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram adquiridos usando uma faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

1.5.3. Espalhamento dinâmico da luz/Espalhamento eletroforético da luz (DLS/ELS)

Para analisar o tamanho hidrodinâmico, assim como o potencial zeta dos nanoplexos CDs/PEI e dos CDs e PEI individualmente, através do DLS/ELS, prepararam-se as soluções (em triplicado) a uma concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizando o PBS (previamente filtrado) como solvente. Após a preparação das amostras, homogeneizou-se no vórtex e colocou-se a incubar por 20 min, à temperatura ambiente (22°C). Por fim, mediu-se o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta dos poliplexos em estudo, usando um Zetasizer Nano Z (Malvern Panalytical).

1.5.4. Espectroscopia UV-vis e Fluorescência

Para determinar as propriedades óticas dos CDs e PEI, assim como confirmar a interação bem-sucedida dos nanoplexos CDs/PEI, procedeu-se à caracterização por espectroscopia UV-vis e de Fluorescência com cuvette de quartzo com caminho ótico de 1cm. As soluções de CDs, PEI e dos nanoplexos CDs/PEI foram preparadas a uma concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, utilizando a água ultrapura filtrada como solvente. Os

espectros de absorção UV-Vis foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-Vis (Lambda) da PerkinElmer na gama de comprimento de onda de 200-550nm. Os espectros de fluorescência foram obtidos através de um espectrofotômetro de fluorescência (LS55) da PerkinElmer. A faixa de comprimentos de onda de excitação utilizada foi de 300 a 560nm com espaçamento de 20nm. A velocidade de obtenção do espectro foi ajustada a 200nm/min.

1.6. Estudo da compactação do pDNA

Com o objetivo de estudar a capacidade dos nanoplexos CDs/PEI neutralizarem e condensarem o pDNA, realizaram-se três ensaios: DLS/ELS, eletroforese em gel de agarose e ensaio do PicoGreen®. Para isso, foram testados diferentes razões N/P para os três mix preparados anteriormente, assim como o PEI de forma isolada como referência. As razões N/P em estudo representam o número de moles de grupos amina do PEI e números de moles de grupos fosfato do pDNA. As razões N/P testadas foram N/P2,5, N/P5, N/P7,5, N/P10, N/P15 e N/P20, representadas na **Tabela 2**. Para cada ensaio, os diferentes componentes da mistura foram adicionados na seguinte ordem: pDNA – mix (CDs/PEI) – solvente (PBS) num volume total de 1mL para cada condição em triplicado. O vórtex foi utilizado para homogeneizar a solução e incubou-se durante 20 minutos à temperatura ambiente (22°C).

Tabela 2. Preparação de complexos de pDNA com os diferentes nanoplexos CDs/PEI, a razões N/P variáveis, considerando 1µg de pDNA.

		CDs/PEI (m/m)			PEI massa (µg)
		massa (µg)			
		MIX1 (1:1)	MIX2 (1:2)	MIX4 (1:4)	
Razão N/P	N/P2,5	1,9	1,4	1,2	1,0
	N/P5	3,8	2,8	2,4	1,9
	N/P7,5	5,7	4,3	3,6	2,8
	N/P10	7,6	5,7	4,7	3,8
	N/P15	11,4	8,5	7,1	5,7
	N/P20	15,2	11,4	9,5	7,6

1.6.1. DLS/ELS

Com uma solução de CDs/PEI a uma concentração de 200µg/mL (para todos os mix), PEI e CDs individualmente a 200µg/mL e pDNA a 0.1µg/µL, os complexos foram preparados em triplicado e num volume final de 1mL, nas diferentes razões N/P de acordo com a **Tabela 2**. Foi utilizado o PBS como solvente. Determinou-se o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta dos poliplexos em estudo, usando um Zetasizer Nano Z (Malvern Panalytical).

1.6.2. Eletroforese em gel de agarose

Para estudar a neutralização da carga negativa do pDNA mediante a interação com os nanoplexos em estudo, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose. Para isso, foram preparados os poliplexos CDs/PEI/pDNA de acordo com a **Tabela 2**. A eletroforese foi efetuada com um gel de agarose (1%) com tampão TAE (1x) como tampão de corrida, com um ladder de DNA e com um marcador para visualização de bandas no gel – o reagente EZ-Vision. A corrida da eletroforese deu-se até o marcador ter percorrido cerca de 75% do gel (cerca de 1 hora), a 80 mV. Após terminada a eletroforese, usou-se o Azure 400 Biosystems™ para a revelação do gel.

1.6.3. Ensaio do PicoGreen®

A capacidade das diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI de condensar o pDNA foi avaliada pelo ensaio do PicoGreen®. Cada solução foi preparada a uma concentração de 200µg/mL CDs/PEI e 0.1µg/µL pDNA. Neste ensaio foram selecionadas as razões N/P de N/P7,5, N/P10 e N/P15, de acordo com a **Tabela 2**. As soluções foram preparadas em triplicado, e adicionou-se Tris-EDTA (TE) para completar um volume final de 100µL.

Após a preparação dos complexos, os 100µL dos complexos foram transferidos para uma placa opaca de 96 poços e adicionou-se a solução de PicoGreen® (previamente diluída 200x em tampão TE). Leu-se a intensidade de fluorescência em cada poço a 535nm num espectrofotómetro de fluorescência (Perkin Elmer Victor 3 Multilabel Reader).

2. Estudos *in vitro* de viabilidade celular e de entrega da proteína verde fluorescente (EGFP), em células HEK293T e hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI

2.1. Cultura de Células HEK293T e hMSCs

As células 293 do rim embrionário humano (HEK293) são células HEK que foram transformadas pela exposição a fragmentos de DNA de adenovírus tipo 5. São facilmente cultivadas em suspensão celular sem soro, dividem-se rapidamente, são facilmente transfetadas e altamente eficientes na produção de proteínas.¹⁷⁸ Esta linha celular (HEK293T) expressa o antígeno T que permite a replicação de plasmídeos tornando-se capaz de expressar vários tipos de genes de vetores virais para uso na terapia gênica.^{178,179}

O crescimento e proliferação destas células em laboratório faz uso de meio de cultura D-MEM, com todos os nutrientes necessários como aminoácidos e vitaminas, assim como a sua suplementação com 10% soro e 1% antibiótico/antimicótico. O soro contém fatores de crescimento, que promovem a proliferação e fatores de adesão e atividade antitripsina, que promovem a fixação celular, sendo também uma fonte de minerais, lípidos e hormonas. Por outro lado, os antibióticos/antimicóticos evitam e reduzem a ocorrência de contaminações por bactérias e fungos.

Relativamente às hMSCs, descritas no capítulo I, são células estaminais adultas com elevada capacidade de proliferação e diferenciação celular.² A sua cultura é geralmente realizada com os meios basais *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (D-MEM) com baixo teor em glucose ou *α -modified Minimum Essential Eagle's Medium* (α -MEM) com ou sem fatores de crescimento, suplementados com 10-20% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico/antimicótico.^{67,180} Como abordado no capítulo I, estas são células delicadas de colocar em cultura e promover a sua diferenciação, pelo que têm que ser tratadas cuidadosamente com tratamentos específicos como a adição de dexametasona em combinação com β -glicerofosfato e ácido ascórbico.⁴⁵ Também é importante ter em conta o número da passagem a utilizar, uma vez que segundo a literatura, as capacidades das hMSCs começam a diminuir a partir da passagem 6.¹⁸¹

2.2. Plasmídeo EGFP e estudos de transfeção

O plasmídeo utilizado nesta fase de otimização para transfetar as células HEK293T e as hMSCs foi o pEGFPLuc que codifica a proteína verde fluorescente melhorada (EGFP) e a luciferase (Luc), **Figura 17**. A escolha deste plasmídeo nesta fase inicial do trabalho com células, prendeu-se pelo facto deste codificar a EGFP, que permite a verificação imediata da eficiência de transfeção através da microscopia de fluorescência.

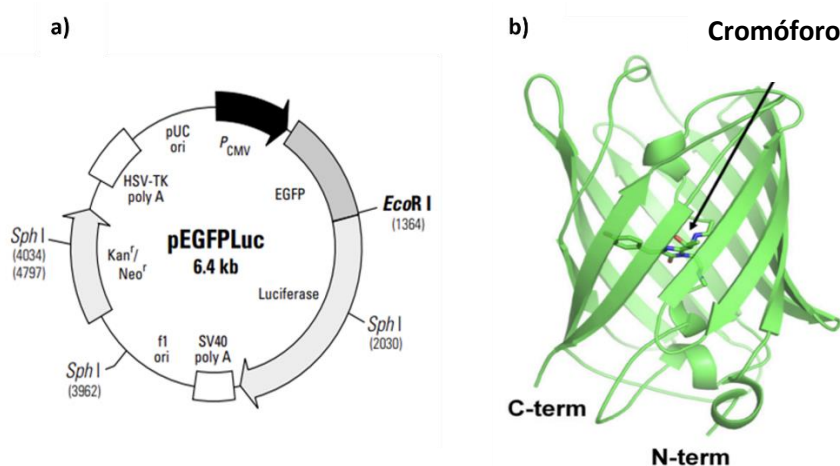


Figura 17. Plasmídeo pEGFPLuc. **a)** Plasmídeo pEGFPLuc com tamanho de 6.4kb.¹⁸² **b)** Estrutura cristalina da proteína verde fluorescente.(Adaptado: Nam *et al.*¹⁸³)

O vetor pEGFPLuc é um plasmídeo que contém um promotor forte que impulsiona a expressão do gene de interesse, nomeadamente o gene da EGFP e da Luc.¹⁸⁴ Este plasmídeo, contém também um gene que produz uma proteína que confere resistência às bactérias (e células) ao antibiótico canamicina.¹⁸²

A EGFP e Luc são dois tipos de proteínas repórter, que apresentam estabilidade em diferentes condições, intensidade acentuada e meia vida longa, utilizadas para estudos *in vivo* e imagens de células vivas.¹⁸⁵

A GFP apresenta muitas variantes, que foram sendo desenvolvidas para melhorar a sua fluorescência, sendo uma delas a EGFP. A EGFP é uma proteína verde fluorescente melhorada muito utilizada na investigação e utilizada neste trabalho. Ao contrário das outras proteínas repórter bioluminescentes, esta não precisa de substrato ou cofator, e emite luz verde quando é excitada por uma luz azul, apresentando um máximo de excitação de 488nm e um máximo de emissão de 507nm. No entanto, a sua fluorescência

pode sofrer interferência pela sua autofluorescência e a interação com alguns órgãos internos diminuem a sua sensibilidade.^{185–187}

A Luc é uma melhor proteína repórter devido à maior sensibilidade e ausência de autofluorescência. No entanto, é mais custosa, requer luciferina como substrato e é dependente de ATP e O₂ (**Figura 18**).¹⁸⁵

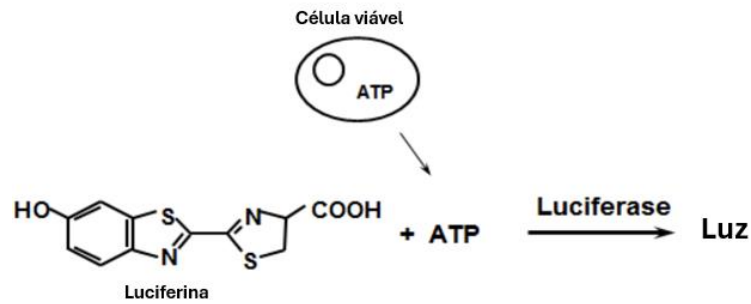


Figura 18. Representação esquemática do princípio do ensaio da luciferase. (Adaptado: Riss *et al.*¹⁸⁸)

Neste trabalho, a avaliação não foi só avaliada pela presença da EGFP, mas também pela atividade da luciferase por mg de proteína. Esta quantidade de proteína é obtida através do ensaio do ácido bicinconínico (BCA).

O ensaio do ácido bicinconínico (**Figura 19**) permite quantificar a quantidade de proteína total de uma determinada amostra através da redução de Cu²⁺ para Cu⁺ pela proteína, sob condições alcalinas. Este Cu⁺ forma um complexo com duas moléculas de BCA resultando na produção de uma cor púrpura intensa com absorvância máxima a 560nm. Uma vez que o conteúdo total de proteína é proporcional a este complexo, é possível proceder à quantificação de proteína com recurso a padrões de proteína conhecidos.^{189–191}

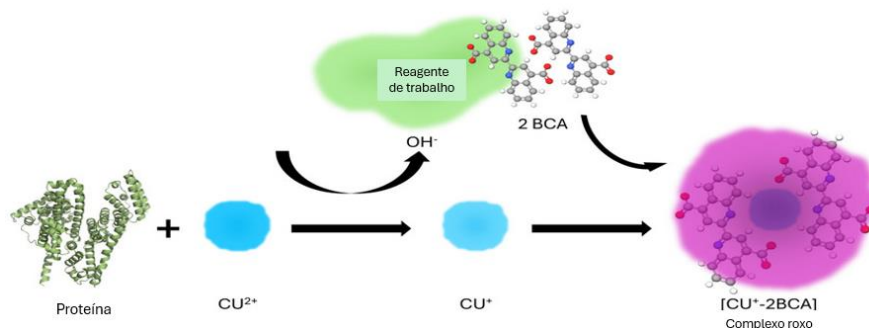


Figura 19. Representação esquemática do princípio do ensaio do BCA. (Adaptado: Smith *et al.*¹⁹²)

2.2.1. Estudos de viabilidade celular

Existem dois parâmetros importantes quando avaliamos as células, a vitalidade celular, que descreve a atividade fisiológica das células vivas na população e a viabilidade celular, que é definida como a percentagem de células vivas. Um ensaio de viabilidade celular deve ser seguro, rápido, confiável, eficiente e de baixo custo. Os ensaios que determinam a viabilidade celular são baseados em várias funções das células, incluindo atividade enzimática, permeabilidade da membrana celular, adesão celular, produção de ATP (adenosina trifosfato), produção de coenzima e atividade de captação de nucleótidos. Estes podem ser categorizados como, ensaios de exclusão de corantes, ensaios colorimétricos, ensaios fluorométricos, ensaios luminométricos e ensaios de citometria de fluxo.^{88,193,194}

Neste trabalho, a viabilidade celular foi avaliada pelo método da resazurina. Este pretende determinar a atividade metabólica das células viáveis avaliando os efeitos da exposição das células aos complexos preparados.

O método de redução da resazurina (**Figura 20**) assume que apenas as células viáveis são metabolicamente ativas e capazes de transformar resazurina em resorufina, um composto fluorescente.¹⁹⁵ Mais especificamente, a resazurina (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) que é um corante azul não fluorescente irá ser reduzida, na mitocôndria das células, a resorufina, um composto rosa com elevada fluorescência vermelha. Uma vez que apenas as células viáveis conseguem realizar este processo, devido à sua atividade metabólica ativa, então, apenas as células viáveis serão capazes de converter a resazurina em resorufina.^{193,196,197} Este é um método indireto para determinar a viabilidade celular e, assim, deduzir a citotoxicidade induzida pelos complexos às células cultivadas expostas.

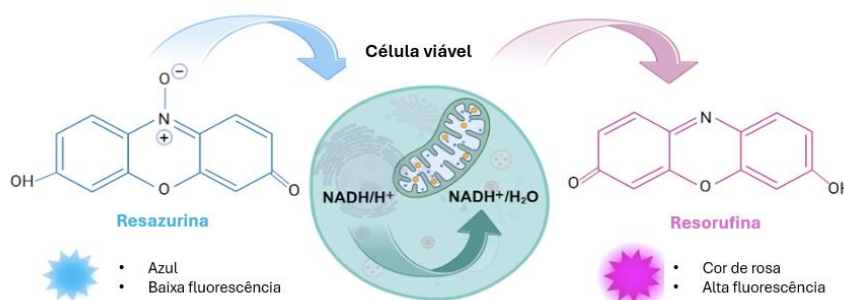


Figura 20. Representação esquemática da conversão da resazurina em resorufina. (Adaptado: Lavogina et al.¹⁹⁸)

Uma outra forma de quantificar a viabilidade celular é através do método direto por exclusão, que consiste na utilização do “trypan blue”, um corante que é internalizado pelas células quando a membrana da mesma se encontra comprometida.

2.3. Células, materiais e reagentes

Nesta secção do trabalho, foi utilizado um pDNA que codifica a EGFP e a enzima luciferase (pEGFPLuc, 6.4 kb) e são usadas as células HEK 293T e hMSCs para avaliar a expressão da EGFP e medir a atividade da luciferase. As células HEK293T foram adquiridas da empresa ATCC® ref: CRL-3216TM, e as hMSCs foram obtidas a partir de amostras de osso trabecular humano recolhidas durante intervenções cirúrgicas efetuadas no Hospital Dr. Nélio Mendonça (Funchal), na sequência de situações traumáticas.

Para ensaios de cultura celular é utilizado um meio celular DMEM para as células HEK293T e o meio α -MEM para as hMSCs, PBS (tampão salino fosfato) (Sigma-Aldrich), antibiótico/antimicótico (AA) (Gibco), FBS (soro bovino fetal) (Gibco), BSA (albumina bovina sérica) (Sigma-Aldrich), BCA (ácido bicinconínico) (Sigma-Aldrich), kit *Pierce Firefly Luciferase Glow Assay* (ThermoFisher), tripsina-EDTA, colagénio I (150 μ g/mL em 20mM de ácido acético) e resazurina (0.1mg/mL).

Alguns equipamentos foram utilizados como a centrífuga Sigma 3H30, Leitor de microplacas Victor3 (PerkinElmer), Microscópio Microhub Mica (Leica Microsystems), agitador orbital 1000 Heidolph, citómetro de fluxo ACEA– NovoCyte 3000.

2.4. Cultura celular

As células HEK293T e as hMSCs foram descongeladas e centrifugadas a 300xg por 8 minutos à temperatura ambiente (22°C) obtendo-se um “pellet” de células, o qual foi ressuspenso em 1mL de meio D-MEM e α -MEM suplementado com 10% de FBS e 1% AA (designado de meio completo), respetivamente. Foram cultivadas 3x10⁵ células numa placa de petri de 100mm com 10mL de meio completo e incubadas numa atmosfera humidificada a 5% CO₂ a 37°C (CO₂ Air - Jacketed Incubator). As células foram monitorizadas, com mudanças de meio até se atingir um mínimo de 80% de confluência.

Para estes ensaios de transfeção, foram utilizadas células HEK 293T passagens P40-P50 para as e células hMSCs nas passagens P5-P7.

Atingida a confluência, as células foram tripsinizadas. O meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS, adicionou-se 1mL de tripsina e incubou-se numa atmosfera humidificada a 5% CO₂, 37°C por 5 minutos. Posto isto, adicionou-se 2mL de meio completo para parar a ação da tripsina e determinou-se a viabilidade e a densidade celular a partir de uma suspensão celular com 0.2% de “trypan blue” com uma Câmara de Neubauer. As células foram cultivadas em placas de poços para os diferentes ensaios, sendo que as placas cultivadas com HEK 293T foram previamente preparadas com uma camada de colagénio (incubação dos poços com 100µL de solução de colagénio por 30min, seguida de lavagem em PBS) para promover a sua aderência à placa.

2.5. Estudo da atividade metabólica e transfeção em HEK 293T e hMSCs – Ensaio da atividade metabólica através da resazurina e expressão de EGFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

As células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 4×10^3 células/poço para as HEK 293T e 3×10^3 células/poço para as hMSCs, em 200µL de meio completo e colocadas numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ no ar a 37°C. Após 24h, os complexos foram preparados, de acordo com a **Tabela 3**, tendo em conta 0,2µg/poço e 20µL de complexos/poço (foram preparados complexos em excesso, para 10poços). O meio foi substituído por 180µL de meio (D-MEM ou α-MEM) completo e 20µL dos complexos foram adicionados a cada poço e as células foram incubadas por 48 horas. Como controlo positivo utilizou-se o PEI sem os CDs completando o restante com PBS. Como controlo negativo foram adicionados 20µL de PBS por poço com células sem a adição dos complexos. As células foram expostas durante 48h aos complexos. Posteriormente as células foram observadas usando um microscópio confocal sob um comprimento de onda de excitação de 450nm e de emissão de 500nm. Posto isto, as mesmas células foram utilizadas para o ensaio de viabilidade celular.

Tabela 3. Preparação de complexos de pDNA com os diferentes nanoplexos CDs/PEI, a razões N/P variáveis, considerando 2µg de pDNA por condição e num volume final de 200µL (suficiente para 10 réplicas) para avaliar a transfeção. Como solvente foi utilizado o PBS. Controlo – células com meio completo; Controlo negativo – Células em meio completo e PBS.

		CDs/PEI (m/m)			PEI (controles positivos)
		Massa (µg)			
		MIX1 (1:1)	MIX2 (1:2)	MIX4 (1:4)	
Razão N/P	N/P2,5	3,8	2,8	2,4	1,9
	N/P5	7,6	5,7	4,7	3,8
	N/P7,5	11,4	8,5	7,1	5,7
	N/P10	15,2	11,4	9,5	7,6
	N/P15	22,7	17,0	14,2	-
	N/P20	30,3	22,7	18,9	-

Para proceder ao ensaio de viabilidade celular através da redução da resazurina, o meio foi substituído por meio completo fresco contendo 10% (v/v) de uma solução de resazurina (0,1 mg/mL), seguida de incubação por 2h30. Em seguida, 100µL do meio reduzido foram transferidos para uma placa opaca de 96 poços e a fluorescência da resorufina foi medida num leitor de microplacas com um $\lambda_{ex}=530nm$ e $\lambda_{em}=590nm$. O meio incubado em poços sem células foi usado como branco em medições de fluorescência. Foram realizadas duas experiências independentes, cada condição com 8 réplicas. A atividade metabólica foi determinada pela equação:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = 100 \times \frac{F(\text{amostra}) - F(\text{branco})}{F(\text{controlo negativo}) - F(\text{branco})} \quad \text{Equação 1}$$

Onde, F representa os valores de intensidade de fluorescência determinados.

Após este ensaio, os 100µL de meio sobranes na placa com células foi removido. Adicionou-se 50µL de tampão de lise (1X) a cada poço e colocou-se as placas no congelador a -20°C para posterior quantificação da proteína total.

Para determinar a intensidade de fluorescência da EGFP nas células sujeitas aos poliplexos em estudo, realizou-se a técnica de citometria de fluxo. Neste ensaio foram cultivadas 5×10^4 células/mL e $3,7 \times 10^4$ células/mL, para HEK293T e hMSCs respetivamente, em placas de 24 poços e incubou-se a 5% de CO₂, 37°C por 24h. Posteriormente, o meio foi substituído por 900µL de meio completo e 100µL dos complexos preparados contendo 2µg de pEGFLuc/mL. Células com 100µL de PBS em vez dos complexos foram utilizadas para controlo negativo. Para controlo positivo foi adicionado apenas o PEI nas diferentes razões N/P sem os CDs de acordo com a **Tabela 3**. As células foram expostas durante 48h aos complexos. Após os quais, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 200µL de PBS e procedeu-se à tripsinização com 100µL de tripsina/poço. As placas foram incubadas durante 5min, 5% de CO₂, 37°C. Observou-se as células ao microscópio para garantir que estas se desagregaram e adicionou-se 200µL de meio completo a cada poço para parar a ação da tripsina. A suspensão celular foi homogeneizada e transferida para microtubos individuais e centrifugados durante 5min, 300xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ressuspendeu-se o *pellet* em 200µL de PBS. As suspensões celulares foram transferidas para uma placa transparente de 96 poços e analisadas num citómetro de fluxo (ACEA – NovoCyte) com estação de fluídos e amostrador automático. Para cada amostra foram recolhidos 10.000 eventos. O *gate* e o nível de fluorescência positiva foi definido com software NovoExpress 1.2.1, considerando as células expostas ao tampão PBS como controlo negativo. Os resultados estão expressos em intensidade de fluorescência em cada uma das condições estudadas.

2.6. Estudo da expressão do gene da luciferase em HEK 293T e hMSCs

Para medir a expressão do gene da luciferase e conseqüentemente obter o valor da eficiência de transfeção das células, foi realizado o ensaio da luciferase. Este ensaio permite medir a quantidade do gene repórter e assim inferir sobre a eficiência de transfeção. Para isso foi utilizado o kit *Pierce Firefly Luciferase Glow Assay* para analisar a atividade da luciferase nas células transfetadas. Assim sendo, das placas descongeladas com os lisados celulares (utilizadas para a quantificação da proteína total) transferiram-se 10µL de cada amostra em estudo para uma placa opaca de 96 poços, adicionou-se 50µL de solução de trabalho de substrato de luciferase (de acordo com o fabricante) e

incubou-se durante 10 minutos. Mediu-se a luminescência num leitor de microplacas a 560nm.

Para determinar a quantidade de proteína e assim concluir sobre a atividade da luciferse/mg de proteína, procedeu-se ao ensaio de BCA. Deste modo, usou-se um kit de ensaio ácido bicinconínico e albumina bovina sérica (BSA) como standard de acordo com o fabricante. Primeiramente, preparou-se uma reta de calibração de BSA com 6 diluições seriadas, em triplicado, a partir de uma solução stock de BSA (10mg/mL), (**Anexos - Figura A. 6**). As placas com os lisados celulares foram descongeladas e transferiram-se 10µL de cada poço, assim como cada ponto da reta para uma placa transparente de 96 poços, onde, por fim, foram adicionados 200µL de reagente de BCA a cada poço. Posto isto, deixou-se as amostras a incubar a 37°C, durante 1h e leu-se a absorvância num leitor de microplacas, a 550nm.

Posteriormente estes valores foram tratados e divididos por mg de proteína total (valores obtidos no ensaio de BCA) obtendo-se resultados de atividade da luciferase relativamente à quantidade de proteína total (RLU/mg proteína).

3. Estudos *in vitro* da viabilidade celular e de entrega de gene codificante da BMP-2, em hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI para indução da diferenciação osteogénica

3.1. Plasmídeo da BMP-2

Como referido no Capítulo I, as BMPs são um grande grupo de proteínas de sinalização que desempenham um papel crucial na formação e regeneração óssea, sendo que, especificamente, a BMP-2 possui forte atividade indutora do processo de regeneração óssea.^{38,46} Para estudar este efeito e para fins de formação óssea, o gene da BMP-2 pode ser introduzido num DNA plasmídico. Tal como todos os outros plasmídeos, este apresenta um gene que confere resistência a antibióticos, que neste caso é a resistência à canamicina, que auxilia no processo de seleção das bactérias.¹⁹⁹

A transfeção de células com o plasmídeo com o gene codificante da BMP-2 tem sido reportado em diversos estudos, onde a expressão da BMP-2 leva à indução da osteogénese (**Figura 21**). A sua expressão despoleta uma cadeia de eventos de expressão de fatores de transcrição e uma sucessiva cascata de expressão de genes precursores da osteogénese precoces numa fase inicial como o RUNX2 e a fosfatase alcalina por exemplo. Com o progredir da osteogénese, genes tardios da osteogénese são expressos como o caso da osteocalcina, por exemplo.³⁸

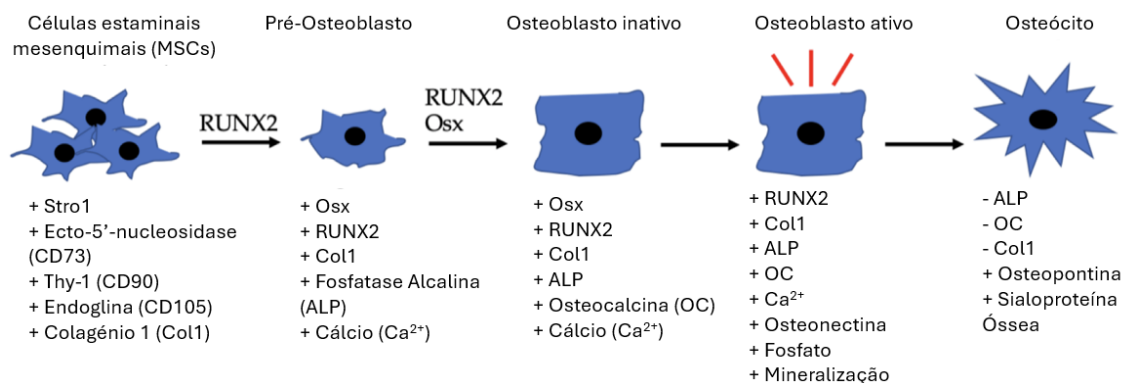


Figura 21. Diferenciação de MSCs em osteoblastos impulsionada por BMP-2, juntamente com os outros fatores listados. (Adaptado: Halloran *et al.*³⁸)

3.2. Materiais e reagentes

O plasmídeo utilizado nesta última fase do trabalho, em que o objetivo é promover a diferenciação osteogénica em células mesenquimais, é o plasmídeo que codifica o gene da BMP-2 (pcDNA3.1/Hist⁺/hBMP2).²⁰⁰

Nesta etapa do trabalho apenas foram utilizadas hMSCs para estudar a diferenciação utilizando o plasmídeo da BMP-2. A cultura celular foi realizada seguindo a descrição anterior e utilizando o meio completo α -MEM.

Para a cultura celular é usado um meio celular α -MEM, PBS (tampão salino fosfato) (Sigma-Aldrich), antibiótico/antimicótico (AA) (Gibco), FBS (soro bovino fetal) (Gibco), BSA (albumina bovina sérica) (Sigma-Aldrich), BCA (ácido bicinconínico) (Sigma-Aldrich), tripsina-EDTA. Vários reagentes são também utilizados como a resazurina (0.01mg/mL), glutaraldeído 1,5% (v/v) (Sigma), dexametasona (Sigma), β -glicerofosfato (Sigma) e ácido ascórbico (C₆H₈O₆) (Sigma), ácido clorídrico 37% (HCl) (PanRec), hidróxido de amónio 32% (NH₄OH) (VWR), *Alizarina Red S sodium salt* (C₁₄H₇O₇SNa) (Alfa Aesar), tampão Tris 0,1 M (Fisher Bioreagents), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (Fisher Bioreagents), *fast blue RR salt* (Sigma), *Phosphatase substrate* - naftilfosfato de sódio (Sigma), Etanol 96%, 1-naphthyl phosphate disodium (Sigma), cloreto de magnésio (MgCl₂) (Riedel-de Haen), carbonato de sódio (Na₂CO₃), Hidróxido de sódio (NaOH) (Fisher Bioreagents), Nitrato de prata (AgNO₃) (Alfa Aesar) e Tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) (Sigma-Aldrich).

Alguns equipamentos foram utilizados como a centrífuga Sigma 3H30, Leitor de microplacas Perkin Elmer Victor 3, Microscópio Microhub Mica (Leica Microsystems), incubadora 1000 Heidolph.

3.3. Estudo da diferenciação osteogénica

Para o estudo da diferenciação osteogénica em hMSCs, as células foram descongeladas e, após confluência, foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços a uma densidade de 5 500 células/cm² com 0,5mL de meio de cultura completo (para os estudos de diferenciação, foram sempre utilizadas células em passagem P2 e P3). Após 24h, o meio de cultura foi substituído por 450 μ L de meio de cultura fresco e 50 μ L de solução dos diferentes poliplexos em estudos, conforme a **Tabela 4**. Após 48h, os poliplexos foram removidos, as células foram lavadas com PBS e adicionado meio de cultura completo fresco suplementado com 5 mM β -glicerofosfato e 250 μ M ácido

ascórbico. Para o controlo de diferenciação (células sem adição de poliplexos), o meio de cultura fresco com β -GP, ácido ascórbico e 1 nM de DEXA. Para o controlo negativo foram cultivadas células em meio de cultura completo (sem adição de poliplexos nem suplementos indutores). Controlos adicionais foram considerados, onde células foram expostas aos nanoplexos CDs/PEI e PEI (sem pBMP2 nem suplementos indutores). As culturas foram mantidas a 37°C e 5% CO₂ durante 7, 14 e 21 dias renovando o meio de cultura três vezes por semana. Para este ensaio apenas foram realizadas as razões apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4. Preparação de complexos de pDNA com os diferentes nanoplexos CDs/PEI, a razões N/P variáveis, considerando 1 μ g de pDNA, estudadas para a diferenciação das hMSCs.

		CDs/PEI (m/m)			PEI massa (μ g)
		massa (μ g)			
Razão N/P		MIX1 (1:1)	MIX2 (1:2)	MIX4 (1:4)	
N/P7.5		-	-	-	2.8
N/P10		7.6	5.7	4.7	-
N/P15		11.4	8.5	7.1	-

3.4. Avaliação da atividade metabólica

Para avaliar a atividade metabólica das células e, conseqüentemente, concluir sobre a sua viabilidade celular, foi utilizado o método de redução da resazurina. Para este ensaio as células, cultivadas em placas de 48 poços e expostas aos diferentes complexos, nas condições anteriormente descritas, foram analisadas nos dias 7, 14 e 21 após a exposição aos complexos de transfeção.

Nos dias selecionados para avaliação, o meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura completo contendo resazurina, a concentração final de 0,1 mg/mL, e incubou-se durante 3 h, a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, foram transferidos 100 μ L de cada poço para uma placa opaca de 96 poços e efetuada a leitura da fluorescência da resorufina ($\lambda_{excitação}=530nm$, $\lambda_{emissão}=590nm$) no leitor de microplacas. Para o branco foram medidos poços contendo meio de cultura com resazurina, mas sem contacto com células. A percentagem de atividade metabólica foi determinada através da **Equação 1**.

3.5. Avaliação histoquímica – Ensaio qualitativos

Células para caracterização histoquímica foram preparadas em placas de cultura celular de 48 poços e expostas às condições anteriormente descritas foram analisadas

após 7, 14 e 21 dias em cultura. As culturas foram fixadas com glutaraldeído 1,5% (v/v) preparado em PBS por 20 min e depois lavadas com água destilada.

Após os devidos procedimentos de coloração, todas as amostras coradas foram examinadas e fotografadas usando o Microscópio Microhub Mica (Leica Microsystems).

- **Coloração para a presença de ALP**

Para detetar histoquimicamente a presença de ALP, o método utilizado baseou-se na hidrólise do naftilfosfato de sódio pela ALP e consequente precipitação do fosfato libertado por reação com um sal diazónico, formando um produto corado. Amostras com atividade ALP apresentaram coloração amarela, castanha ou preta consoante a quantidade de ALP presente da amostra.²⁰¹ Assim, às culturas fixadas anteriormente adicionaram-se, em cada poço da placa de 48 poços, 100µL de uma solução preparada em tampão Tris 0,1 M, pH 10, contendo 2 mg/mL de naftilfosfato de sódio e 2 mg/mL de “*fast blue RR salt*” e incubou-se no escuro durante 60min. Findo este tempo, a reação foi interrompida com a adição e lavagem de cada poço com água ultrapura.

- **Coloração para a presença de depósitos de cálcio**

Para a coloração dos depósitos de cálcio foi utilizada a alizarina vermelha, composto que é considerado o padrão ouro para a deteção e quantificação de mineralização, e que, ao reagir com catiões de cálcio através de um processo de quelação resulta numa coloração vermelha.⁵² Para isso, as amostras anteriormente fixadas foram cobertas com uma solução de alizarina vermelha a 1% p/v em NH₄OH a 0,28% v/v, pH 6,4, durante 2 min, sendo de seguida lavadas com água ultrapura. Posteriormente, foram passadas por etanol ácido (lavagem <15s) e lavadas novamente com água ultrapura.

- **Coloração para a presença de depósitos de fosfato**

Para a identificação de depósitos fosfato foi utilizado o método de *von Kossa*. Este consiste em duas etapas: o nitrato de prata reage com depósitos de fosfato de cálcio resultando numa cor amarelada, sendo este depois reduzido a prata metálica através da radiação UV deixando os depósitos de fosfato com uma coloração preta.²⁰²

Assim, às amostras anteriormente fixadas, foi adicionada uma solução aquosa de 2.5% v/v de nitrato de prata e incubadas a radiação UV durante 60 min. De seguida, as

amostras foram lavadas com água ultrapura e recobertas com solução de 5% de tiosulfato de sódio, durante 2 min, sendo novamente lavadas com água ultrapura.

3.6. Avaliação bioquímica – Ensaio quantitativo

Amostras para a avaliação bioquímica foram preparadas em placas de cultura celular de 48 poços e expostas aos complexos, de acordo com o anteriormente descrito, analisadas após 7, 14 e 21 dias em cultura. Primeiramente, o meio de cultura dos poços foi removido e lavou-se duas vezes com tampão PBS. Adicionaram-se 50µL de Triton X-100, a 0,1% (v/v) e as placas foram colocadas a -20°C para posterior análise.

- **Atividade da fosfatase alcalina (ALP)**

A atividade da ALP foi quantificada através da hidrólise de p-nitrofenilfosfato dissódico a p-nitrofenol (amarelo). Após a lise celular com a adição do Triton X-100 e congelamento da placa, transferiu-se 20µL dos lisados de cada poço para uma placa de 96 poços transparente e adicionou-se 200µL da solução de substrato (solução de 2 mM p-nitrofenilfosfato em tampão alcalino, pH 10, contendo 15 mM de MgCl₂) e incubou-se a 37°C, no escuro, durante 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 10µL de 0,02M NaOH. Leu-se a absorvância das amostras a 405nm no leitor de microplacas.

A atividade da ALP foi quantificada com recurso a uma reta de calibração obtida através de diluições seriadas de p-nitrofenol (**Anexos - Figura A. 9**). Os resultados foram normalizados em relação à proteína total dos lisados celulares. Os resultados são expressos como nmol de p-nitrofenol produzido por minuto e por mg de proteína.

Para se obter a quantidade de proteína (em mg) e desta forma, se procede à normalização da atividade de ALP, foi realizado o ensaio do BCA. A quantidade de proteína nos lisados celulares foi determinada utilizando o ensaio de ácido bicinconínico (ensaio BCA) e albumina bovina sérica (BSA) como padrão. Primeiramente, preparou-se 6 diluições seriadas, em triplicado, com diferentes concentrações finais, a partir de uma solução stock de BSA (10mg/mL), com o objetivo de obter uma reta padrão da proteína total do BSA (**Anexos - Figura A. 10**). No caso das amostras, foram transferidos 10µL dos lisados de cada poço para uma placa de 96 poços transparente e adicionaram-se 200µL

de uma solução de trabalho de BCA e incubou-se a 37°C, no escuro, durante 60 min. A leitura das absorvância das amostras foi efetuada a 550nm usando um leitor de microplacas. As amostras foram efetuadas em triplicado.

CAPÍTULO III – Resultados e Discussão

1. Amplificação, extração e quantificação de pDNA | Síntese de CDs e preparação de nanoplexos | Estudos de caracterização e compactação do pDNA

1.1. Caracterização

1.1.1. RMN (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear)

Martins *et al* ¹³⁶, descreveram que, durante a síntese de CDs, o ácido ascórbico é degradado e há a formação de novas estruturas e grupos químicos, gerando pequenas moléculas fluorescentes ricas em oxigênio. Parte dessas moléculas fluorescentes é então carbonizada para gerar núcleos de carbono, e o restante ligado covalentemente, formando os pontos de carbono fluorescentes.

Com o objetivo de avaliar as diferenças entre o ácido ascórbico e os CDs obtidos antes e depois da síntese, bem como para identificar os grupos químicos existentes à superfície dos CDs, foram realizados espectros de ¹H e ¹³C, utilizando DMSO-d₆ como solvente (Figura 22 e Figura 23).

Analisando ambos os espectros de ¹H e de ¹³C do ácido ascórbico obtidos, verifica-se que estão em concordância com a sua estrutura química com todos os sinais atribuídos aos respectivos prótons.

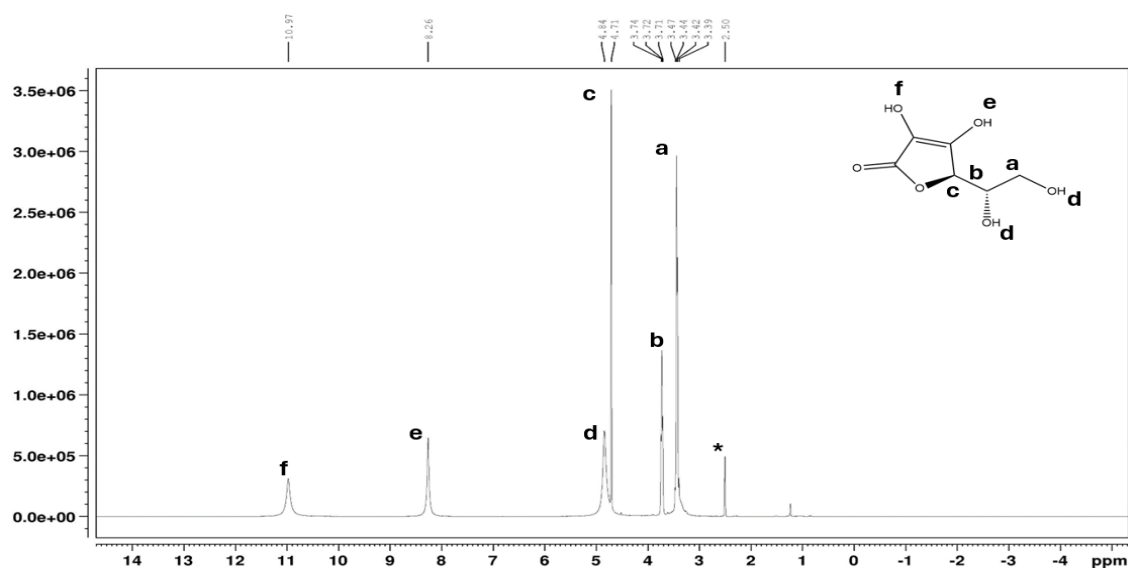


Figura 22. Espectro de RMN ¹H do ácido ascórbico utilizando o DMSO-d₆ como solvente (* - solvente (DMSO-d₆)).

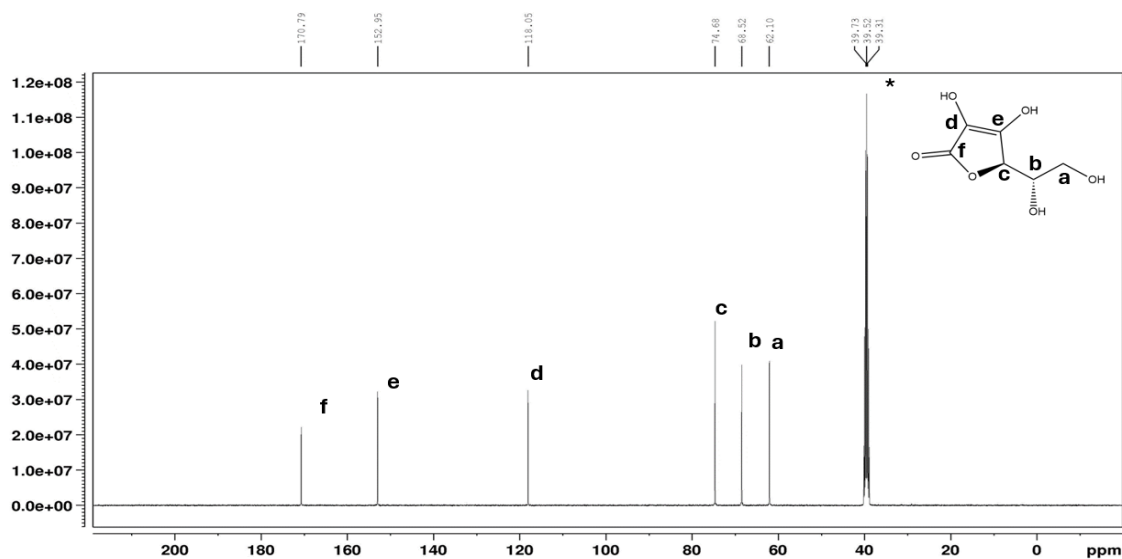


Figura 23. Espectro de RMN ^{13}C do ácido ascórbico utilizando o DMSO-d6 como solvente (* - solvente (DMSO-d6)).

No espectro dos CDs (**Figura 24**), verifica-se que os sinais nos deslocamentos químicos de 5,6 e 6,9/7,1 ppm são atribuídos a prótons ligados a estruturas de carbono sp^2 e anéis aromáticos. Enquanto sinais com deslocamento químico entre 3 e 4 ppm são prótons próximos a grupos de heteroátomos. Por último, o sinal com um deslocamento químico de 1,3 ppm é atribuído a prótons ligados a um carbono sp^3 . Estes espectros indicam a preparação bem sucedida de CDs, uma vez que estão em concordância com Martins *et al.*¹³⁶ que sintetizaram CDs através do mesmo método e com o mesmo precursor.

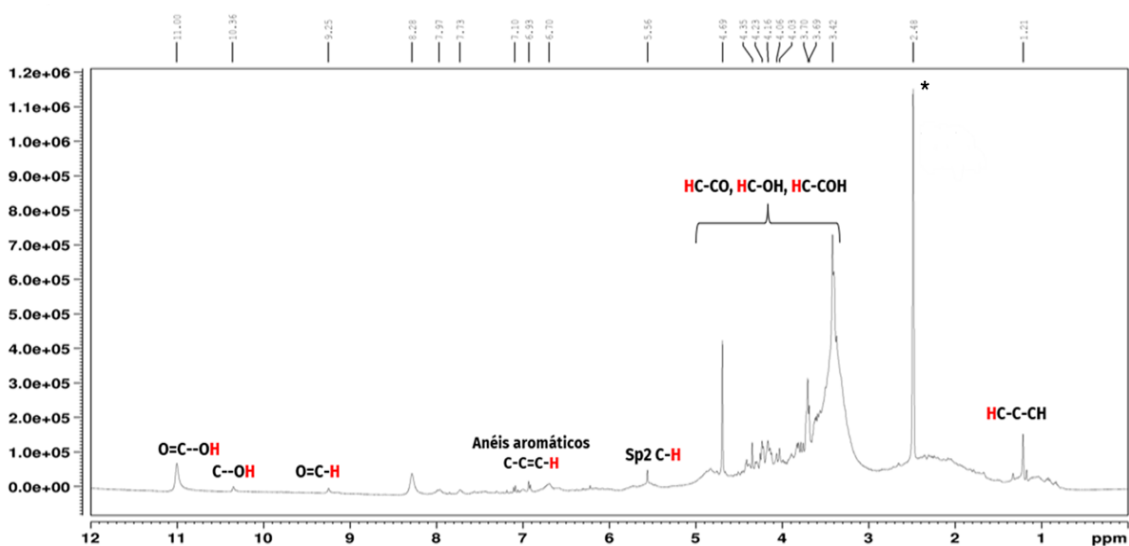


Figura 24. Espectro de RMN ^1H dos CDs utilizando o DMSO-d6 como solvente (* - solvente (DMSO-d6)).

Relativamente ao espectro de RMN ^{13}C de CDs, **Figura 25**, vários sinais com deslocamentos químicos entre 60 e 80 ppm são atribuídos a carbonos em grupos C-O, C-OH e CCO. Nos sinais de 110 a 160 ppm temos carbonos sp^2 e aromáticos. O sinal de deslocamento químico de 170 ppm corresponde ao carbono em grupos carboxílicos.

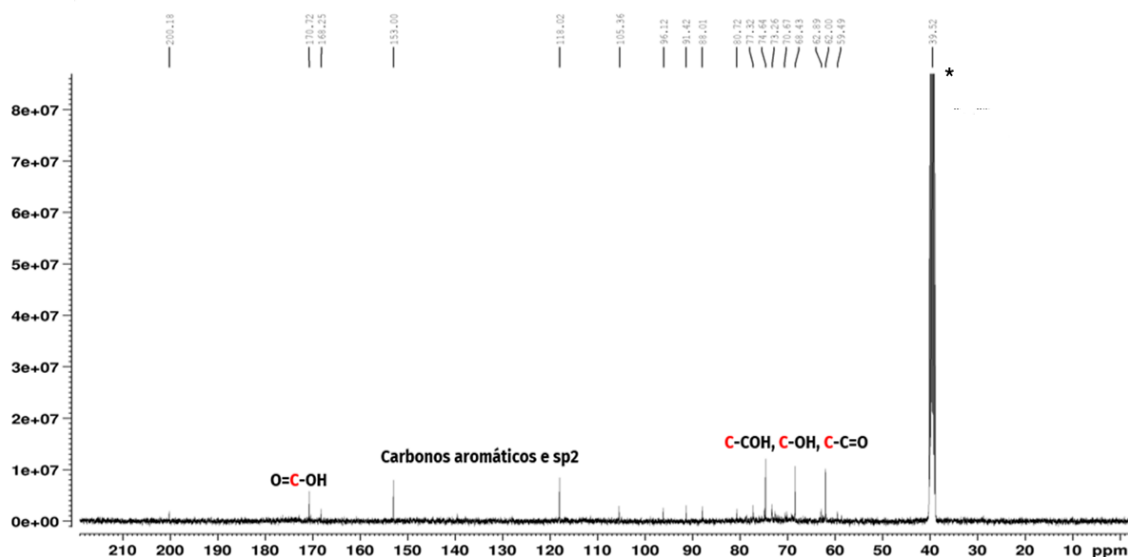


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C dos CDs utilizando o DMSO- d_6 como solvente (* - solvente (DMSO- d_6)).

1.1.2. FTIR (Espectroscopia de radiação Infravermelha com transformada de Fourier)

De modo a caracterizar as estruturas químicas tanto dos CDs como do seu precursor, procedeu-se à análise do espectro de FTIR. Esta análise estuda as interações entre a matéria e radiação eletromagnética, dando origem a um espectro com os sinais característicos para cada molécula. Na **Figura 26** estão representados os espectros do ácido ascórbico e dos CDs preparados.²⁰³

O ácido ascórbico apresenta uma banda a 3524 cm^{-1} correspondente ao alongamento do OH livre, enquanto duas bandas entre 3406 e 3312 cm^{-1} são atribuídas à ligação intramolecular de hidrogénio. Entre 1752 e 1653 cm^{-1} estão bandas de alongamento do carbonilo ($\nu\text{-C=O}$) e do alongamento da ligação dupla de carbonos (C=C), respetivamente. Em 1024 cm^{-1} foi detetado o alongamento de C-O. Relativamente aos CDs, a banda larga em 3360 cm^{-1} é atribuída ao alongamento de hidroxilo ($-\text{OH}$) e 2934 cm^{-1} ao alongamento de C-H. Bandas de vibração a 1707 cm^{-1} correspondem ao carbonilo ($\nu\text{-C=O}$) e 1396 cm^{-1} à flexão C-H. Duas outras bandas, 1188 e 1016 cm^{-1}

atribuídas ao alongamento das ligações C-O-C e C-O. Assim conclui-se que os grupos funcionais detetados nos CDs são maioritariamente grupos carboxilo e hidroxilo na superfície.

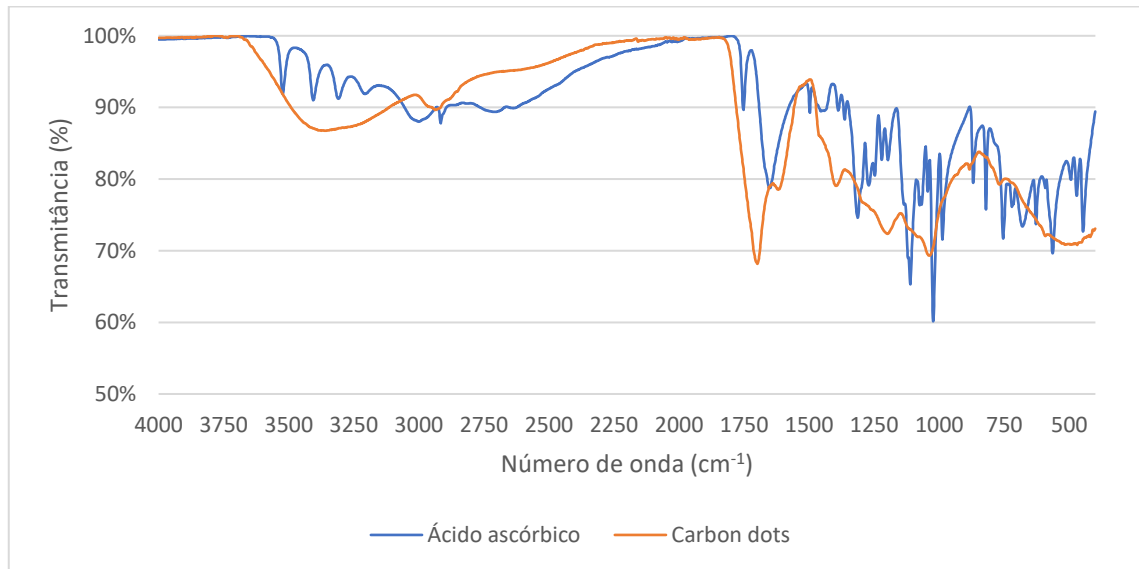


Figura 26. Espectro do FTIR-ATR relativo ao ácido ascórbico e aos Carbon dots.

Estes resultados estão, novamente, de acordo com os resultados obtidos por Martins *et al.*¹³⁶.

1.1.3. DLS/ELS (Espalhamento dinâmico da luz/Espalhamento eletroforético da luz)

Vários são os fatores como o pH, a temperatura, a solubilidade, o tamanho e a carga dos nanoplexos que determinam a eficiência da interação entre o sistema de entrega e os ácidos nucleicos e que, por sua vez, permitem a entrada nas células e a sua transfeção.²⁰⁴ Desta forma, foi determinado o tamanho hidrodinâmico dos nanoplexos e a sua carga pelo método DLS/ELS.

A análise de distribuição de tamanho de partículas numa solução por espalhamento dinâmico da luz fornece a informação da intensidade da luz dispersa pelas partículas e, por conseguinte, o seu tamanho hidrodinâmico, assim como a proporção em termos de número e volume que ocupam. A luz emitida por um laser, que viaja através da solução

coloidal, é analisada em função do tempo e a partir dessa informação podemos determinar o tamanho da partícula, tendo em conta os efeitos do movimento browniano.^{168,205,206}

Foram analisados através deste método, tanto os nanoplexos em estudo (mix1 (1CDs/1PEI), mix2 (1CDs/2PEI), mix4 (1CDs/4PEI)), assim como cada composto separadamente (CDs e PEI).

A **Tabela 5** mostra os valores médios de intensidade, assim como o Pdl das amostras em estudo. Também foram realizados os gráficos de percentagem de intensidade, volume e número apresentados em anexo (**Anexos - Figura A. 1, Figura A. 2 e Figura A. 3**). Ao observarmos a **Tabela 5**, verificamos que os valores de intensidade média são muito maiores no Mix1, comparativamente com os outros dois em estudo. Quanto maior a massa de PEI nas amostras, menor a intensidade média das partículas das amostras em estudo. A adição do PEI aos CDs permitiu a interação entre dois componentes e a formação de complexos mais pequenos e mais vantajosos para ultrapassar as barreiras biológicas e entrar nas células por endocitose. De Smedt *et al.*²⁰⁷, mostram, nos seus trabalhos, que partículas de dimensões de 100-500nm são capazes de serem internalizadas pelas células.

Tabela 5. Valores médios de intensidade \pm desvio padrão e Pdl médio, dos nanoplexos CDs/PEI, CDs e PEI determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

Amostras	Intensidade média	Pdl médio	Desvio padrão
CDs	361 \pm 15	0,87	0,05
PEI	883 \pm 426	0,81	0,02
Mix1	3530 \pm 770	0,76	0,34
Mix2	585 \pm 149	0,58	0,05
Mix4	461 \pm 20	0,26	0,00

Simultaneamente com a determinação dos diâmetros dos complexos, foram obtidos dados referentes ao Pdl. O Pdl, índice de polidispersão, é uma medida da distribuição de tamanho de partículas numa amostra e é frequentemente utilizado para avaliar a homogeneidade de amostras coloidais, e geralmente varia de 0 a 1. Valores de Pdl próximos de 0 indicam uma amostra como sendo monodispersa, ou seja, em que as partículas têm uma distribuição de tamanhos muito semelhantes entre si. Por outro

lado, valores de PDI maiores do que 0,1 geralmente indicam uma amostra polidispersa, em que as partículas têm tamanhos mais heterogênea.²⁰⁵

Na **Tabela 5**, estão representados os resultados médios de PDI. Verifica-se que as amostras apresentam um índice de polidispersão alto (superior a 0,1), pelo que apresentam tamanhos mais heterogêneos e que as amostras são consideradas polidispersas.

Também foram realizadas medições de potencial zeta, com o objetivo de avaliar a carga e estabilidade dos complexos em solução. Em suspensão, as nanopartículas apresentam uma carga superficial. Assim que o campo elétrico é aplicado, uma partícula começa a se mover devido à interação entre o campo elétrico e a partícula carregada. A velocidade do movimento com que essa partícula se move é determinada através do espalhamento da luz, determinando-se assim o potencial zeta. Este 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. Em termos práticos, quanto maior for o valor absoluto do potencial zeta, maior a repulsão existente entre as partículas numa solução e maior a resistência à agregação dessas mesmas partículas (há uma maior estabilidade da solução).^{206,208}

Através dos resultados apresentados na **Figura 27**, observa-se que os CDs apresentam um potencial zeta negativo na ordem dos -16,5 mV, enquanto o PEI apresenta um valor positivo na ordem dos 9,4 mV. Estes valores negativos e positivos para os CDs e PEI, respectivamente, estão de acordo com Martins *et al.*¹³⁶ e Kong *et al.*¹¹⁷ que apresenta um valor de potencial zeta negativo para os CDs e Mady *et al.*²⁰⁹ que apresenta um valor de PEI positivo. Os valores negativos dos CDs, apresentam-se em concordância com os grupos carboxilo na superfície, detetados pelo FTIR. Quando colocamos a mesma razão de massa entre os CDs e o PEI (mix1) verifica-se que estas partículas apresentam um potencial zeta na ordem dos 0 mV. Ao adicionar o dobro de PEI (mix2), as partículas formadas apresentam valores mais positivos na ordem dos 3,8 mV, e ao adicionarmos quatro vezes mais PEI (mix4), o potencial zeta das partículas aumenta ainda mais (10,7 mV). Estas evidências permitem afirmar que houve uma interação entre os CDs e o PEI em todos os mix em estudo, fazendo com que o PEI conseguisse camuflar a carga negativa dos CDs. À medida que se aumenta a quantidade de PEI, aumenta também o potencial zeta das amostras em análise.

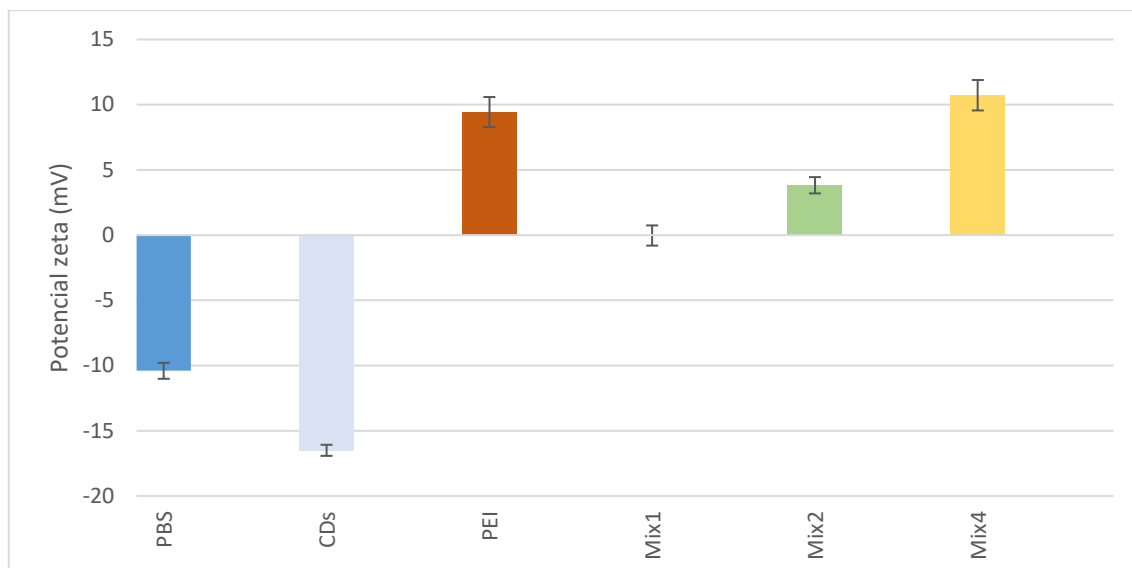


Figura 27. Potencial zeta dos nanoplexos preparados nas diferentes proporções massa. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em mV.

1.1.4. Espectroscopia UV-Vis

Na **Figura 28**, o espectro UV-Vis dos CDs apresenta duas bandas com comprimentos de onda máximos de 222nm e 266nm. O ácido ascórbico apresenta apenas um pico de absorvância no valor de 272nm.

Segundo Martins *et al.*¹³⁶, os CDs têm absorção em comprimentos de onda de 227nm que corresponde a transições π - π^* (CC) e 275nm que corresponde a transições n- π^* (CO, sistema conjugado), enquanto o ácido ascórbico apresenta uma banda a 264nm correspondente a transições π - π^* (CC). Como era de esperar, todos estes comprimentos de onda estão na mesma faixa de valores que os resultados obtidos, uma vez que todo o processo de síntese dos CDs realizado neste trabalho foi semelhante ao referido no artigo.

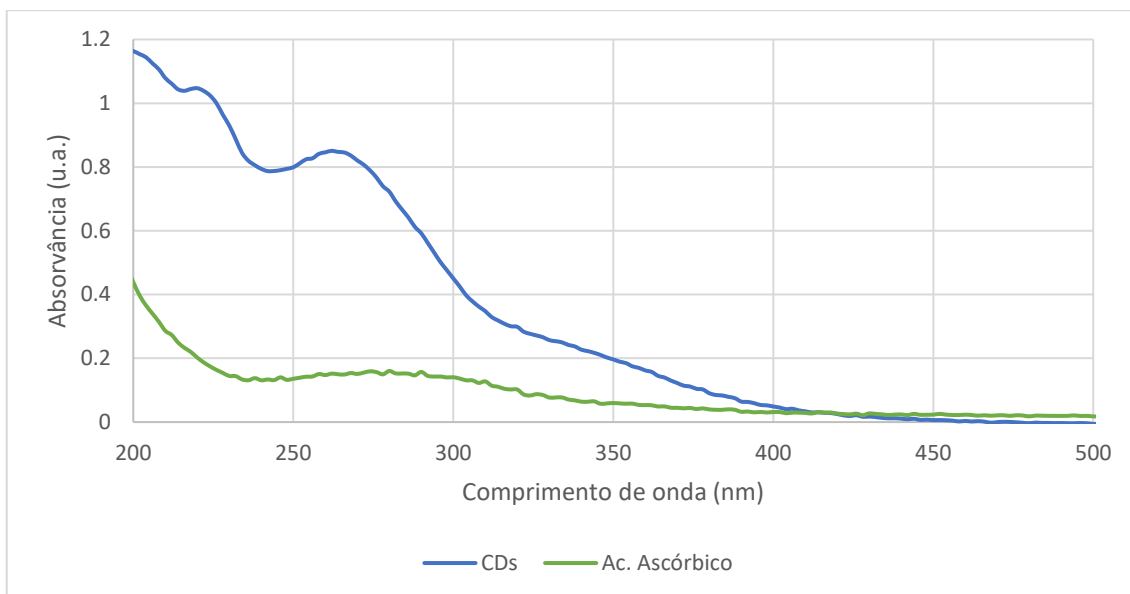


Figura 28. Espectro de absorção UV-Vis dos CDs e do seu precursor, concentração final=50µg/mL. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

A **Figura 29** pretende mostrar tanto as bandas características de CDs e PEI como as bandas formadas a partir dos complexos CDS/PEI (mix1, mix2 e mix4). Os complexos CDs/PEI, apresentam o pico de absorvância nos 264nm, 272nm e 268nm correspondentes aos mix1, mix2 e mix4, respetivamente, que correspondem ao pico aos 268nm nos CDs. No entanto, este pico não se apresenta tão evidente no mix4 uma vez que o PEI se apresenta em maior quantidade a interagir com os CDs, o que faz com que o pico de absorvância diminua.

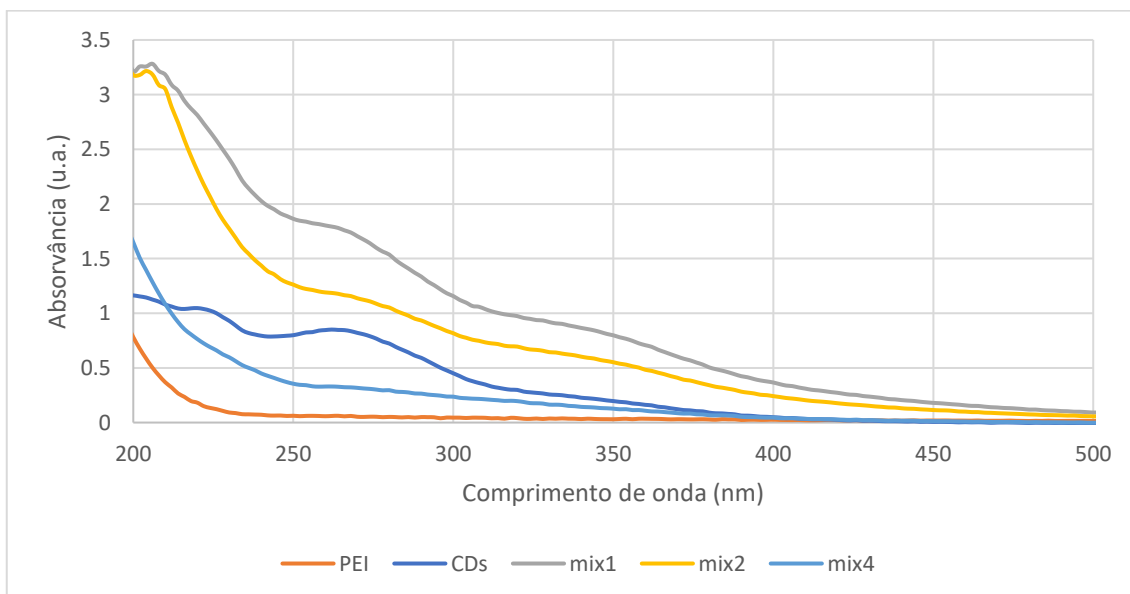


Figura 29. Espectro de absorção UV-Vis dos CDs, PEI e dos vários mix CDs/PEI em estudo, com uma concentração final de 200µg/mL. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

A **Figura 30** foi obtida por excitações sucessivas dos CDs, num intervalo de 20 em 20nm. Observando a figura conclui-se que os CDs têm uma fluorescência máxima aos 430nm de absorção, quando excitado aos 340nm (região azul), resultados corroborados por Zhang et al.²¹⁰.

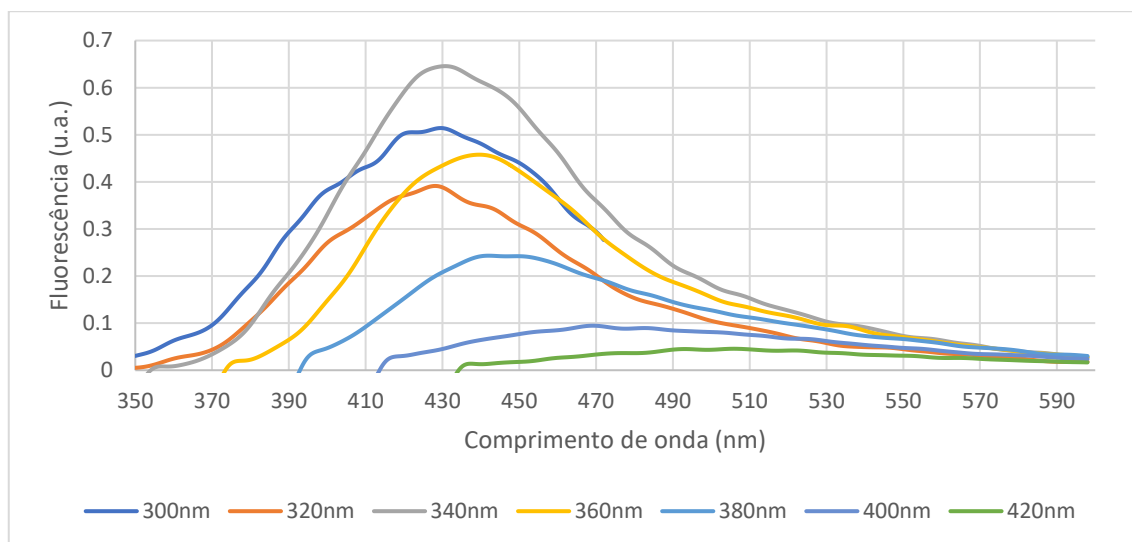


Figura 30. Espectro de emissão de fluorescência dos CDs (concentração final=50µg/mL). Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

A **Figura 31** pretende mostrar que para um comprimento de onda de excitação de 340nm há um comprimento de onda máximo de emissão diferente para cada amostra. O PEI não apresenta fluorescência enquanto os CDs, apresentam uma fluorescência máxima aos 430nm. Com o aumento da quantidade de PEI nos diferentes mix, esse comprimento de onda de emissão dos CDs nos mix vai aumentando, sofrendo um desvio batocrômico (para a zona do vermelho), adquirindo valores de emissão de 463nm, 468nm e 462nm correspondentes ao mix1, mix2 e mix4 respetivamente. Isto significa que existe algum composto na superfície dos CDs que está a interferir no comprimento de onda de emissão. Verifica-se também que com o aumento da quantidade de PEI nos complexos, há uma diminuição da fluorescência, outra razão que permite confirmar a interação do PEI com a superfície dos CDs.

Por outras palavras, estes dois acontecimentos podem ser explicados que, os CDs têm a sua própria fluorescência num determinado comprimento de onda de emissão. Quando algum composto interage com a sua superfície faz alterar o comprimento de

onda de emissão original, fazendo também com que a sua fluorescência diminua. Através deste pressuposto entende-se que o PEI está a interagir com a superfície dos CDs.

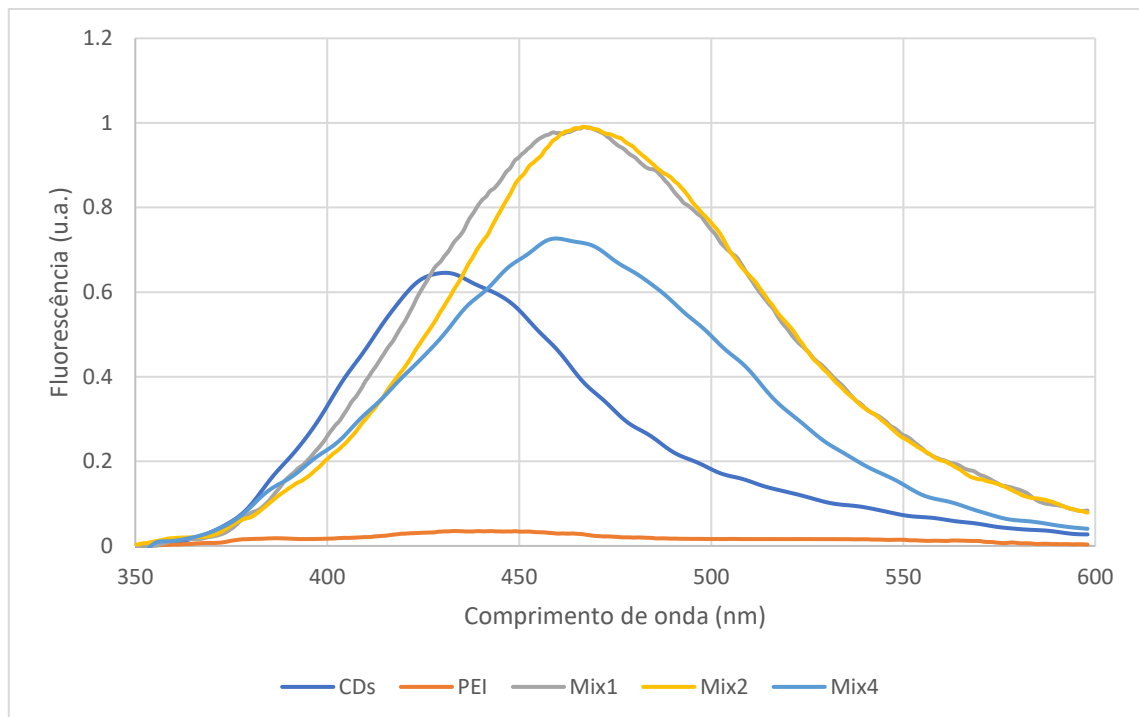


Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência das diferentes proporções com a excitação a 340nm.

1.2. Estudo da compactação com o pDNA

1.2.1. DLS/ELS

Na **Figura 32** encontra-se representado o gráfico de distribuição de tamanho hidrodinâmico, em função da intensidade, dos complexos CDs/PEI/pDNA. Gráficos em função do volume e número encontram-se em anexo (**Anexos - Figura A. 4 e Figura A. 5**). Através dos resultados de percentagem de intensidade, **Figura 32**, foi possível constatar que os poliplexos CDs/PEI/pDNA apresentaram uma redução de tamanho hidrodinâmico quando comparados com os componentes individualmente (CD e PEI), assim como quando comparados com os mix sem pDNA (**Tabela 5**). Os complexos CDs/PEI/pDNA resultou em partículas com tamanhos hidrodinâmicos inferiores a 100 nm.

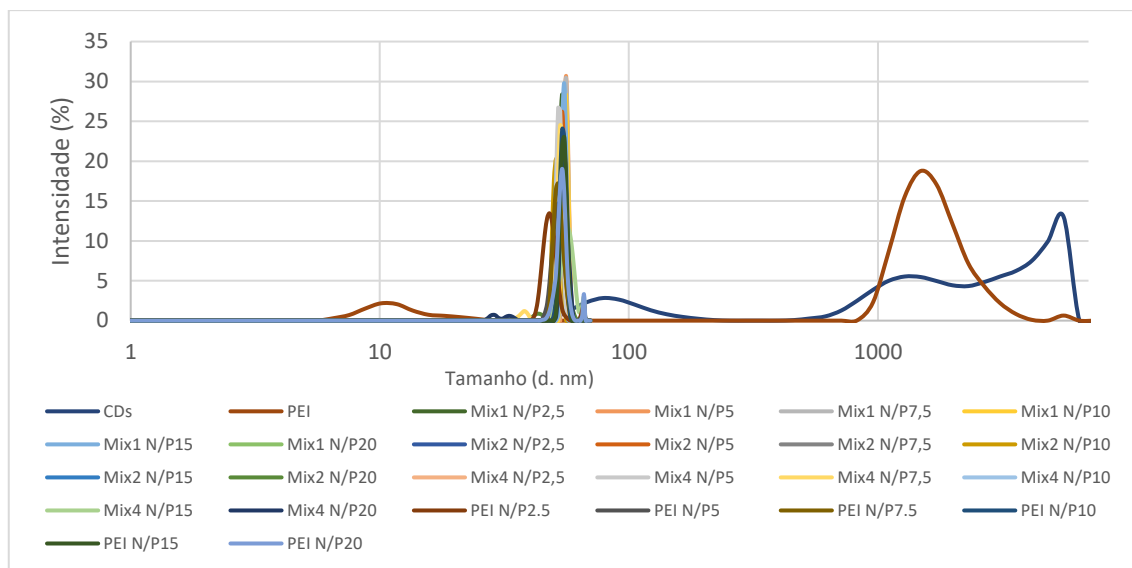


Figura 32. Diâmetro hidrodinâmico médio dos nanoplexos com o pDNA, assim como dos CDs e PEI individualmente determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes.

Na observação dos dados obtidos do potencial zeta, **Figura 33**, verifica-se que, nos complexos de pDNA com os mix CDs/PEI, a carga dos complexos aumenta para valores positivos com a proporção de PEI para CDs (mix1 < mix2 < mix4), sendo os complexos preparados com o mix4 os que possuem carga superficial positiva. Da mesma forma, a carga aproxima-se de valores positivos com o que realmente houve compactação do pDNA por parte do nanoplexo CDs/PEI. Nos complexos preparados com PEI também se consegue observar uma compactação do pDNA por parte do PEI que se traduz no aumento sucessivo da carga do complexo formado. Mady *et al.*²⁰⁹ mostra no seu trabalho a mesma tendência de potencial zeta, corroborando os resultados obtidos.

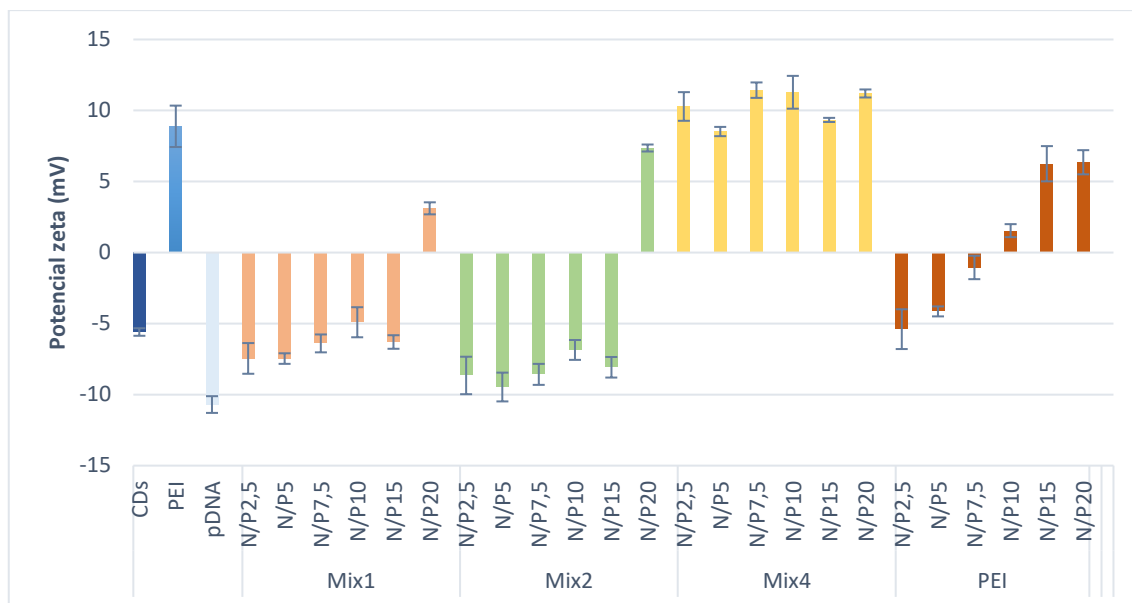


Figura 33. Potencial zeta dos nanoplexos preparados nas diferentes proporções massa com pDNA. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em mV.

1.2.2. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese é das principais técnicas para a separação de proteínas ou ácidos nucleicos. Esta descreve a migração e separação de partículas carregadas (iões) sob influência de um campo elétrico. A separação das partículas iônicas resulta de diferenças nas suas velocidades de migração, que é o produto da velocidade da mobilidade da partícula e intensidade do campo. Essa mobilidade da partícula é determinada pelo tamanho, forma e carga das partículas, a uma temperatura constante.²¹¹

Nesta eletroforese foi utilizado um gel de agarose 1%, o EZ-Vision como corante e um *Ladder* de 1kpb que permite determinar o tamanho dos fragmentos presentes na amostra por comparação. Para auxiliar na corrida como eletrólitos, proteger o DNA da inibição de nucleases e ajustar o valor de pH, foi utilizado o tampão TAE.^{211,212}

Analisando os géis obtidos, **Figura 34**, verificou-se que o pDNA sofreu compactação desde o N/P10 do mix1, resultando na retenção dos complexos CDs/PEI/pDNA nos poços. No caso do mix4, observou-se desde o N/P mais baixo (N/P2,5) uma migração da banda para o sentido oposto. Uma vez que no mix4 existe quatro vezes mais PEI que os CDs, os complexos migraram no sentido oposto devido ao aumento de cargas positivas e conseqüentemente a alteração da própria carga dos complexos, factos também corroborados pelos resultados do potencial zeta (**Figura 33**). Como também essa distância de migração em sentido contrário (ascendente) aumenta com as razões N/P

isto indica que estes complexos, além de apresentarem carga positiva, formaram complexos com tamanhos mais pequenos, permitindo-os sair dos poços do gel. Como controlo deste ensaio, complexos preparados com PEI/pDNA, preparados a uma razão de N/P2,5 e N/P5 pelo que não se pode afirmar com tanta certeza a máxima neutralização visto que não se consegue ver com clareza as bandas retidas no poço, podendo representar um problema de pouca amostra no poço. Kim *et al.*²¹³ mostrou que os complexos formados com o PEI (CDs/PEI e Au/PEI) tinham uma boa capacidade de complexação com o pDNA devido às suas interações de carga, do que os compostos sozinhos (CDs e Au). Assim, para validar a certeza destes resultados, foi realizado outro ensaio, o ensaio PicoGreen®.

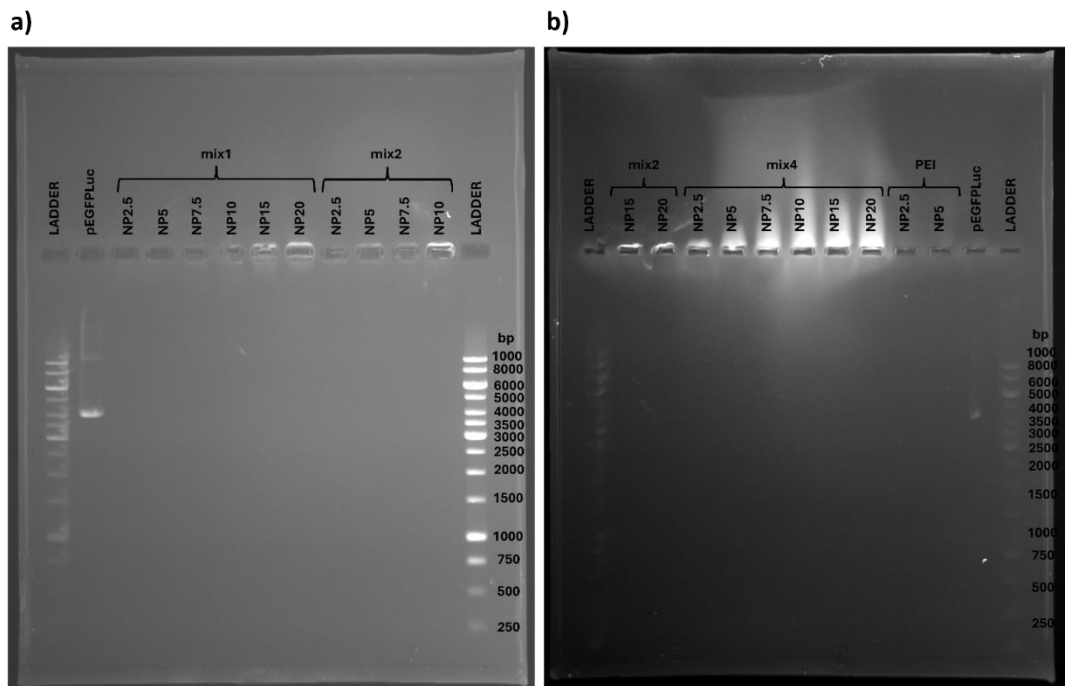


Figura 34. Eletroforese em gel de agarose 1% referente às diferentes proporções do nanoplexo CDs/PEI e diferentes razões N/P (*Ladder*-Gene Ruler 1kb DNA).

1.2.3. Ensaio do PicoGreen®

O ensaio do PicoGreen® permite-nos identificar em que proporções o pDNA se encontra compactado. Quanto menor a intensidade de fluorescência, mais compacto está o pDNA porque o reagente PicoGreen® não se consegue ligar ao pDNA e não produz fluorescência.²¹⁴ Neste ensaio, foram escolhidas três razões N/P de cada mix analisadas anteriormente (N/P7,5, N/P10 e N/P15). Através da observação da **Figura 35**, verifica-se que logo que se adiciona o PEI, o pDNA começa a complexar. Com o aumento de PEI na

solução verifico que há uma pequena perda da capacidade de complexação, não sendo muito significativa. Também pode afirmar-se que o mix4 apresenta menor compactação do pDNA comparando com os outros dois mix em estudo, o que corrobora os resultados obtidos na eletroforese. Por último pode afirmar-se que o nanoplexo CDs/PEI condensa melhor o pDNA quando comparado com o PEI isolado. Assim, o poliplexos desenvolvido (CDs/PEI/pDNA) parece formar um sistema ótimo e pronto para testar a transfeção.

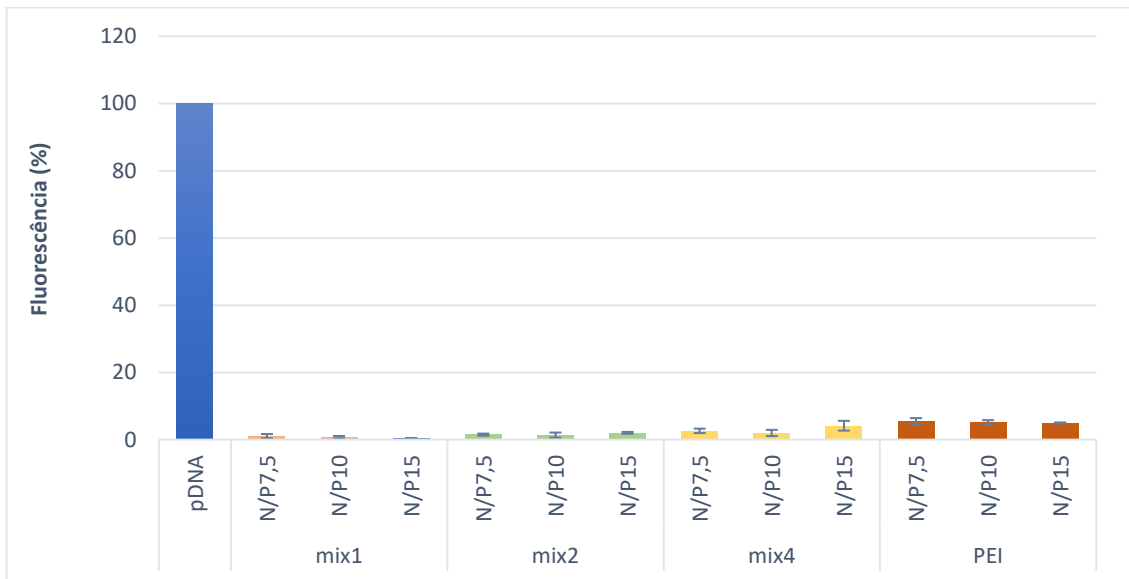


Figura 35. Ensaio Picogreen® referente às diferentes proporções massa entre CDs e PEI, realizado em triplicado (n=3). Os resultados encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em %.

2. Estudos *in vitro* de viabilidade celular e de entrega da proteína verde fluorescente (EGFP), em células HEK293T e hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI

2.1. Estudo da atividade metabólica e transfeção em HEK 293T – Ensaio da atividade metabólica através da resazurina e expressão de EGFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

O ensaio da resazurina é um método fluorimétrico que pretende avaliar a atividade metabólica das células, uma medida indireta da viabilidade celular. A quantidade de resazurina reduzida a resorufina é diretamente proporcional à atividade metabólica das células, uma medida indireta da quantidade de células viáveis.¹⁹³

Na **Figura 36**, podemos observar a percentagem de atividade metabólica das células HEK293T quando expostas às diferentes proporções dos complexos em estudo considerando como controlo, as células expostas a PBS, solvente utilizado para a preparação dos complexos.

Com este ensaio verifica-se que as células expostas ao poliplexo CDs/PEI/pDNA apresentam uma maior atividade metabólica do que nas células expostas ao nanoplexo PEI/ pDNA, resultados que estão de acordo com Wang *et al.*⁸³ onde é demonstrado que o nanoplexo PEI/pDNA resulta numa menor atividade metabólica quando comparado com o poliplexo formado pelo PEI/PEG/pDNA. Verifica-se, igualmente, que quanto maior proporção de PEI nos mix CDs/PEI, caso do mix4, resulta numa menor atividade metabólica. Também é possível observar que há uma tendência na diminuição da atividade metabólica com o aumento da razão N/P (maior quantidade de mix em relação à quantidade de pDNA), bem evidente nas condições de mix4 e PEI. Esta tendência não se verifica muito ao nível dos mix1 e mix2, pelo que a proporção de PEI nestes mix é inferior, revelando que este polímero é responsável pelos efeitos citotóxicos dos complexos, devido à sua carga catiónica.¹⁰⁹

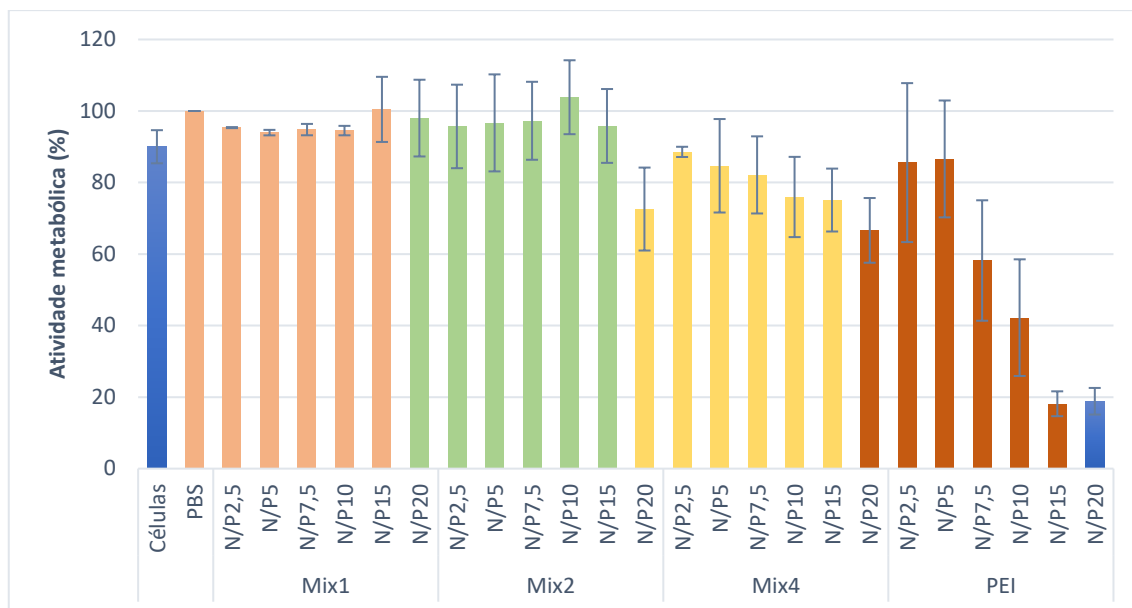


Figura 36. Percentagem de atividade metabólica das células HEK293T expostas 48h a diferentes complexos CDs/PEI/pDNA e PEI/pDNA. Os resultados apresentados são referentes a dois ensaios realizados nas mesmas condições, em dias diferentes. Cada ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com 8 réplicas para cada proporção (n=16). Os resultados encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em %.

Após 48h de exposição das células aos nanoplexos, foi avaliada a transfeção através do microscópio confocal para a visualização da fluorescência emitida pelas células a expressarem EGFP. A **Figura 37** mostra imagens da fluorescência das células HEK293T, após 48h de transfeção.

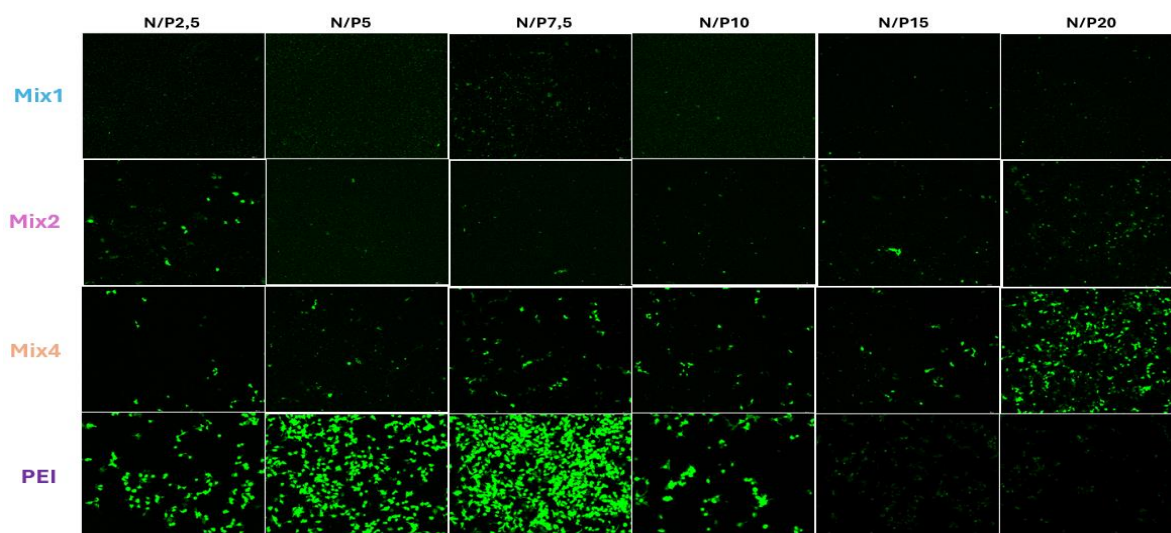


Figura 37. Imagens do microscópio ótico de HEK293T vivas após 48h expostas aos nanoplexos CDs/PEI (mix1, mix2 e mix4), a diferentes razões N/P. Escala 100 μ m.

Comparando as imagens de fluorescência obtidas nos diferentes mix verifica-se a presença de uma maior quantidade de células com emissão de fluorescência verde, ou seja, com expressão de EGFP, nas células transfetadas com o mix4 de nanoplexos CDs/PEI. Isto é atribuído ao facto de este mix4, além de resultar em complexos com tamanho hidrodinâmico inferior a 100nm, serem os únicos complexos com carga superficial (potencial zeta) positivo, permitindo a sua interação mais eficiente com a membrana celular e, segundo Pandey *et al.*¹⁰⁸, com os complexos preparados com PEI, este possui uma boa capacidade de formar complexos com o pDNA notando-se numa alta eficiência de transfeção. Também é possível verificar que para N/Ps mais altos (maior quantidade de mix CDs/PEI para pDNA), maior a quantidade de células com emissão de fluorescência EGFP. No entanto, verifica-se a existência de menor número de células com o aumento da razão N/P, o que corrobora os resultados anteriormente obtidos nos ensaios da atividade metabólica. Esta situação também ocorre, igualmente, com o PEI verificando-se uma diminuição significativa de atividade metabólica para NPs mais altos, e que está de acordo com vários estudos reportados na literatura. Por último, nos mix1 e 2, é visível alguma transfeção, embora se verifique uma intensidade de fluorescência mais baixa.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite obter informação sobre partículas em suspensão através de um laser como fonte de luz. A partir desta técnica é possível tirar conclusões do número e complexidade das partículas em suspensão, assim como a medição da intensidade de fluorescência de proteínas fluorescentes presentes na amostra, como a EGFP.^{215,216}

Os resultados apresentados na **Figura 38** referem-se à quantificação, através de citometria de fluxo, da fluorescência de EGFP nas células HEK293T, 48h após a transfeção. Verifica-se que a intensidade de fluorescência é baixa para os mix1 e mix2, enquanto esta intensidade de fluorescência é superior nas células transfetadas com o mix4 de CDs/PEI, e esta aumenta com a razão N/P (quantidade de complexo CDs/PEI para pDNA). Relativamente às células transfetadas com os complexos de PEI, a intensidade de fluorescência é maior, sendo máxima para o N/P7,5. Estes resultados vão de encontro com as imagens de fluorescência apresentadas anteriormente (**Figura 37**).

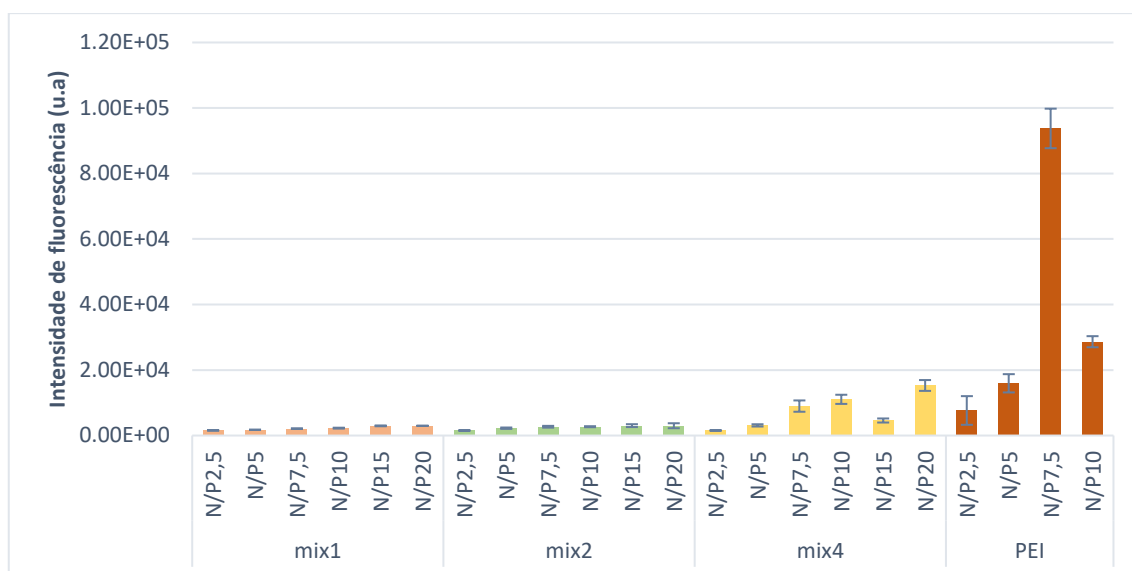


Figura 38. Resultados de citometria de fluxo em intensidade de fluorescência da EGFP (u.a.) das HEK293T expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI (mix1, 2 e 4) e PEI, a diferentes razões N/P. Os resultados provêm de medições em quadruplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em u.a..

2.2. Estudo da expressão do gene da luciferase em HEK 293T

O ensaio da luciferase é um ensaio bioquímico em que é utilizado o gene responsável pela expressão da luciferase, como um gene repórter, para medir a atividade desta enzima pela detecção da luz que é emitida durante a reação. A quantidade de atividade enzimática desta enzima será proporcional ao nível de expressão do gene e, conseqüentemente, medida da eficiência de transfeção. Esta enzima catalisa uma reação de bioluminescência, em que envolve a transferência de energia do ATP para o substrato luciferina que é oxidada dando origem à oxiluciferina, com libertação de AMP, CO₂ e luz.²¹⁷

Normalizando os valores da luciferase (**Anexos - Figura A. 7 e Figura A. 8**) com os obtidos no ensaio de proteína total, obtém-se o gráfico apresentado na **Figura 39**. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a atividade média foi superior nas células HEK293T transfetadas com os complexos CDs/PEI mix4 e o PEI. Este resultado está de acordo com as imagens obtidas no microscópio de fluorescência, assim como com os resultados de intensidade de fluorescência obtidos na citometria de fluxo.

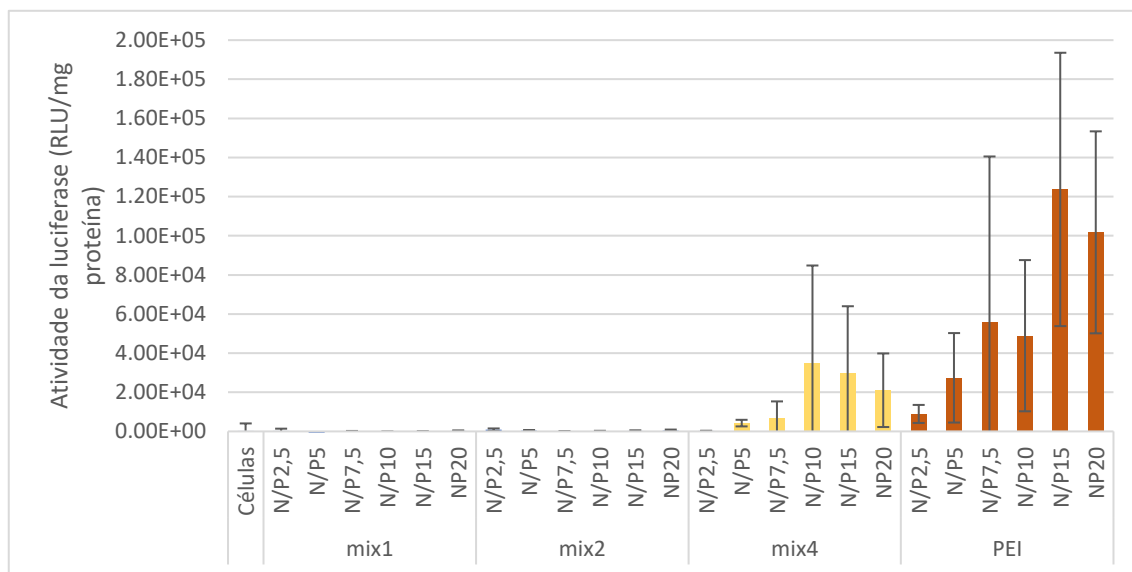


Figura 39. Atividade enzimática da luciferase (RLU/mg proteína) nas células HEK293T expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI e PEI, nas diferentes razões N/P. Os resultados apresentados são referentes a dois ensaios realizados nas mesmas condições, mas em dias diferentes. Cada ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com 4 réplicas para cada proporção (n=8). Os resultados encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em RLU/mg proteína.

2.3. Estudo da atividade metabólica e transfeção em hMSCs – Ensaio da atividade metabólica através da resazurina e expressão de EGFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo

Relativamente aos resultados de atividade metabólica da exposição das células hMSCs aos referidos complexos (**Figura 40**), verifica-se a mesma tendência de diminuição da atividade metabólica das células nas diferentes condições, com a mesma tendência do poliplexos CDs/PEI/pDNA ser menos citotóxico para as células do que o nanoplexos PEI/pDNA. Também é possível observar que a atividade metabólica sofre uma diminuição com o aumento da proporção de PEI nos complexos CDs/PEI, assim como com o aumento da razão N/P.

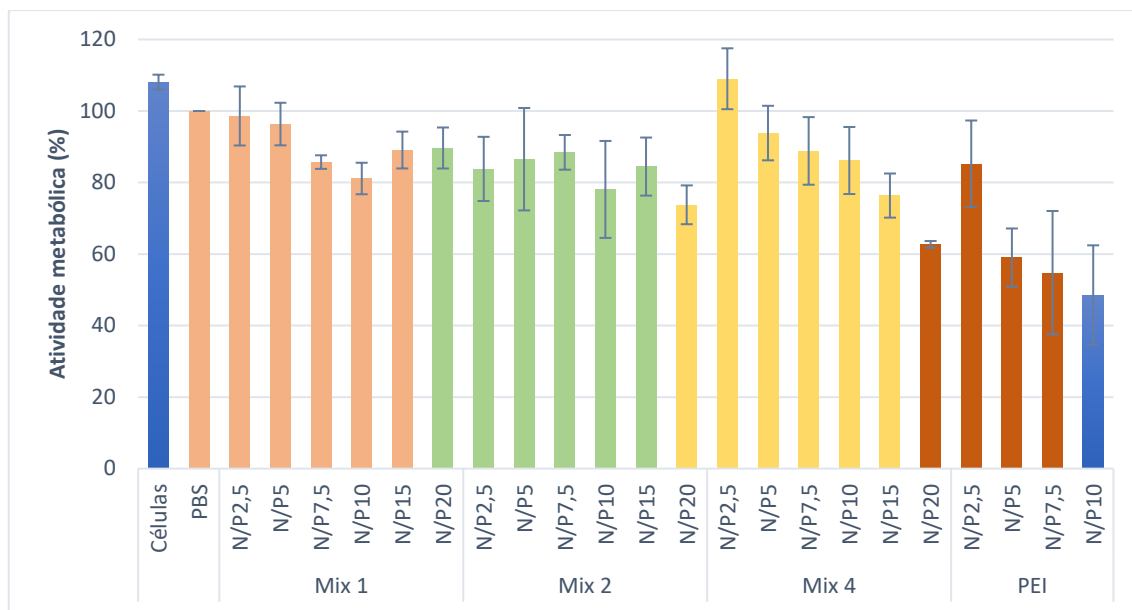


Figura 40. Percentagem de atividade metabólica das células hMSCs expostas 48h a diferentes complexos CDs/PEI/pDNA e PEI/pDNA. Os resultados apresentados são referentes a dois ensaios realizados nas mesmas condições, em dias diferentes. Cada ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com 8 réplicas para cada proporção (n=16). Os resultados encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em %.

Após a análise dos resultados obtidos neste ensaio pode-se concluir que os nanoplexos CDs/PEI formados possuem melhor biocompatibilidade do que apenas com o PEI mesmo a razões N/P superiores (maior concentração de nanoplexos), não induzindo a valores de citotoxicidade elevados, mesmo considerando o mix4. É também possível aferir que esta biocompatibilidade diminui com o aumento da massa do PEI maioritariamente atribuído à capacidade dos CDs neutralizarem parcialmente a carga catiónica do PEI. Este resultado vai de encontro com os resultados obtidos por Bu *et al.*¹⁷⁷, que obtiveram uma melhor biocompatibilidade do nanossistema CDs/PEI que apenas no PEI.

As imagens da **Figura 41**, dizem respeito a células hMSCs, com fluorescência, 48h após a transfeção com diferentes nanoplexos.

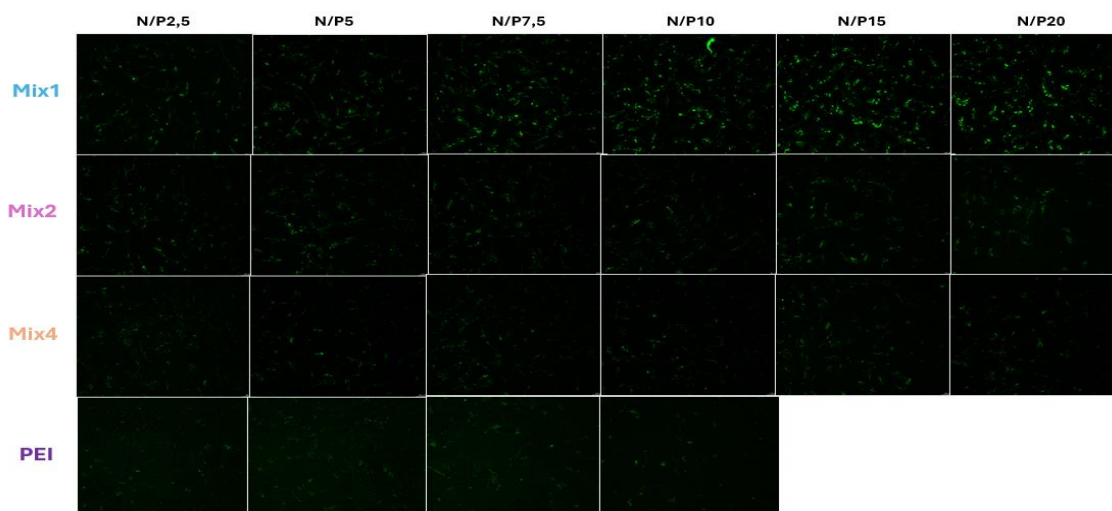


Figura 41. Imagens do microscópio óptico de hMSCs vivas após 48h expostas aos nanoplexos CDs/PEI (mix1, mix2 e mix4), a diferentes razões N/P. Escala=100µm.

Observando as imagens verifica-se que a proporção de nanoplexos CDs/PEI que produz maior fluorescência é o mix1, verificando que nas outras duas proporções (mix2 e mix4) a fluorescência é um pouco menor, apresentando este mix1 também uma boa percentagem de taxa metabólica. Com o aumento da razão N/P verifica-se uma pequena diminuição da percentagem de atividade metabólica. No caso do PEI, é possível observar alguma fluorescência, no entanto, não muito evidente. Ao comparar estes resultados, das hMSCs, com os obtidos nas HEK293T constata-se que a eficiência de transfeção das hMSCs é mais baixa, como reportado por Santos *et al.*⁶².

Os resultados apresentados na **Figura 42** referem-se à quantificação, através de citometria de fluxo, da fluorescência de EGFP nas células hMSCs, 48h após a transfeção com os diferentes complexos. Verifica-se que a intensidade de fluorescência aumenta, com o aumento dos nanoplexos CDs/PEI assim como com o aumento da razão N/P, à exceção do mix4 em N/Ps mais altos. Verifica-se que a intensidade de fluorescência de hMSCs mantém-se estável em todas as condições de CDs/PEI (mix1, 2 e 4), sendo ligeiramente inferior nas razões N/P mais altas do mix4. Relativamente aos complexos de PEI, a intensidade de fluorescência é muito superior para a razão N/P5. Estes resultados não estão de acordo com as imagens obtidas no microscópio de fluorescência. Isto pode dever-se ao difícil manuseamento das hMSCs. Durante a

elaboração deste método, algumas hMSCs podem ter aderido nos poços interferindo na leitura de fluorescência pelo citômetro.

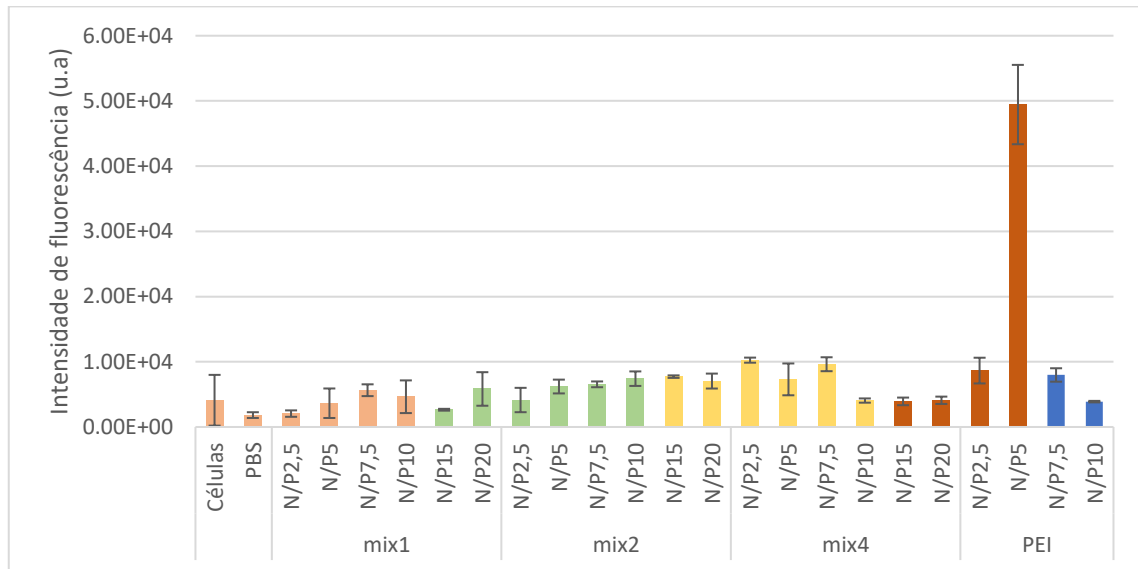


Figura 42. Resultados de citometria de fluxo em intensidade de fluorescência da EGFP (u.a.) das hMSCs expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos em estudo e razões N/P. Os resultados provêm de medições em quadruplicado, independentes, e encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em u.a..

2.4. Estudo da expressão do gene da luciferase em hMSCs

A **Figura 43**, refere-se aos resultados da atividade enzimática da luciferase nas células hMSC. Estes resultados, à semelhança dos resultados da expressão de EGFP nas hMSC, mostram muita variabilidade entre as réplicas dentro da mesma condição e entre experiências. Comparando os resultados obtidos nas HEK293T, as hMSCs apresentam muito menor eficiência de transfeção.

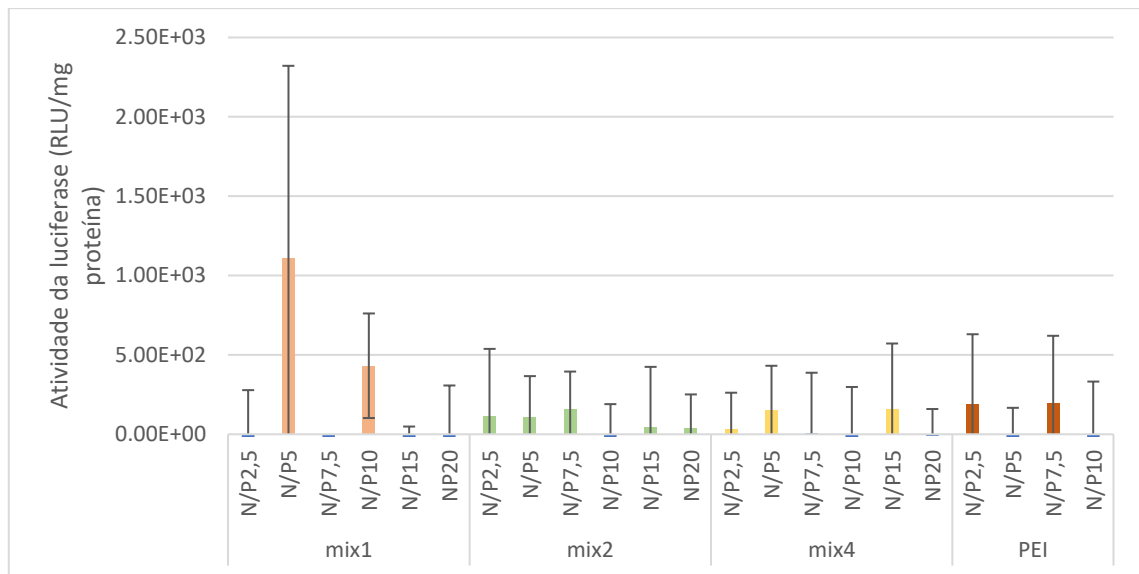


Figura 43. Atividade enzimática da luciferase (RLU/mg proteína) das hMSCs expostas 48h a diferentes proporções dos nanoplexos CDs/PEI e PEI, nas diferentes razões N/P. Os resultados apresentados são referentes a dois ensaios realizados nas mesmas condições, mas em dias diferentes. Cada ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com 4 réplicas para cada proporção (n=8). Os resultados encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em RLU/mg proteína.

Considerando os resultados de EGFP (microscopia e citometria) e Luciferase, verifica-se que a transfeção das células hMSC com os complexos preparados neste trabalho não é elevada, como era esperado e muito reportado na literatura. No entanto, considerou-se que a transfeção destas células com os CDs/PEI, utilizando um vetor com gene codificante de BMP-2, a sua expressão a níveis baixos poderia ser suficiente para induzir toda a cadeia de expressão génica e fatores de transcrição necessários para a diferenciação osteogénica das hMSC.

3. Estudos *in vitro* da viabilidade celular e de entrega de gene codificante da BMP-2, em hMSCs, utilizando os nanoplexos CDs/PEI para indução da diferenciação osteogénica

3.1. Estudo da diferenciação osteogénica

Para estes estudos, as células foram cultivadas de acordo com Gonçalves *et al.*²¹⁸, utilizando uma passagem de P2 a P3, uma vez que, segundo a literatura, as capacidades de diferenciação das MSCs começam a diminuir a partir da passagem 6.¹⁸¹

3.2. Avaliação da atividade metabólica

A avaliação da atividade metabólica das células é medida através do ensaio da redução da resazurina em resorufina, que possui fluorescência. No caso de avaliar a atividade metabólica durante a diferenciação osteogénica, foram efetuadas três medições distintas e independentes, aos 7, 14 e 21 dias, **Figura 44**.

Verifica-se que no controlo não houve aumento da atividade metabólica ao longo dos dias, contrariando o esperado, uma vez que normalmente as células encontram-se em proliferação celular ao longo do tempo e conseqüentemente apresenta mais atividade metabólica. Assim, é provável que estas células a analisar neste ensaio se encontrem numa fase mais estacionária.

Ao observar o controlo positivo (DEXA), verifica-se uma percentagem de atividade metabólica significativamente maior desde o primeiro dia de medição (dia 7) até ao último (dia 21) comparando com o controlo de células. Este resultado propõe que as células entraram em diferenciação celular com a adição da DEXA, uma vez que o processo de diferenciação celular é desencadeado por diversas vias que incluem várias moléculas sinalizadoras, ativando metabolicamente as células.^{38,219}

Relativamente às condições em estudo, verifica-se que a percentagem de atividade metabólica no dia 7 é mais baixa em comparação com o controlo. No entanto, este valor aumenta ao longo dos dias. Estes resultados permitem afirmar que inicialmente, as células ao serem expostas aos complexos começam a perder a sua atividade metabólica, devido a alguma citotoxicidade do nanossistema (aumentando a citotoxicidade com o aumento do PEI no nanocomplexo, resultado corroborado com o obtido na medição após 48h de transfeção), mas ao longo do tempo as células que não foram afetadas começam a se diferenciar devido à presença de BMP-2 transfetada, juntamente com os

precursores de diferenciação, β -GP e ácido ascórbico, adicionados três vezes por semana. Este resultado reflete-se no aumento significativo de atividade metabólica ao longo dos três dias testados, sendo mais evidente no mix4.

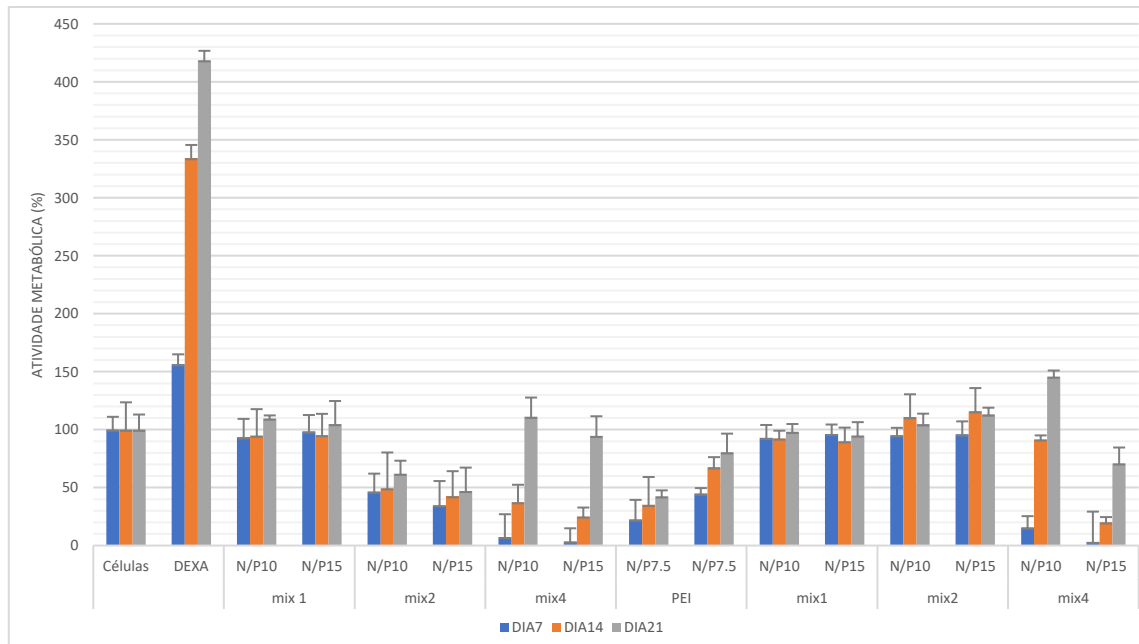


Figura 44. Percentagem de atividade metabólica das hMSCs expostas durante 48h aos políplexos CDs/PEI/pDNA. Os resultados apresentados são referentes a três medições dos três dias de diferenciação (7,14 e 21 dias). Cada ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com 4 réplicas para cada proporção (n=4). Controlo – Células; Controlo positivo – DEXA; Controlos negativos – proporções sem pDNA. Os resultados encontram-se representados como a média \pm desvio-padrão, em %.

3.3. Avaliação histoquímica – Ensaio qualitativos

A **Figura 45**, **Figura 46** e **Figura 47**, mostram a coloração da atividade de ALP, a coloração de depósitos de cálcio e coloração de depósitos de fosfato, respetivamente, das culturas tratadas com diferentes razões de políplexos CDs/PEI/pDNA. As células positivas para a presença de ALP apresentam coloração amarela/acastanhada²²⁰, para a coloração de depósitos de cálcio apresentam coloração vermelha⁵² e os depósitos de fosfato apresentam coloração preta²⁰². Na **Figura 45**, verifica-se logo que o controlo positivo (DEXA) apresenta depósitos de ALP mais visíveis e de maiores dimensões do que nas outras condições. Como era de esperar, no controlo negativo não há evidência de nenhuma alteração na cultura. Relativamente às células expostas aos complexos CDs/PEI/pDNA, verifica-se uma quantidade mais significativa de depósitos corados aos 7 e 14 dias do que aos 21 dias. Sendo a ALP um marcador precoce de diferenciação osteoblástica⁵⁰ é passível de aferir que a entrega do pDNA codificante de BMP-2 desencadeou o processo de diferenciação.

Em relação às colorações de depósitos de cálcio (**Figura 46**) e de depósitos de fosfato (**Figura 47**), é visível alguns depósitos de cálcio e fosfato aos 7 dias que vai aumentando ao longo dos dias 14 e 21. Também é visível alguma modificação morfológica das células ao longo do tempo, apresentando-se mais alongadas e com a formação de uma matriz celular. No entanto, comparando com os resultados positivos, estes não são muito significativos.

O controlo positivo (DEXA), é o que apresenta uma coloração mais visível para os três ensaios histoquímicos e morfológicamente as células apresentam-se mais alongadas. É possível visualizar claramente os depósitos de cálcio após 21 dias em cultura, assim como apresenta mais formação de depósitos de fosfato, através dos nódulos de mineralização que é característico de uma diferenciação acentuada das células.²²¹ De facto, os resultados obtidos neste controlo positivo levam à conclusão de que a DEXA induz a maturação dos osteoblastos e o crescimento celular. Uma vez que as células cultivadas na presença deste indutor e com os precursores de diferenciação (β -glicerofosfato e ácido ascórbico) apresentam coloração positiva para ALP, depósitos de cálcio e fosfato, assim como apresenta uma atividade de ALP aumentada já nos primeiros dias.²²²

Os suplementos β -GP e ácido ascórbico utilizados para as células foram necessários para promover a mineralização da matriz. Sordi *et al.*⁵⁶ comprovaram que as células mesmo sendo tratadas com DEXA, sem estes precursores, não demonstraram capacidade de mineralização da matriz extracelular. Como referido no Capítulo I, o ácido ascórbico tem a capacidade de promover o aumento na secreção da maioria dos fatores envolvidos no desenvolvimento e crescimento do tecido ósseo e, desta forma, aumentar o potencial de diferenciação osteogénico.⁵⁹ O β -GP, fornece uma fonte de fosfato orgânico para mineralização da matriz extracelular *in vitro*.⁵⁵

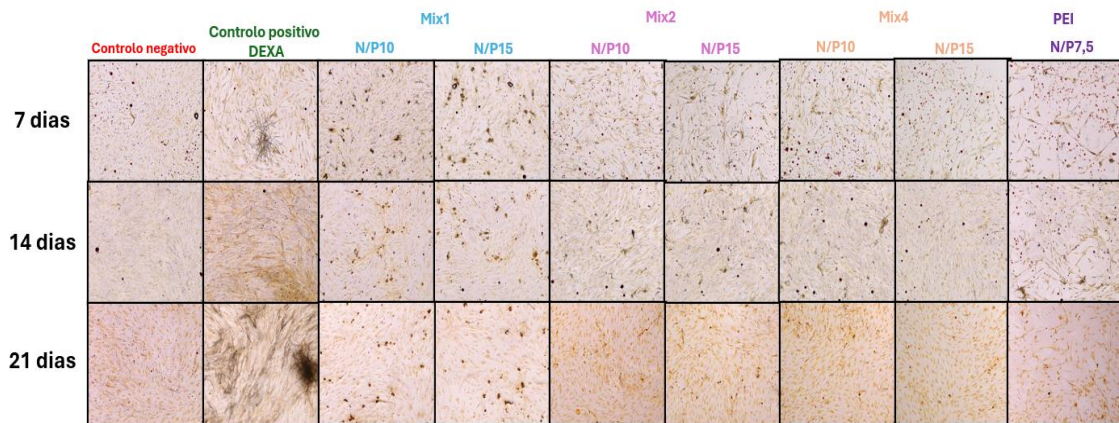


Figura 45. Coloração para deteção de atividade de ALP na matriz extracelular, nos dias 7, 14 e 21. As hMSCs foram transfetadas com BMP-2 através do nanoplexos CDs/PEI. O meio foi mudado a cada dois dias repondo os precursores osteogénicos (ácido ascórbico e β -glicerofosfato) em todas as condições. Controlo positivo – Células expostas aos precursores e ao indutor (DEXA); controlo negativo – células expostas aos precursores, aos nanoplexos CDs/PEI mas sem o pBMP2. Escala 100 μ m.

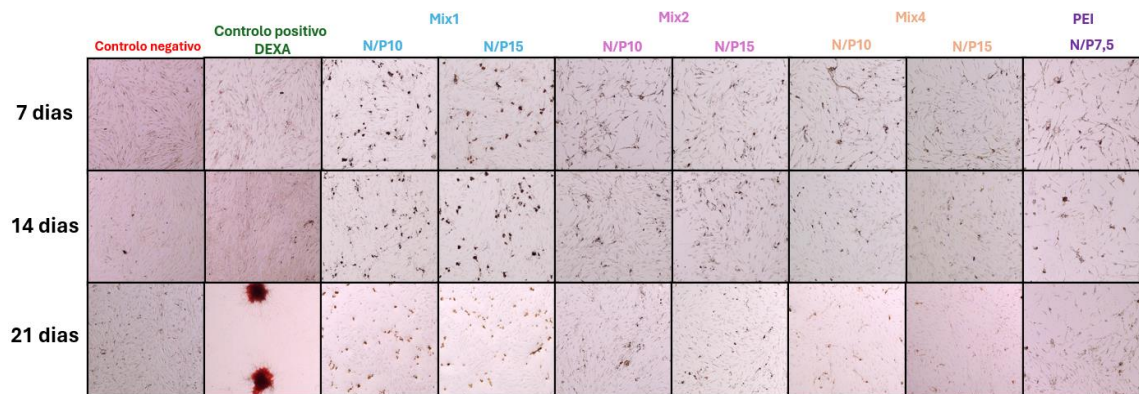


Figura 46. Coloração de alizarina vermelho para deteção de depósitos de cálcio na matriz extracelular, nos dias 7, 14 e 21. As hMSCs foram transfetadas com BMP-2 através do nanoplexos CDs/PEI. O meio foi mudado a cada dois dias repondo os precursores osteogénicos (ácido ascórbico e β -glicerofosfato) em todas as condições. Controlo positivo – Células expostas aos precursores e ao indutor (DEXA); controlo negativo – células expostas aos precursores, aos nanoplexos CDs/PEI mas sem o pBMP2. Escala 100 μ m.

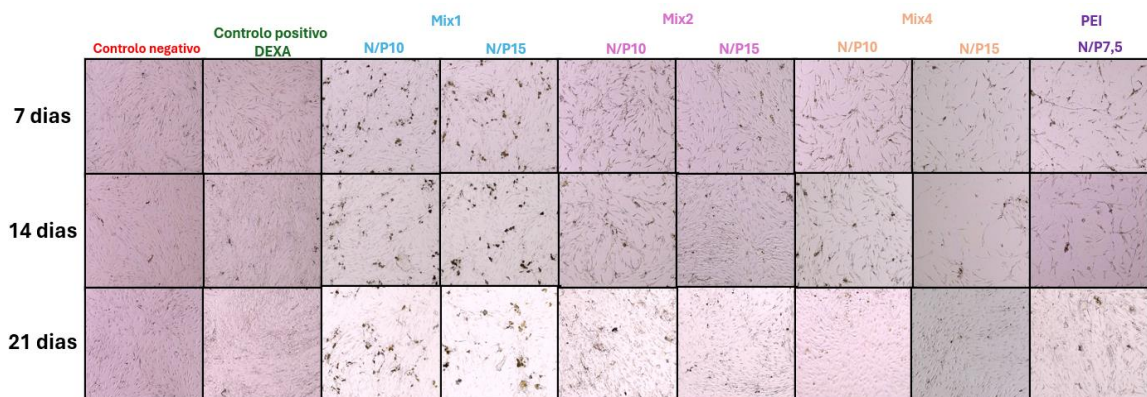


Figura 47. Coloração de *von Kossa* para deteção de depósitos de fosfato na matriz extracelular, nos dias 7, 14 e 21. As hMSCs foram transfetadas com BMP-2 através do nanoplexos CDs/PEI. O meio foi mudado a cada dois dias repondo os precursores osteogénicos (ácido ascórbico e β -glicerofosfato) em todas as condições. Controlo positivo – Células expostas aos precursores e ao indutor (DEXA); controlo negativo – células expostas aos precursores ou aos nanoplexos CDs/PEI mas sem o pBMP2. Escala 100 μ m.

3.4. Avaliação bioquímica – Ensaio quantitativos

•Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A **Figura 48** mostra a atividade de ALP em nm/min/mg de proteína. De uma forma geral, verifica-se que a atividade de ALP apresenta-se mais elevada no dia 7. Quando analisamos as células tratadas com DEXA (controlo positivo) permite afirmar que a ALP tem uma maior atividade aos 7 dias, mas depois a sua atividade começa a diminuir. Este facto prova que a ALP é um marcador precoce de diferenciação osteoblástica.⁵⁰ No entanto, a quantificação da atividade da ALP demonstra-se não conclusiva, devido à variação entre réplicas em algumas condições. Isto pode explicar os resultados histoquímicos, onde não é visível uma clara e proeminente presença dos depósitos de cálcio/fosfato e atividade de ALP como no controlo positivo de DEXA, no entanto, apresentam algumas diferenças em relação ao controlo negativo. Aparentemente, parece haver uma tendência de menor atividade da ALP nas células expostas ao complexo CDs/PEI mix4.

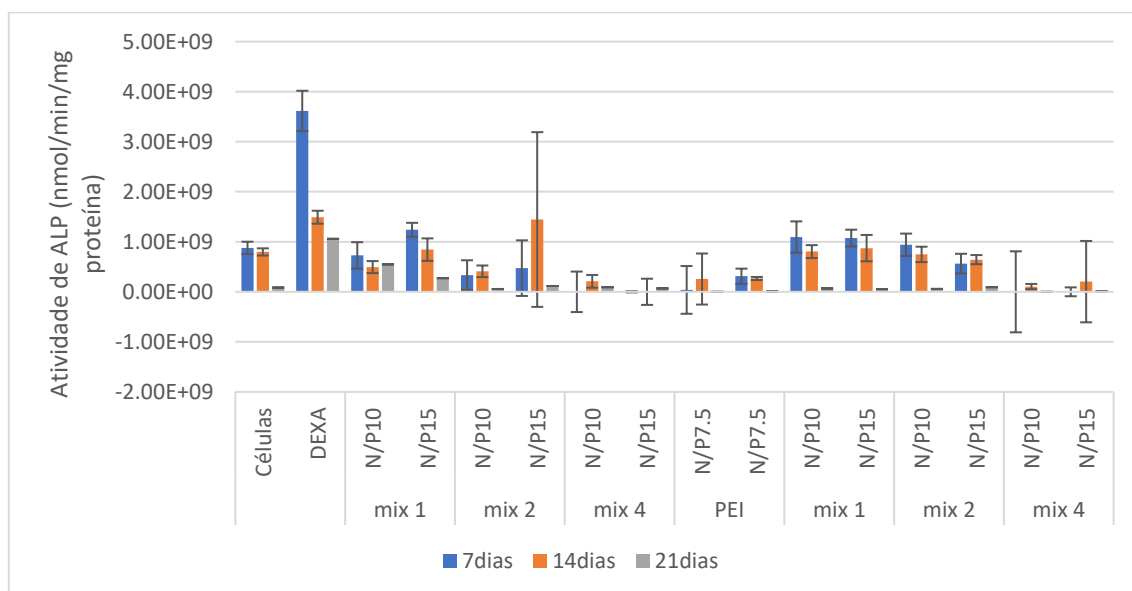


Figura 48. Atividade de ALP (nmol/min/mg proteína) das hMSCs, expostas 48h a diferentes proporções de nanoplexos CDs/PEI. Os resultados apresentados são referentes a três medições dos três dias de diferenciação (7,14 e 21 dias). Cada ensaio foi realizado numa placa de 96 poços com 3 réplicas para cada proporção (n=3). Controlo – Células; Controlo positivo – DEXA; Controlos negativos – proporções sem pDNA. Os resultados encontram-se representados como a média ± desvio-padrão, em %.

As células expostas aos políplexos foram capazes de entrar em processo de diferenciação porque apresentaram a atividade de ALP aumentada logo no início (confirmada tanto pelos testes histoquímicos como pela quantificação de ALP). Também podemos verificar através da atividade metabólica, da morfologia celular e presença de alguma mineralização, quando comparada com o controlo negativo, que houve alguma diferenciação celular. No entanto, quando comparamos tais resultados com o controlo positivo pode afirmar-se que os resultados obtidos não são muito significativos. Assim, aparentemente houve alguma diferenciação, mas não significativamente visível que se possa afirmar tal facto com clareza. Esta experiência carece de ser repetida, com uma quantidade maior de réplicas, para se retirar conclusões com mais certeza.

Conclusão e perspectivas futuras

A terapia génica é uma técnica versátil e cada vez mais em exponencial crescimento devido à possibilidade de tratar, ou até mesmo curar, doenças genéticas que antes eram consideradas incuráveis. Ao introduzir, modificar ou substituir genes defeituosos diretamente nas células dos pacientes, permite corrigir as causas subjacentes de determinadas doenças. O facto desta terapia poder ser combinada com as células estaminais mesenquimais abre novas possibilidades no campo da medicina regenerativa e medicina personalizada com a vantagem de oferecer tratamentos mais específicos e menos invasivos.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo final desenvolver um nanosistema à base de CDs e PEI para transportar um pDNA que codifica a BMP-2, e ser entregue em células estaminais mesenquimais humanas com a finalidade de induzir a diferenciação osteogénica.

Através da caracterização realizada verificamos que a síntese dos CDs foi bem sucedida, assim como a interação entre os CDs e o PEI, formando um nanoplexos CDs/PEI através da interação eletrostática. Estes nanoplexos formados apresentavam-se com um tamanho hidrodinâmico mais pequeno e um potencial zeta suficientemente positivo para poder interagir com a membrana celular. Quando colocados a interagir com o pDNA, verificou-se a sua compactação e neutralização completa para o mix1 e mix2, enquanto para o mix4, houve uma compactação e neutralização mais baixa formando complexos com o pDNA mais positivos.

Após os estudos de caracterização dos poliplexos, seguiram-se os ensaios *in vitro* com a exposição de células HEK293T e hMSCs aos diferentes poliplexos em estudo utilizando como DNA o pEGFP_{Luc}, para avaliar a citotoxicidade dos poliplexos e a transfeção. A citotoxicidade mostrou ser maior em proporções de CDs/PEI e razões N/P elevadas, assim como mostrou ser um pouco maior para as hMSCs do que para as HEK293T. Os estudos de transfeção mostraram que realmente as células HEK293T têm maior facilidade de serem transfetadas verificando-se logo a transfeção desde as primeiras proporções de CDs/PEI e razões N/P, assim como valores mais altos na intensidade de fluorescência e atividade da enzima luciferase. No entanto, também foi conseguida alguma transfeção nas hMSCs mostrando uma maior fluorescência para o N/P10, N/P15

e N/P20 do mix1. Tendo em conta este facto, para as HEK293T obteve-se melhor transfeção no mix4 para N/P5, N/P7,5 e N/P10 com atividade metabólica de 85%, 82% e 76% respetivamente, e para as hMSCs, obteve-se melhor transfeção no mix1 para N/P7,5, N/P10 e N/P15 com atividade metabólica de 86%, 81% e 89%, respetivamente.

Por último, foram realizados os estudos de diferenciação osteogénica aos 7, 14 e 21 dias, tendo um indutor de diferenciação osteogénica (DEXA) como controlo positivo. Estes estudos mostraram que se obteve transfeção do pBMP2 com os nanoplexos CDs/PEI em estudo onde, houve um aumento da atividade metabólica ao longo do tempo e em relação ao controlo de células, propondo a ocorrência da diferenciação celular. Aparentemente, ocorreu uma expressão inicial da BMP-2, suficiente para aumentar a atividade metabólica celular e expressar a ALP no período inicial da diferenciação (7 dias). No entanto, mais estudos teriam de ser realizados para se poder identificar com mais clareza a formação de depósitos de cálcio/fosfato nos estágios mais tardios.

De uma perspetiva futura, alguns ensaios teriam de ser otimizados e repetidos com o objetivo de se determinar com mais certeza a proporção ideal e posteriormente passar para a parte da diferenciação osteogénica. Os resultados obtidos neste último ponto foram preliminares, pelo que, para uma melhor eficácia e confirmação destes resultados, o ensaio poderia ser repetido e poderiam ser utilizadas outras técnicas como o *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR) com o objetivo de obter informação mais detalhada ao nível da expressão dos genes caraterísticos de cada fase da diferenciação e microscopia eletrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscope*, SEM) para se obter uma imagem tridimensional dos depósitos existentes.

Referências bibliográficas

- (1) Zakrzewski, W.; Dobrzyński, M.; Szymonowicz, M.; Rybak, Z. Stem Cells: Past, Present, and Future. *Stem cells Research Therapy* **2019**, *10* (1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
- (2) Margiana, R.; Markov, A.; Zekiy, A. O.; Hamza, M. U.; Al-Dabbagh, K. A.; Al-Zubaidi, S. H.; Hameed, N. M.; Ahmad, I.; Sivaraman, R.; Kzar, H. H.; Al-Gazally, M. E.; Mustafa, Y. F.; Siahmansouri, H. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cell in Regenerative Medicine: A Narrative Review. *Stem cells Research Therapy* **2022**, *13* (1), 366. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03054-0>.
- (3) Rajabzadeh, N.; Fathi, E.; Farahzadi, R. Stem Cell-Based Regenerative Medicine. *Stem Cell Investig* **2019**, *6*, 19. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.06.04>.
- (4) Kalra, K.; Tomar, P. C. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics* **2014**, *2*, 919–930.
- (5) El Barky, A. R.; Ali, E.; Mohamed, T. M. Stem Cells, Classifications and Their Clinical Applications. *American Journal of Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *1* (1), 001–007.
- (6) Choumerianou, D. M.; Dimitriou, H.; Kalmanti, M. Stem Cells: Promises versus Limitations. *Tissue Engineering Part B* **2008**, *14* (1), 53–60. <https://doi.org/10.1089/teb.2007.0216>.
- (7) Nanjwade, B. K.; Sudulaguntla, A.; Gurung, S.; Tamang, J. K. A Review: Stem Cells and Classification of Stem Cells Based on Their Origin. *Sudulaguntla et al. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2016**, *5* (11), 534–556. <https://doi.org/10.20959/wjpps201611-7994>.
- (8) Saldaña, L.; Bensiamar, F.; Vallés, G.; Mancebo, F. J.; García-Rey, E.; Vilaboa, N. Immunoregulatory Potential of Mesenchymal Stem Cells Following Activation by Macrophage-Derived Soluble Factors. *Stem Cell Research Therapy* **2019**, *10* (1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1156-6>.
- (9) Zhou, J.; Shi, Y. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Origin, Immune Regulation, and Clinical Applications. *Cellular Molecular Immunology* **2023**, *20* (6), 555–557. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01034-9>.
- (10) Parekkadan, B.; Milwid, J. M. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annual Review Biomedical Engineering* **2010**, *12*, 87–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-070909-105309>.
- (11) Caplan, A. I. Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Orthopaedic Research* **1991**, *9* (5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.

- (12) Quarto R.; Mastrogiacomo M.; Cancedda R.; Kutepov SM; Mukhachev V.; Lavroukov A.; Kon E.; Marcacci M. Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *New England Journal of Medicine* **2001**, 344 (5), 381–387. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102013440516>.
- (13) Sensebé, L.; Gadelorge, M.; Fleury-Cappellesso, S. Production of Mesenchymal Stromal/Stem Cells According to Good Manufacturing Practices: A Review. *Stem Cell Research Therapy* **2013**, 4 (3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/scrt217>.
- (14) Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science (1979)* **1999**, 284 (5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
- (15) Chen, Z.; Jin, M.; He, H.; Dong, J.; Li, J.; Nie, J.; Wang, Z.; Xu, J.; Wu, F. Mesenchymal Stem Cells and Macrophages and Their Interactions in Tendon-Bone Healing. *Journal Orthopaedic Translation* **2023**, 39, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2022.12.005>.
- (16) Zhou, H.; He, Y.; Xiong, W.; Jing, S.; Duan, X.; Huang, Z.; Nahal, G. S.; Peng, Y.; Li, M.; Zhu, Y.; Ye, Q. MSC Based Gene Delivery Methods and Strategies Improve the Therapeutic Efficacy of Neurological Diseases. *Journal Bioactive Materials* **2023**, 23, 409–437. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.11.007>.
- (17) He, Q.; Wu, Z.; Zhang, L. Carbon Dots as a New Class of Multifunctional Nanomaterial in Mesenchymal Stem Cells: Opportunities and Challenges. *Journal Materials Chemistry B* **2023**, 11 (16), 3511–3536. <https://doi.org/10.1039/d2tb02790a>.
- (18) Ryu, S.; Lee, J. M.; Bae, C. A.; Moon, C. E.; Cho, K. O. Therapeutic Efficacy of Neuregulin 1-Expressing Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Stroke. *Journal PLoS ONE* **2019**, 14 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222587>.
- (19) Lai, X.; Wang, Y.; wang, X.; Liu, B.; Rong, L. MiR-146a-5p-Modified HUCMSC-Derived Exosomes Facilitate Spinal Cord Function Recovery by Targeting Neurotoxic Astrocytes. *Stem Cell Research Therapy* **2022**, 13 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03116-3>.
- (20) Fu, W. L.; Zhang, J. Y.; Fu, X.; Duan, X. N.; Leung, K. K. M.; Jia, Z. Q.; Wang, W. P.; Zhou, C. Y.; Yu, J. K. Comparative Study of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Peripheral Blood of Rats. *Tissue Eng Part A* **2012**, 18 (17–18), 1793–1803. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0530>.

- (21) Beeravolu, N.; McKee, C.; Alamri, A.; Mikhael, S.; Brown, C.; Perez-Cruet, M.; Chaudhry, G. R. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, *2017* (122), 1–13. <https://doi.org/10.3791/55224>.
- (22) Novello, S.; Debouche, A.; Philippe, M.; Naudet, F.; Jeanne, S. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal Periodontal Research* **2020**, *55* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jre.12684>.
- (23) Hu, L.; Yin, C.; Zhao, F.; Ali, A.; Ma, J.; Qian, A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *International Journal Molecular Sciences* **2018**, *19* (2), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19020360>.
- (24) Le, H.; Xu, W.; Zhuang, X.; Chang, F.; Wang, Y.; Ding, J. Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Regeneration. *Journal Tissue Engineering* **2020**, *11*, 1–22. <https://doi.org/10.1177/2041731420943839>.
- (25) Liu, S. S.; Fang, X.; Wen, X.; Liu, J. S.; Alip, M.; Sun, T.; Wang, Y. Y.; Chen, H. W. How Mesenchymal Stem Cells Transform into Adipocytes: Overview of the Current Understanding of Adipogenic Differentiation. *World Journal Stem Cells* **2024**, *16* (3), 245–256. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v16.i3.245>.
- (26) Hempel, U.; Müller, K.; Preissler, C.; Noack, C.; Boxberger, S.; Dieter, P.; Bornhäuser, M.; Wobus, M. Human Bone Marrow Stromal Cells: A Reliable, Challenging Tool for In Vitro Osteogenesis and Bone Tissue Engineering Approaches. *International Journal stem cells* **2016**, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/7842191>.
- (27) Liu, S.; Liu, F.; Zhou, Y.; Jin, B.; Sun, Q.; Guo, S. Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors. *Frontiers immunology* **2020**, *11*, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01076>.
- (28) Keating, A. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell* **2012**, *10* (6), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>.
- (29) Augello, A.; Kurth, T. B.; de Bari, C. Mesenchymal Stem Cells: A Perspective from in Vitro Cultures to in Vivo Migration and Niches. *European Cells Materials* **2010**, *20*, 121–133. <https://doi.org/10.22203/eCM.v020a11>.
- (30) Moradian, H.; Fasehee, H.; Keshvari, H.; Faghihi, S. Poly(Ethyleneimine) Functionalized Carbon Nanotubes as Efficient Nano-Vector for Transfecting Mesenchymal Stem Cells. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *122*, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.056>.

- (31) Bydlowski, S. P.; Debes, A. A.; Maselli, L. M. F.; Janz, F. L. Características Biológicas Das Células-Tronco Mesenquimais. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia* **2009**, *31*, 25–35. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000038>.
- (32) Bajada, S.; Mazakova, I.; Richardson, J. B.; Ashammakhi, N. Updates on Stem Cells and Their Applications in Regenerative Medicine. *Journal Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2008**, *2* (4), 169–183. <https://doi.org/10.1002/term.83>.
- (33) Caplan, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine* **2017**, *6* (6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>.
- (34) Väänänen, H. K. Mesenchymal Stem Cells. *Annals Medicine* **2005**, *37* (7), 469–479. <https://doi.org/10.1080/07853890500371957>.
- (35) Xie, D.; Xu, Y.; Cai, W.; Zhuo, J.; Zhu, Z.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Lan, X.; Yan, H. Icariin Promotes Osteogenic Differentiation by Upregulating Alpha-Enolase Expression. *Biochemistry Biophysics Reports* **2023**, *34*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101471>.
- (36) Compston, J. E.; McClung, M. R.; Leslie, W. D. Osteoporosis. *The Lancet* **2019**, *393*, 364–376. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32112-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32112-3).
- (37) Madel, M. B.; Ibáñez, L.; Wakkach, A.; De Vries, T. J.; Teti, A.; Apparailly, F.; Blin-Wakkach, C. Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. *Frontiers Immunology* **2019**, *10*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01408>.
- (38) Halloran, D.; Durbano, H. W.; Nohe, A. Developmental Review Bone Morphogenetic Protein-2 in Development and Bone Homeostasis. *Journal Developmental Biology* **2020**, *8* (3), 1–30. <https://doi.org/10.3390/JDB8030019>.
- (39) Wu, Y.; Humphrey, M. B.; Nakamura, M. Osteoclasts - The Innate Immune Cells of the Bone. *Autoimmunity* **2008**, *41* (3), 183–194. <https://doi.org/10.1080/08916930701693180>.
- (40) Zhai, P.; Peng, X.; Li, B.; Liu, Y.; Sun, H.; Li, X. The Application of Hyaluronic Acid in Bone Regeneration. *International Journal Biological Macromolecules* **2020**, *151*, 1224–1239. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169>.
- (41) McBride, S. H.; McKenzie, J. A.; Bedrick, B. S.; Kuhlmann, P.; Pasteris, J. D.; Rosen, V.; Silva, M. J. Long Bone Structure and Strength Depend on BMP2 from Osteoblasts and Osteocytes, but Not Vascular Endothelial Cells. *PLoS One* **2014**, *9* (5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096862>.
- (42) Uchimura, T.; Komatsu, Y.; Tanaka, M.; McCann, K. L.; Mishina, Y. Bmp2 and Bmp4 Genetically Interact to Support Multiple Aspects of Mouse Development Including

- Functional Heart Development. *Genesis* **2009**, 47 (6), 374–384. <https://doi.org/10.1002/dvg.20511>.
- (43) Li, J.; Huang, J.; Shang, Y.; Yang, Z.; Lin, J.; Wang, H.; Article, R. Effects of Different Ratios of BMP2 and VEGFA on the Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Res Sq* **2023**, 1, 1–19. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2479996/v1>.
- (44) Wang, Y.; He, T.; Liu, J.; Liu, H.; Zhou, L.; Hao, W.; Sun, Y.; Wang, X. Synergistic Effects of Overexpression of BMP-2 and TGF-B3 on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Molecular Medicine Report* **2016**, 14 (6), 5514–5520. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5961>.
- (45) Langenbach, F.; Handschel, J. Effects of Dexamethasone, Ascorbic Acid and β -Glycerophosphate on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells in Vitro. *Stem Cell Research Therapy* **2013**, 4 (5), 1–7. <https://doi.org/10.1186/scrt328>.
- (46) Min, S. K.; Kim, M.; Park, J. Bone Morphogenetic Protein 2-Enhanced Osteogenic Differentiation of Stem Cell Spheres by Regulation of Runx2 Expression. *Experimental Therapeutic Medicine* **2020**, 20 (5), 1–7. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9206>.
- (47) Wang, E. A.; Rosen, V.; D'alessandro, J. S.; Bauduy, M.; Cordes, P.; Harada, T.; Israel, D. 1; Hewick, R. M.; Kerns, K. M.; Lapan, P.; Luxenberg, D. P.; Mcquaid, D.; Moutsatsos, I. K.; Nove, J.; Wozney, J. M. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein Induces Bone Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87 (6), 2220–2224. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.6.2220>.
- (48) Huang, Z.; Ren, P. G.; Ma, T.; Smith, R. L.; Goodman, S. B. Modulating Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells by Modifying Growth Factor Availability. *Cytokine* **2010**, 51 (3), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.06.002>.
- (49) Jiang, F.; Qi, X.; Wu, X.; Lin, S.; Shi, J.; Zhang, W.; Jiang, X. Regulating Macrophage-MSC Interaction to Optimize BMP-2-Induced Osteogenesis in the Local Microenvironment. *Bioactive Material* **2023**, 25, 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.001>.
- (50) Vater, C.; Kasten, P.; Stiehler, M. Culture Media for the Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. *Acta Biomater* **2011**, 7 (2), 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>.
- (51) Song, I. H.; Caplan, A. I.; Dennis, J. E. In Vitro Dexamethasone Pretreatment Enhances Bone Formation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vivo. *Journal of Orthopaedic Research* **2009**, 27 (7), 916–921. <https://doi.org/10.1002/jor.20838>.

- (52) Bernar, A.; Gebetsberger, J. V.; Bauer, M.; Streif, W.; Schirmer, M. Optimization of the Alizarin Red S Assay by Enhancing Mineralization of Osteoblasts. *International Journal Molecular Sciences* **2023**, *24* (1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010723>.
- (53) Infante, A.; Rodríguez, C. I. Osteogenesis and Aging: Lessons from Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Research Therapy* **2018**, *9*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0995-x>.
- (54) Wang, H.; Pang, B.; Li, Y.; Zhu, D.; Pang, T.; Liu, Y. Dexamethasone Has Variable Effects on Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* **2012**, *14* (4), 423–430. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.652735>.
- (55) Yevlashevskaya, O. S.; Scheven, B. A.; Walmsley, A. D.; Shelton, R. M. Differing Responses of Osteogenic Cell Lines to β -Glycerophosphate. *Scientific Report* **2023**, *13* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40835-w>.
- (56) Sordi, M. B.; Curtarelli, R. B.; da Silva, I. T.; Fongaro, G.; Benfatti, C. A. M.; de Souza Magini, R.; Cabral da Cruz, A. C. Effect of Dexamethasone as Osteogenic Supplementation in in Vitro Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Journal Materials Science: Materials in Medicine* **2021**, *32* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06475-6>.
- (57) Diederich, A.; Fründ, H. J.; Trojanowicz, B.; Navarrete Santos, A.; Nguyen, A. D.; Hoang-Vu, C.; Gernhardt, C. R. Influence of Ascorbic Acid as a Growth and Differentiation Factor on Dental Stem Cells Used in Regenerative Endodontic Therapies. *Journal Clinical Medicine* **2023**, *12* (3), 1–9. <https://doi.org/10.3390/jcm12031196>.
- (58) Thaler, R.; Khani, F.; Sturmlechner, I.; Dehghani, S. S.; Denbeigh, J. M.; Zhou, X.; Pichurin, O.; Dudakovic, A.; Jerez, S. S.; Zhong, J.; Lee, J. H.; Natarajan, R.; Kalajzic, I.; Jiang, Y. hui; Deyle, D. R.; Paschalis, E. P.; Misof, B. M.; Ordog, T.; van Wijnen, A. J. Vitamin C Epigenetically Controls Osteogenesis and Bone Mineralization. *Nature Communication* **2022**, *13* (1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32915-8>.
- (59) Bhandi, S.; Alkahtani, A.; Mashyakhy, M.; Abumelha, A. S.; Albar, N. H. M.; Renugalakshmi, A.; Alkahtany, M. F.; Robaian, A.; Almeslet, A. S.; Patil, V. R.; Varadarajan, S.; Balaji, T. M.; Reda, R.; Testarelli, L.; Patil, S. Effect of Ascorbic Acid on Differentiation, Secretome and Stemness of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Tooth (Sheds). *Journal Personalized Medicine* **2021**, *11* (7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jpm11070589>.
- (60) Chung, C.; Golub, E. E.; Forbes, E.; Tokuoka, T.; Shapiro, I. M. Calcified Tissue International Mechanism of Action of I-Glycerophosphate on Bone Cell

- Mineralization. *Calcified Tissue* **1992**, 51 (4), 305–311. <https://doi.org/10.1007/BF00334492>.
- (61) Sharifi, S.; Moghaddam, F. A.; Abedi, A.; Maleki Dizaj, S.; Ahmadian, S.; Abdolahinia, E. D.; Khatibi, S. M. H.; Samiei, M. Phytochemicals Impact on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *BioFactors* **2020**, 46, 874–893. <https://doi.org/10.1002/biof.1682>.
- (62) Santos, J. L.; Oramas, E.; Pêgo, A. P.; Granja, P. L.; Tomás, H. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Using PAMAM Dendrimers as Gene Delivery Vectors. *Journal of Controlled Release* **2009**, 134, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.11.007>.
- (63) Squillaro, T.; Peluso, G.; Galderisi, U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* **2016**, 25 (5), 829–848. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>.
- (64) Pichardo, A.; Wilm, B.; Liptrott, N. J.; Murray, P. Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Leads to an Inflammatory Response in the Lung. *Stem Cell International* **2023**, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2023/7397819>.
- (65) Ouboter, L. F.; Barnhoorn, M. C.; Verspaget, H. W.; Plug, L.; Pool, E. S.; Szuhai, K.; Hawinkels, L. J. A. C.; Van Pel, M.; Zwaginga, J. J.; Roelen, D.; Koning, F.; Fernanda Pascutti, M.; Van Der Meulen -De Jong, A. E. Local Administration of Mesenchymal Stromal Cells Is Safe and Modulates the Immune Compartment in Ulcerative Proctitis. *JCI Insight* **2023**, 8 (9), 1–14. <https://doi.org/10.1172/jci>.
- (66) Pandita, D.; Santos, J. L.; Rodrigues, J.; Pêgo, A. P.; Granja, P. L.; Tomás, H. Gene Delivery into Mesenchymal Stem Cells: A Biomimetic Approach Using Rgd Nanoclusters Based on Poly(Amidoamine) Dendrimers. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 472–481. <https://doi.org/10.1021/bm1012647>.
- (67) Chase LG; Lakshmipathy U.; Solchaga LA; Rao MS; Vemuri MC. A Novel Serum-Free Medium for the Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Research Therapy* **2010**, 1 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/scrt8>.
- (68) Liu, Y.; Fang, J. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Agents and Novel Carriers for the Delivery of Candidate Genes in Acute Kidney Injury. *Stem Cell International* **2020**, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/8875554>.
- (69) Reinwald, Y.; Bratt, J.; El Haj, A. Pluripotent Stem Cells and Their Dynamic Niche. In *Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic*; InTech, **2016**. <https://doi.org/10.5772/62671>.

- (70) Dvir, T.; Timko, B. P.; Kohane, D. S.; Langer, R. Nanotechnological Strategies for Engineering Complex Tissues. *Nat Nanotechnol* **2011**, *6* (1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.246>.
- (71) Hilfiker, A.; Kasper, C.; Hass, R.; Haverich, A. Mesenchymal Stem Cells and Progenitor Cells in Connective Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Is There a Future for Transplantation? *Langenbeck's Archives Surgery* **2011**, *396* (4), 489–497. <https://doi.org/10.1007/s00423-011-0762-2>.
- (72) Zhu, Y.; Ge, J.; Huang, C.; Liu, H.; Jiang, H. Application of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Aging Frailty: From Mechanisms to Therapeutics. *Theranostics* **2021**, *11* (12), 5675–5685. <https://doi.org/10.7150/thno.46436>.
- (73) Li, M.; Ikehara, S. Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells for Organ Repair. *Stem Cell International* **2013**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/132642>.
- (74) Aithal, A. P.; Bairy, L. K.; Seetharam, R. N. Safety and Therapeutic Potential of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stromal Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells investigation* **2021**, *8*, 1–11. <https://doi.org/10.21037/sci-2020-036>.
- (75) Rodríguez, D. E.; Fernández, L. E.; Samia, J. A.; Barrera, S. A.; Caplan, A. I.; Barrera, H. A. Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives Medical Research* **2021**, *52* (1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>.
- (76) Gugliandolo, A.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Parkinson's Disease Animal Models. *Current Research Translational Medicine* **2017**, *65* (2), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2016.10.007>.
- (77) Constantinescu, C. S.; Farooqi, N.; O'Brien, K.; Gran, B. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as a Model for Multiple Sclerosis (MS). *British Journal Pharmacology* **2011**, *164* (4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/bph.2011.164.issue-4>.
- (78) Sato, Y.; Araki, H.; Kato, J.; Nakamura, K.; Kawano, Y.; Kobune, M.; Sato, T.; Miyanishi, K.; Takayama, T.; Takahashi, M.; Takimoto, R.; Iyama, S.; Matsunaga, T.; Ohtani, S.; Matsuura, A.; Hamada, H.; Niitsu, Y. Human Mesenchymal Stem Cells Xenografted Directly to Rat Liver Are Differentiated into Human Hepatocytes without Fusion. *Blood* **2005**, *106* (2), 756–763. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0572>.
- (79) Jung, M.; Kim, H.; Hwang, J. W.; Choi, Y.; Kang, M.; Kim, C.; Hong, J.; Lee, N. K.; Moon, S.; Chang, J. W.; Choi, S. J.; Oh, S. Y.; Jang, H.; Na, D. L.; Kim, B. S. Iron Oxide Nanoparticle-Incorporated Mesenchymal Stem Cells for Alzheimer's Disease

- Treatment. *Nano Letter* **2023**, 23 (2), 476–490. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c03682>.
- (80) Hwang, J. J.; Rim, Y. A.; Nam, Y.; Ju, J. H. Recent Developments in Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Front Immunol* **2021**, 12, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631291>.
- (81) Oliveira, B. de A.; França, E. dos S.; Souza, V. G.; Vallinoto, A. C. R.; Silva, A. N. M. R. da. Vetores Virais Para Uso Em Terapia Gênica. *Rev Panamazonica Saude* **2018**, 9 (2). <https://doi.org/10.5123/s2176-62232018000200008>.
- (82) Valsalakumari, J.; Baby, J.; Bijin, E.; Constantine, I.; Manjila, S.; Pramod, K. Novel Gene Delivery Systems. *Int J Pharm Investig* **2013**, 3 (1), 1. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.108958>.
- (83) Wang, J.; Wang, H.; Zhao, P.; Chen, Z.; Lin, Q. Hyperbranched-Star PEI-g-PEG as a Nonviral Vector with Efficient Uptake and Hypotoxicity for Retinoblastoma Gene Therapy Application. *Colloids and Interface Science Communications* **2022**, 50, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2022.100647>.
- (84) Sharma, D.; Arora, S.; Singh, J.; Layek, B. A Review of the Tortuous Path of Nonviral Gene Delivery and Recent Progress. *Biological Macromolecules* **2021**, 183, 2055–2073. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.192>.
- (85) Layek, B.; Lipp, L.; Singh, J. Cell Penetrating Peptide Conjugated Chitosan for Enhanced Delivery of Nucleic Acid. *Molecular Sciences* **2015**, 16 (12), 28912–28930. <https://doi.org/10.3390/ijms161226142>.
- (86) Scheller, E. L.; Krebsbach, P. H. Gene Therapy: Design and Prospects for Craniofacial Regeneration. *Dental Research* **2009**, 88, 585–596. <https://doi.org/10.1177/0022034509337480>.
- (87) Vermeulen, L. M. P.; De Smedt, S. C.; Remaut, K.; Braeckmans, K. The Proton Sponge Hypothesis: Fable or Fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, 129, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.034>.
- (88) Zhang, W.; Chen, J.; Gu, J.; Bartoli, M.; Domena, J. B.; Zhou, Y.; C.L.B. Ferreira, B.; Kirbas Cilingir, E.; McGee, C. M.; Sampson, R.; Arduino, C.; Tagliaferro, A.; Leblanc, R. M. Nano-Carrier for Gene Delivery and Bioimaging Based on Pentaethylenhexamine Modified Carbon Dots. *Colloid Interface Science* **2023**, 639, 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.02.046>.

- (89) Wang, H. J.; Zhang, J.; Liu, Y. H.; Luo, T. Y.; He, X.; Yu, X. Q. Hyaluronic Acid-Based Carbon Dots for Efficient Gene Delivery and Cell Imaging. *RSC Adv* **2017**, *7* (25), 15613–15624. <https://doi.org/10.1039/c7ra01417a>.
- (90) Ibraheem, D.; Elaissari, A.; Fessi, H. Gene Therapy and DNA Delivery Systems. *International Journal Pharmaceutics* **2014**, *459*, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.041>.
- (91) Zhou, J.; Shao, Z.; Liu, J.; Duan, Q.; Wang, X.; Li, J.; Yang, H. From Endocytosis to Nonendocytosis: The Emerging Era of Gene Delivery. *ACS Applied Bio Material* **2020**, *3* (5), 2686–2701. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01131>.
- (92) Sabin, J.; Alatorre-Meda, M.; Miñones, J.; Domínguez-Arca, V.; Prieto, G. New Insights on the Mechanism of Polyethylenimine Transfection and Their Implications on Gene Therapy and DNA Vaccines. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2022**, *210*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112219>.
- (93) Valsalakumari, J.; Baby, J.; Bijin, E.; Constantine, I.; Manjila, S.; Pramod, K. Novel Gene Delivery Systems. *Pharmaceutical Investigation* **2013**, *3*, 1–7. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.108958>.
- (94) Nam, J. P.; Nah, J. W. Target Gene Delivery from Targeting Ligand Conjugated Chitosan-PEI Copolymer for Cancer Therapy. *Carbohydrate Polymer* **2016**, *135*, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.053>.
- (95) Degors, I. M. S.; Wang, C.; Rehman, Z. U.; Zuhorn, I. S. Carriers Break Barriers in Drug Delivery: Endocytosis and Endosomal Escape of Gene Delivery Vectors. *Accounts Chemical Research* **2019**, *52*, 1750–1760. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00177>.
- (96) Finbloom, J. A.; Sousa, F.; Stevens, M. M.; Desai, T. A. Engineering the Drug Carrier Biointerface to Overcome Biological Barriers to Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery* **2020**, *167*, 89–108. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.007>.
- (97) Vermeulen, L. M. P.; Brans, T.; De Smedt, S. C.; Remaut, K.; Braeckmans, K. Methodologies to Investigate Intracellular Barriers for Nucleic Acid Delivery in Non-Viral Gene Therapy. *Nano Today* **2018**, *21*, 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2018.06.007>.
- (98) Barbara, G.; Barbaro, M. R.; Fuschi, D.; Palombo, M.; Falangone, F.; Cremon, C.; Marasco, G.; Stanghellini, V. Inflammatory and Microbiota-Related Regulation of the Intestinal Epithelial Barrier. *Frontiers Nutrition* **2021**, *8*, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.718356>.

- (99) Claesson, L.; Dejana, E.; McDonald, D. M. Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Molecular Medicine* **2021**, *27*, 314–331. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.11.006>.
- (100) Tanaka, H. Y.; Kano, M. R. Stromal Barriers to Nanomedicine Penetration in the Pancreatic Tumor Microenvironment. *Cancer Scienc* **2018**, *109*, 2085–2092. <https://doi.org/10.1111/cas.13630>.
- (101) Yang, N. J.; Hinner, M. J. Getting across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. *Methods in molecular biology* **2015**, *1266*, 29–53. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_3.
- (102) Zeng, H.; Li, L.; Ding, Y.; Zhuang, Q. Simple and Selective Determination of 6-Thioguanine by Using Polyethylenimine (PEI) Functionalized Carbon Dots. *Talanta* **2018**, *178*, 879–885. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.087>.
- (103) Liu, C.; Zhang, P.; Zhai, X.; Tian, F.; Li, W.; Yang, J.; Liu, Y.; Wang, H.; Wang, W.; Liu, W. Nano-Carrier for Gene Delivery and Bioimaging Based on Carbon Dots with PEI-Passivation Enhanced Fluorescence. *Biomaterials* **2012**, *33* (13), 3604–3613. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.052>.
- (104) Deng, Y. H.; Chen, J. H.; Yang, Q.; Zhuo, Y. Z. Carbon Quantum Dots (CQDs) and Polyethyleneimine (PEI) Layer-by-Layer (LBL) Self-Assembly PEK-C-Based Membranes with High Forward Osmosis Performance. *Chemical Engineering Research and Design* **2021**, *170*, 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.04.026>.
- (105) Vicennati, P.; Giuliano, A.; Ortaggi, G.; Masotti, A. Polyethylenimine In Medicinal Chemistry. *Current Medicine Chemistry* **2008**, *15* (27), 2826–2839. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/092986708786242778>.
- (106) Casper, J.; Schenk, S. H.; Parhizkar, E.; Detampel, P.; Dehshahri, A.; Huwyler, J. Polyethylenimine (PEI) in Gene Therapy: Current Status and Clinical Applications. *Journal of Controlled Release* **2023**, *362*, 667–691. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.09.001>.
- (107) Gleede, T.; Reisman, L.; Rieger, E.; Mbarushimana, P. C.; Rugar, P. A.; Wurm, F. R. Aziridines and Azetidines: Building Blocks for Polyamines by Anionic and Cationic Ring-Opening Polymerization. *Polymers Chemistry* **2019**, *10* (24), 3257–3283. <https://doi.org/10.1039/c9py00278b>.
- (108) Pandey, A. P.; Sawant, K. K. Polyethylenimine: A Versatile, Multifunctional Non-Viral Vector for Nucleic Acid Delivery. *Materials Science and Engineering* **2016**, *68*, 904–918. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.066>.

- (109) Li, J.; Yu, X.; Shi, X.; Shen, M. Cancer Nanomedicine Based on Polyethylenimine-Mediated Multifunctional Nanosystems. *Progress Materials Science* **2022**, *124*, 1–36. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2021.100871>.
- (110) Pan, Z.; Kang, X.; Zeng, Y.; Zhang, W.; Peng, H.; Wang, J.; Huang, W.; Wang, H.; Shen, Y.; Huang, Y. A Mannosylated PEI-CPP Hybrid for TRAIL Gene Targeting Delivery for Colorectal Cancer Therapy. *Polymers Chemistry* **2017**, *8*, 5275–5285. <https://doi.org/10.1039/c7py00882a>.
- (111) Höbel, S.; Prinz, R.; Malek, A.; Urban-Klein, B.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Czubayko, F.; Aigner, A. Polyethylenimine PEI F25-LMW Allows the Long-Term Storage of Frozen Complexes as Fully Active Reagents in siRNA-Mediated Gene Targeting and DNA Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *70* (1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.03.014>.
- (112) Behr, J. The Proton Sponge: A Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *Chimia (Aarau)* **1997**, *51*, 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.2533/chimia.1997.34>.
- (113) Heli, B.; Younes, G. R.; Arguindeguy, K.; Ajji, A. Synthesis and Characterization of Antimicrobial Bacterial Cellulose Crosslinked with Branched Polyethylenimine. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2024**, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100457>.
- (114) Zhao, X.; Li, Z.; Pan, H.; Liu, W.; Lv, M.; Leung, F.; Lu, W. W. Enhanced Gene Delivery by Chitosan Disulfide Conjugated LMW-PEI for Facilitating Osteogenic Differentiation. *Acta Biomater* **2013**, *9* (5), 6694–6703. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.039>.
- (115) Boussif, O.; Lezoualc'ht, F.; Zanta, M. A.; Mergny, D.; Schermant, D.; Demeneix, B.; Behr, J.-P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine. *Biochemistry* **1995**, *92* (16), 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.
- (116) Rezaee, M.; Oskuee, R. K.; Nassirli, H.; Malaekheh-Nikouei, B. Progress in the Development of Lipopolyplexes as Efficient Non-Viral Gene Delivery Systems. *Journal of Controlled Release* **2016**, *236*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.023>.
- (117) Kong, T.; Zhou, R.; Zhang, Y.; Hao, L.; Cai, X.; Zhu, B. AS1411 Aptamer Modified Carbon Dots via Polyethylenimine Assisted Strategy for Efficient Targeted Cancer Cell Imaging. *Cell Prolif* **2020**, *53* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/cpr.12713>.
- (118) Meher, M. K.; Unnikrishnan, B. S.; Tripathi, D. K.; Packirisamy, G.; Poluri, K. M. Baicalin Functionalized PEI-Heparin Carbon Dots as Cancer Theranostic Agent.

Biological Macromolecules **2023**, *253*, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126846>.

- (119) Manzoor, S.; Talib, M.; Arsenin, A. V.; Volkov, V. S.; Mishra, P. Polyethyleneimine-Starch Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Carbon Dioxide Sensing at Room Temperature. *ACS Omega* **2022**, *8* (1), 893–906. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06243>.
- (120) Li, H.; Lv, W.; Zhang, Y.; Feng, Q.; Wu, H.; Su, C.; Shu, H.; Nie, F. PLGA-PEI Nanobubbles Carrying PDLIM5 siRNA Inhibit EGFR-TKI-Resistant NSCLC Cell Migration and Invasion Ability Using UTND Technology. *Drug Delivery Science Technology* **2023**, *82*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104346>.
- (121) Zhang, J.; Lei, W.; Meng, Y.; Zhou, C.; Zhang, B.; Yuan, J.; Wang, M.; Xu, D.; Meng, X.; Chen, W. Expression of PEI-Coated Gold Nanoparticles Carrying Exogenous Gene in Periwinkle Mesophyll Cells and Its Practice in Huanglongbing Research. *iScience* **2022**, *25* (6), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104479>.
- (122) Liu, J.; Li, R.; Yang, B. Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Central Sci* **2020**, *6* (12), 2179–2195. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01306>.
- (123) El-Shafey, A. M. Carbon Dots: Discovery, Structure, Fluorescent Properties, and Applications. *Green Processing and Synthesis* **2021**, *10* (1), 134–156. <https://doi.org/10.1515/gps-2021-0006>.
- (124) Zhai, Y.; Zhang, B.; Shi, R.; Zhang, S.; Liu, Y.; Wang, B.; Zhang, K.; Waterhouse, G. I. N.; Zhang, T.; Lu, S. Carbon Dots as New Building Blocks for Electrochemical Energy Storage and Electrocatalysis. *Advanced Energy Material* **2022**, *12* (6), 1–36. <https://doi.org/10.1002/aenm.202103426>.
- (125) Hebbar, A.; Selvaraj, R.; Vinayagam, R.; Varadavenkatesan, T.; Kumar, P. S.; Duc, P. A.; Rangasamy, G. A Critical Review on the Environmental Applications of Carbon Dots. *Chemosphere* **2023**, *313*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137308>.
- (126) Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *American Chemical Society* **2004**, *126* (40), 12736–12737. <https://doi.org/10.1021/ja040082h>.
- (127) Sharma, A.; Das, J. Small Molecules Derived Carbon Dots: Synthesis and Applications in Sensing, Catalysis, Imaging, and Biomedicine. *Nanobiotechnology* **2019**, *17* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0525-8>.

- (128) Hui, S. Carbon Dots (CDs): Basics, Recent Potential Biomedical Applications, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of Nanoparticle Research* **2023**, *25* (4), 1–44. <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05701-w>.
- (129) Biswal, M. R.; Bhatia, S. Carbon Dot Nanoparticles: Exploring the Potential Use for Gene Delivery in Ophthalmic Diseases. *Nanomaterials* **2021**, *11* (4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/nano11040935>.
- (130) Sun, Y. P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Pathak, P.; Meziani, M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B.; Veca, L. M.; Xie, S. Y. Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence. *American Chemical Society* **2006**, *128* (24), 7756–7757. <https://doi.org/10.1021/ja062677d>.
- (131) Li, H.; He, X.; Kang, Z.; Huang, H.; Liu, Y.; Liu, J.; Lian, S.; Tsang, C. H. A.; Yang, X.; Lee, S. T. Water-Soluble Fluorescent Carbon Quantum Dots and Photocatalyst Design. *Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (26), 4430–4434. <https://doi.org/10.1002/anie.200906154>.
- (132) Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging. *Angewandte Chemie - International Edition* **2013**, *52* (14), 3953–3957. <https://doi.org/10.1002/anie.201300519>.
- (133) Zhou, Y.; Zhang, W.; Leblanc, R. M. Structure-Property-Activity Relationships in Carbon Dots. *Journal of Physical Chemistry B* **2022**, *126* (51), 10777–10796. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.2c06856>.
- (134) Liu, W.; Li, C.; Ren, Y.; Sun, X.; Pan, W.; Li, Y.; Wang, J.; Wang, W. Carbon Dots: Surface Engineering and Applications. *Materials Chemistry B* **2016**, *4* (35), 5772–5788. <https://doi.org/10.1039/c6tb00976j>.
- (135) Zhang, R.; Hou, Y.; Sun, L.; Liu, X.; Zhao, Y.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Wang, L.; Li, R.; Wang, C.; Wu, X.; Li, B. Recent Advances in Carbon Dots: Synthesis and Applications in Bone Tissue Engineering. *Nanoscale* **2023**, *15* (7), 3106–3119. <https://doi.org/10.1039/d2nr05951g>.
- (136) Martins, I.; Tomás, H.; Lahoz, F.; Rodrigues, J. Engineered Fluorescent Carbon Dots and G4-G6 PAMAM Dendrimer Nanohybrids for Bioimaging and Gene Delivery. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (6), 2436–2450. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00232>.
- (137) Boakye-Yiadom, K. O.; Kesse, S.; Opoku-Damoah, Y.; Filli, M. S.; Aquib, M.; Joelle, M. M. B.; Farooq, M. A.; Mavlyanova, R.; Raza, F.; Bavi, R.; Wang, B. Carbon Dots: Applications in Bioimaging and Theranostics. *International Journal Pharmaceutics* **2019**, *564*, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.055>.

- (138) DENG, X. Y.; FENG, Y. L.; HE, D. S.; ZHANG, Z. Y.; LIU, D. F.; CHI, R. A. Synthesis of Functionalized Carbon Quantum Dots as Fluorescent Probes for Detection of Cu²⁺. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2020**, *48* (10), e20126–e20133. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(20\)60054-8](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(20)60054-8).
- (139) Arcudi, F.; Đorđević, L. Supramolecular Chemistry of Carbon-Based Dots Offers Widespread Opportunities. *Small* **2023**, *19* (31), 1–13. <https://doi.org/10.1002/smll.202300906>.
- (140) Qiao, Z. A.; Wang, Y.; Gao, Y.; Li, H.; Dai, T.; Liu, Y.; Huo, Q. Commercially Activated Carbon as the Source for Producing Multicolor Photoluminescent Carbon Dots by Chemical Oxidation. *Chemical Communications* **2010**, *46* (46), 8812–8814. <https://doi.org/10.1039/c0cc02724c>.
- (141) Rocco, D.; Moldoveanu, V. G.; Feroci, M.; Bortolami, M.; Vetica, F. Electrochemical Synthesis of Carbon Quantum Dots. *ChemElectroChem* **2023**, *10* (3), 1–15. <https://doi.org/10.1002/celec.202201104>.
- (142) Kaczmarek, A.; Hoffman, J.; Morgiel, J.; Mościcki, T. M.; Stobí Nski, L.; Szymá Nski, Z.; Małolepszy, A. Materials Luminescent Carbon Dots Synthesized by the Laser Ablation of Graphite in Polyethylenimine and Ethylenediamine. *Materials* **2021**, *14*, 1–13. <https://doi.org/10.3390/ma>.
- (143) Dang, H.; Huang, L. K.; Zhang, Y.; Wang, C. F.; Chen, S. Large-Scale Ultrasonic Fabrication of White Fluorescent Carbon Dots. *Industrial Engineering Chemistry Research* **2016**, *55* (18), 5335–5341. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b00894>.
- (144) Pan, M.; Xie, X.; Liu, K.; Yang, J.; Hong, L.; Wang, S. Fluorescent Carbon Quantum Dots-Synthesis, Functionalization and Sensing Application in Food Analysis. *Nanomaterials* **2020**, *10* (5), 1–25. <https://doi.org/10.3390/nano10050930>.
- (145) El-Shabasy, R. M.; Elsadek, M. F.; Ahmed, B. M.; Farahat, M. F.; Mosleh, K. M.; Taher, M. M. Recent Developments in Carbon Quantum Dots: Properties, Fabrication Techniques, and Bio-Applications. *Processes* **2021**, *9* (2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/pr9020388>.
- (146) Liu, Y.; Zhou, Q.; Yuan, Y.; Wu, Y. Hydrothermal Synthesis of Fluorescent Carbon Dots from Sodium Citrate and Polyacrylamide and Their Highly Selective Detection of Lead and Pyrophosphate. *Carbon N Y* **2017**, *115*, 550–560. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.01.035>.
- (147) Vibhute, A.; Patil, T.; Gambhir, R.; Tiwari, A. P. Fluorescent Carbon Quantum Dots: Synthesis Methods, Functionalization and Biomedical Applications. *Applied Surface Science Advances* **2022**, *11*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.apsadv.2022.100311>.

- (148) Li, R. L.; Zhao, Z. Bin; Leng, C. Y.; Li, Y.; Ai, L. S.; Sun, Y.; Wang, X. Z.; Qiu, J. S. Preparation of Carbon Dots from Carbonized Corncobs by Electrochemical Oxidation and Their Application in Na-Batteries. *Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Materials* **2023**, *38* (2), 347–355. [https://doi.org/10.1016/S1872-5805\(22\)60644-9](https://doi.org/10.1016/S1872-5805(22)60644-9).
- (149) Medeiros, T.; Manioudakis, J.; Noun, F.; Macairan, J. R.; Victoria, F.; Naccache, R. Microwave-Assisted Synthesis of Carbon Dots and Their Applications. *Materials Chemistry C* **2019**, *7* (24), 7175–7195. <https://doi.org/10.1039/c9tc01640f>.
- (150) Xu, J.; Cui, K.; Gong, T.; Zhang, J.; Zhai, Z.; Hou, L.; Zaman, F. U.; Yuan, C. Ultrasonic Assisted Synthesis of N-Doped, Multicolor Carbon Dots toward Fluorescent Inks, Fluorescence Sensors, and Logic Gate Operations. *Nanomaterials* **2022**, *12* (3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nano12030312>.
- (151) Naik, K.; Chaudhary, S.; Ye, L.; Parmar, A. S. A Strategic Review on Carbon Quantum Dots for Cancer-Diagnostics and Treatment. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology* **2022**, *10*, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.882100>.
- (152) Chahal, S.; Macairan, J. R.; Yousefi, N.; Tufenkji, N.; Naccache, R. Green Synthesis of Carbon Dots and Their Applications. *RSC Advance* **2021**, *11* (41), 25354–25363. <https://doi.org/10.1039/d1ra04718c>.
- (153) Cailotto, S.; Amadio, E.; Facchin, M.; Selva, M.; Pontoglio, E.; Rizzolio, F.; Riello, P.; Toffoli, G.; Benedetti, A.; Perosa, A. Carbon Dots from Sugars and Ascorbic Acid: Role of the Precursors on Morphology, Properties, Toxicity, and Drug Uptake. *ACS Medicinal Chemistry Letter* **2018**, *9* (8), 832–837. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00240>.
- (154) Kaur, P.; Verma, G. Converting Fruit Waste into Carbon Dots for Bioimaging Applications. *Materials Today Sustainability* **2022**, *18*, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2022.100137>.
- (155) Feng, Y.; Zhong, D.; Miao, H.; Yang, X. Carbon Dots Derived from Rose Flowers for Tetracycline Sensing. *Talanta* **2015**, *140*, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.038>.
- (156) Wang, T.; Luo, H.; Jing, X.; Yang, J.; Huo, M.; Wang, Y. Synthesis of Fluorescent Carbon Dots and Their Application in Ascorbic Acid Detection. *Molecules* **2021**, *26* (5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules26051246>.
- (157) *American Chemical Society*. Ascorbic acid. <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/ascorbic-acid.html> (accessed 2024-05-13).

- (158) Zhu, L.; Kong, W.; Ma, J.; Zhang, R.; Qin, C.; Liu, H.; Pan, S. Applications of Carbon Dots and Its Modified Carbon Dots in Bone Defect Repair. *Biological Engineering* **2022**, *16* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13036-022-00311-x>.
- (159) Ren, H. H.; Fan, Y.; Wang, B.; Yu, L. P. Polyethylenimine-Capped CdS Quantum Dots for Sensitive and Selective Detection of Nitrite in Vegetables and Water. *Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66* (33), 8851–8858. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01951>.
- (160) Şen, F. B.; Beğiç, N.; Bener, M.; Apak, R. Fluorescence Turn-off Sensing of TNT by Polyethylenimine Capped Carbon Quantum Dots. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2022**, *271*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.120884>.
- (161) Ding, H.; Wei, J. S.; Zhang, P.; Zhou, Z. Y.; Gao, Q. Y.; Xiong, H. M. Solvent-Controlled Synthesis of Highly Luminescent Carbon Dots with a Wide Color Gamut and Narrowed Emission Peak Widths. *Small* **2018**, *14* (22), 1–10. <https://doi.org/10.1002/sml.201800612>.
- (162) Jorns, M.; Pappas, D. A Review of Fluorescent Carbon Dots, Their Synthesis, Physical and Chemical Characteristics, and Applications. *Nanomaterials* **2021**, *11* (6), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano11061448>.
- (163) Singh, I.; Arora, R.; Dhiman, H.; Pahwa, R. Carbon Quantum Dots: Synthesis, Characterization and Biomedical Applications. *Pharmaceutical Sciences* **2018**, *15* (2), 219–230. <https://doi.org/10.4274/tjps.63497>.
- (164) Li, S.; Li, L.; Tu, H.; Zhang, H.; Silvester, D. S.; Banks, C. E.; Zou, G.; Hou, H.; Ji, X. The Development of Carbon Dots: From the Perspective of Materials Chemistry. *Materials Today* **2021**, *51*, 188–207. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2021.07.028>.
- (165) Das, S.; Mondal, S.; Ghosh, D. Carbon Quantum Dots in Bioimaging and Biomedicines. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology* **2023**, *11*, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1333752>.
- (166) John, B. K.; Abraham, T.; Mathew, B. A Review on Characterization Techniques for Carbon Quantum Dots and Their Applications in Agrochemical Residue Detection. *Journal Fluorescence* **2022**, *32* (2), 449–471. <https://doi.org/10.1007/s10895-021-02852-8>.
- (167) Hu, Q.; Gong, X.; Liu, L.; Choi, M. M. F. Characterization and Analytical Separation of Fluorescent Carbon Nanodots. *Nanomaterials* **2017**, *2017*, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2017/1804178>.
- (168) Yuan, W.; Dong, G.-Z.; Ning, H.; Guan, X.-X.; Cheng, J.-F.; Shi, Z.-W.; Du, X.-J.; Meng, S.-W.; Liu, D.-S.; Dong, Y.-C. Applying Dynamic Light Scattering to Investigate the

- Self-Assembly Process of DNA Nanostructures. *Chinese Chemical Letters* **2024**, *35* (3), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2023.108384>.
- (169) Feng, X.; Huang, G.; Qiu, J.; Peng, L.; Luo, K.; Liu, D.; Han, P. Dynamic Light Scattering in Flowing Dispersion. *Optics Communication* **2023**, *531*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2022.129225>.
- (170) Modena, M. M.; Rühle, B.; Burg, T. P.; Wuttke, S. Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials* **2019**, *31* (32), 1–26. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>.
- (171) Yuan, F.; Li, S.; Fan, Z.; Meng, X.; Fan, L.; Yang, S. Shining Carbon Dots: Synthesis and Biomedical and Optoelectronic Applications. *Nano Today* **2016**, *11* (5), 565–586. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.08.006>.
- (172) Barhoum, A.; Meftahi, A.; Kashef Sabery, M. S.; Momeni Heravi, M. E.; Alem, F. A Review on Carbon Dots as Innovative Materials for Advancing Biomedical Applications: Synthesis, Opportunities, and Challenges. *Materials Science* **2023**, *58* (34), 13531–13579. <https://doi.org/10.1007/s10853-023-08797-6>.
- (173) Kaurav, H.; Verma, D.; Bansal, A.; Kapoor, D. N.; Sheth, S. Progress in Drug Delivery and Diagnostic Applications of Carbon Dots: A Systematic Review. *Frontiers Chemistry* **2023**, *11*, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1227843>.
- (174) Shen, C. L.; Liu, H. R.; Lou, Q.; Wang, F.; Liu, K. K.; Dong, L.; Shan, C. X. Recent Progress of Carbon Dots in Targeted Bioimaging and Cancer Therapy. *Theranostics* **2022**, *12* (6), 2860–2893. <https://doi.org/10.7150/thno.70721>.
- (175) Shao, D.; Lu, M.; Xu, D.; Zheng, X.; Pan, Y.; Song, Y.; Xu, J.; Li, M.; Zhang, M.; Li, J.; Chi, G.; Chen, L.; Yang, B. Carbon Dots for Tracking and Promoting the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biomaterial Science* **2017**, *5* (9), 1820–1827. <https://doi.org/10.1039/c7bm00358g>.
- (176) Thakur, S.; Saini, R. V.; Thakur, N.; Sharma, R.; Das, J.; Slama, P.; Tuli, H. S.; Haque, S.; Niyazi, H. A.; Moulay, M.; Harakeh, S.; Saini, A. K. Chitosan-PEI Passivated Carbon Dots for Plasmid DNA and MiRNA-153 Delivery in Cancer Cells. *Heliyon* **2023**, *9*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21824>.
- (177) Bu, W.; Xu, X.; Wang, Z.; Jin, N.; Liu, L.; Liu, J.; Zhu, S.; Zhang, K.; Jelinek, R.; Zhou, D.; Sun, H.; Yang, B. Ascorbic Acid-PEI Carbon Dots with Osteogenic Effects as MiR-2861 Carriers to Effectively Enhance Bone Regeneration. *ACS Applied Materials Interfaces* **2020**, *12*, 50287–50302. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15425>.
- (178) Iuchi, K.; Oya, K.; Hosoya, K.; Sasaki, K.; Sakurada, Y.; Nakano, T.; Hisatomi, H. Different Morphologies of Human Embryonic Kidney 293T Cells in Various Types

- of Culture Dishes. *Cytotechnology* **2020**, 72 (1), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00363-w>.
- (179) Dumont, J.; Ewart, D.; Mei, B.; Estes, S.; Kshirsagar, R. Human Cell Lines for Biopharmaceutical Manufacturing: History, Status, and Future Perspectives. *Critical Reviews Biotechnology* **2016**, 36 (6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>.
- (180) Ayatollahi, M. Conditions to Improve Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells Based on Rat Samples. *World Journal Stem Cells* **2012**, 4 (1), 1–8. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v4.i1.1>.
- (181) Bonab, M. M.; Alimoghaddam, K.; Talebian, F.; Ghaffari, S. H.; Ghavamzadeh, A.; Nikbin, B. Aging of Mesenchymal Stem Cell in Vitro. *BMC Cell Biol* **2006**, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>.
- (182) PEGFPLuc Vector Information PT3347-5 (Catalog #6169-1); **2002**. www.clontech.com.
- (183) Nam, K. H. Fluorescent Protein-Based Metal Biosensors. *Chemosensors* **2023**, 11 (4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/chemosensors11040216>.
- (184) Dames, P.; Laner, A.; Maucksch, C.; Aneja, M. K.; Rudolph, C. Targeting of the Glucocorticoid Hormone Receptor with Plasmid DNA Comprising Glucocorticoid Response Elements Improves Nonviral Gene Transfer Efficiency in the Lungs of Mice. *Journal of Gene Medicine* **2007**, 9 (9), 820–829. <https://doi.org/10.1002/jgm.1082>.
- (185) Taheri, T.; Saberi Nik, H.; Seyed, N.; Doustdari, F.; Etemadzadeh, M. H.; Torkashvand, F.; Rafati, S. Generation of Stable L.Major (EGFP/LUC) and Simultaneous Comparison between EGFP and Luciferase Sensitivity. *Exp Parasitol* **2015**, 150, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.008>.
- (186) Tsien, R. Y. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review Biochemistry* **1998**, 67, 509–553. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>.
- (187) Olsson, D. C.; Pippi, L. N.; Raise, A. G.; Oliveira, G. K.; Treichel, T. L.; Salbego, F. Z. Marcadores Fluorescentes Coloidais Conceitos e Aplicações. *Ciência Rural* **2011**, 41 (6), 1043–1050. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000065>.
- (188) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Nilas, A. L. *Cell Viability Assays*; Markossian S, Grossman A, Arkin M, Eds.; **2013**.
- (189) Walker, J. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *Methods Molecular Biology* **1994**, 35, 5–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-X:5>. PMID: 7951748.

- (190) Zaia, D. A. M.; Thaïs, C.; Zaia, B. V.; Lichtig, J. Determinação de Proteínas Totais via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens Dos Métodos Existentes. *Quim Nova* **1998**, *21* (6). <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600020>.
- (191) Olson, B.; Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. *Protein Science* **2007**, 1–29. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>.
- (192) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Frovenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytica Biochemistry* **1985**, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- (193) Mehring, A.; Erdmann, N.; Walther, J.; Stiefelmaier, J.; Strieth, D.; Ulber, R. A Simple and Low-Cost Resazurin Assay for Vitality Assessment across Species. *Biotechnology* **2021**, *333*, 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.04.010>.
- (194) Kamiloglu, S.; Sari, G.; Ozdal, T.; Capanoglu, E. Guidelines for Cell Viability Assays. *Food Front* **2020**, *1* (3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>.
- (195) Xiao, S.; Castro, R.; Rodrigues, J.; Shi, X.; Tomá, H. PAMAM Dendrimer/PDHA Functionalized-Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Gene Delivery. *Biomedical Nanotechnology* **2014**, *11* (8), 1418–1430. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2101>.
- (196) Anoopkumar-Dukie, S.; Carey, J. B.; Conere, T.; O’Sullivan, E.; Van Pelt, F. N.; Allshire, A. Resazurin Assay of Radiation Response in Cultured Cells. *British Journal of Radiology* **2005**, *78* (934), 945–947. <https://doi.org/10.1259/bjr/54004230>.
- (197) Perrot, S.; Duterte-Catella, H.; Martin, C.; Rat, P.; Warnet, J. M. Resazurin Metabolism Assay Is a New Sensitive Alternative Test in Isolated Pig Cornea. *Toxicological Science* **2003**, *72* (1), 122–129. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg014>.
- (198) Lavogina, D.; Lust, H.; Tahk, M. J.; Laasfeld, T.; Vellama, H.; Nasirova, N.; Vardja, M.; Eskla, K. L.; Salumets, A.; Rincken, A.; Jaal, J. Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon. *Biosensors (Basel)* **2022**, *12* (4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/bios12040196>.
- (199) Loozen, L. D.; Kruyt, M. C.; Kragten, A. H. M.; Schoenfeldt, T.; Croes, M.; Oner, C. F.; Dhert, W. J. A.; Alblas, J. BMP-2 Gene Delivery in Cell-Loaded and Cell-Free Constructs for Bone Regeneration. *PLoS One* **2019**, *14* (7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220028>.
- (200) Raftery, R. M.; Mencía-Castaño, I.; Sperger, S.; Chen, G.; Cavanagh, B.; Feichtinger, G. A.; Redl, H.; Hacobian, A.; O’Brien, F. J. Delivery of the Improved BMP-2-Advanced Plasmid DNA within a Gene-Activated Scaffold Accelerates

- Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis and Critical Size Defect Repair. *Journal of Controlled Release* **2018**, *283*, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.022>.
- (201) Trivedi, S.; Srivastava, K.; Gupta, A.; Saluja, T. S.; Kumar, S.; Mehrotra, D.; Singh, S. K. A Quantitative Method to Determine Osteogenic Differentiation Aptness of Scaffold. *Oral Biology and Craniofacial Research* **2020**, *10* (2), 158–160. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2020.04.006>.
- (202) Schneider, M. R. Von Kossa and His Staining Technique. *Histochemistry Cell Biology* **2021**, *156* (6), 523–526. <https://doi.org/10.1007/s00418-021-02051-3>.
- (203) Fadlelmoula, A.; Pinho, D.; Carvalho, V. H.; Catarino, S. O.; Minas, G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines (Basel)* **2022**, *13* (2), 1–20. <https://doi.org/10.3390/mi13020187>.
- (204) Sayed, N.; Allawadhi, P.; Khurana, A.; Singh, V.; Navik, U.; Pasumarthi, S. K.; Khurana, I.; Banothu, A. K.; Weiskirchen, R.; Bharani, K. K. Gene Therapy: Comprehensive Overview and Therapeutic Applications. *Life Science* **2022**, *294*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120375>.
- (205) Kumar, A.; Dixit, C. K. Methods for Characterization of Nanoparticles. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*; Elsevier Inc., **2017**; pp 44–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>.
- (206) Titus, D.; James Jebaseelan Samuel, E.; Roopan, S. M. Nanoparticle Characterization Techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*; Elsevier, **2018**; pp 303–319. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>.
- (207) Smedt, S. C.; Demeester, J.; Hennink, W. E. Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems. *Pharm Res* **2000**, *17* (2), 1–14. <https://doi.org/10.1023/a:1007548826495>.
- (208) Shcharbin, D.; Pedziwiatr, E.; Bryszewska, M. How to Study Dendriplexes I: Characterization. *Journal of Controlled Release* **2009**, *135* (3), 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.015>.
- (209) Mady, M. M.; Mohammed, W. A.; El-Guendy, N. M.; Elsayed, A. A. Interaction of DNA and Polyethylenimine: Fourier-Transform Infrared (FTIR) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) Studies. *International Journal of Physical Sciences* **2011**, *6* (32), 7328–7334. <https://doi.org/10.5897/IJPS11.1005>.

- (210) Zhang, B.; Liu, C. Y.; Liu, Y. A Novel One-Step Approach to Synthesize Fluorescent Carbon Nanoparticles. *European Journal Inorganic Chemistry* **2010**, No. 28, 4411–4414. <https://doi.org/10.1002/ejic.201000622>.
- (211) Fritsh, R. J.; Krause, I. Electrophoresis. *Encyclopedia os food Science and Nutrition* **2003**, 2, 2055–2062. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01409-7>.
- (212) Green, M. R.; Sambrook, J. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocol* **2019**, 2019 (1), 6–15. <https://doi.org/10.1101/pdb.top100388>.
- (213) Kim, J.; Park, J.; Kim, H.; Singha, K.; Kim, W. J. Transfection and Intracellular Trafficking Properties of Carbon Dot-Gold Nanoparticle Molecular Assembly Conjugated with PEI-PDNA. *Biomaterials* **2013**, 34 (29), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.072>.
- (214) Ban, E.; Kim, A. PicoGreen Assay for Nucleic Acid Quantification - Applications, Challenges, and Solutions. *Analytica Biochemistry* **2024**, 692, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115577>.
- (215) McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols Immunology* **2018**, 1–16. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- (216) Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow Cytometry: Basic Principles and Applications. *Critical Review in Biotechnology* **2017**, 37 (2), 163–176. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>.
- (217) Lindenmeyer, M. T.; García-Piñeres, A. J.; Castro, V.; Merfort, I. Sesquiterpene Lactones Inhibit Luciferase but Not β -Galactosidase Activity in Vitro and Ex Vivo. *Analytica Biochemistry* **2004**, 328 (2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.01.021>.
- (218) Gonçalves, M.; Castro, R.; Rodrigues, J.; Tomás, H. The Effect of PAMAM Dendrimers on Mesenchymal Stem Cell Viability and Differentiation. *Current Medicina Chemistry* **2012**, 19, 4969–4975. <https://doi.org/10.2174/0929867311209024969>.
- (219) Tarazona, O. A.; Pourquié, O. Exploring the Influence of Cell Metabolism on Cell Fate through Protein Post-Translational Modifications. *Dev Cell* **2020**, 54 (2), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.035>.
- (220) Krause, U.; Seckinger, A.; Gregory, C. A. Assays of Osteogenic Differentiation by Cultured Human Mesenchymal Stem Cells. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., **2011**; Vol. 698, pp 215–230. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4_17.

- (221) Mechiche Alami, S.; Gangloff, S. C.; Laurent-Maquin, D.; Wang, Y.; Kerdjoudj, H. Concise Review: In Vitro Formation of Bone - Like Nodules Sheds Light on the Application of Stem Cells for Bone Regeneration . *Stem Cells Translational Medicine* **2016**, *5* (11), 1587–1593. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0413>.
- (222) Jørgensen, N. R.; Henriksen, Z.; Sørensen, O. H.; Civitelli, R. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-Dihydroxyvitamin D Enhance a More Differentiated Osteoblast Phenotype: Validation of an in Vitro Model for Human Bone Marrow-Derived Primary Osteoblasts. *Steroids* **2004**, *69* (4), 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.12.005>.

ANEXOS

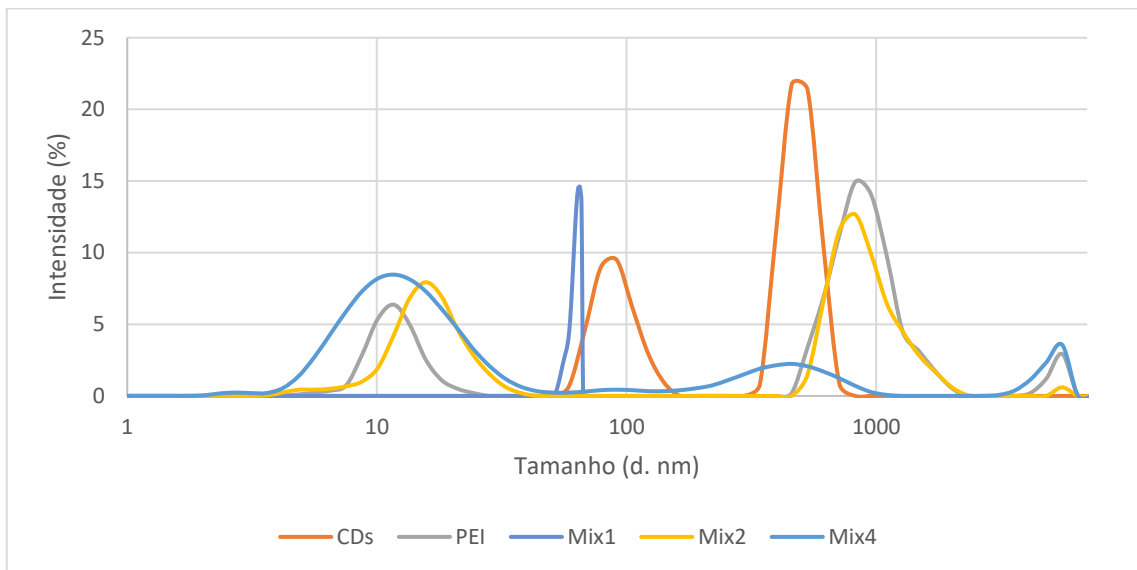


Figura A. 1. Percentagem (%) de intensidade dos nanoplexos CDs/PEI, assim como estes individualmente, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

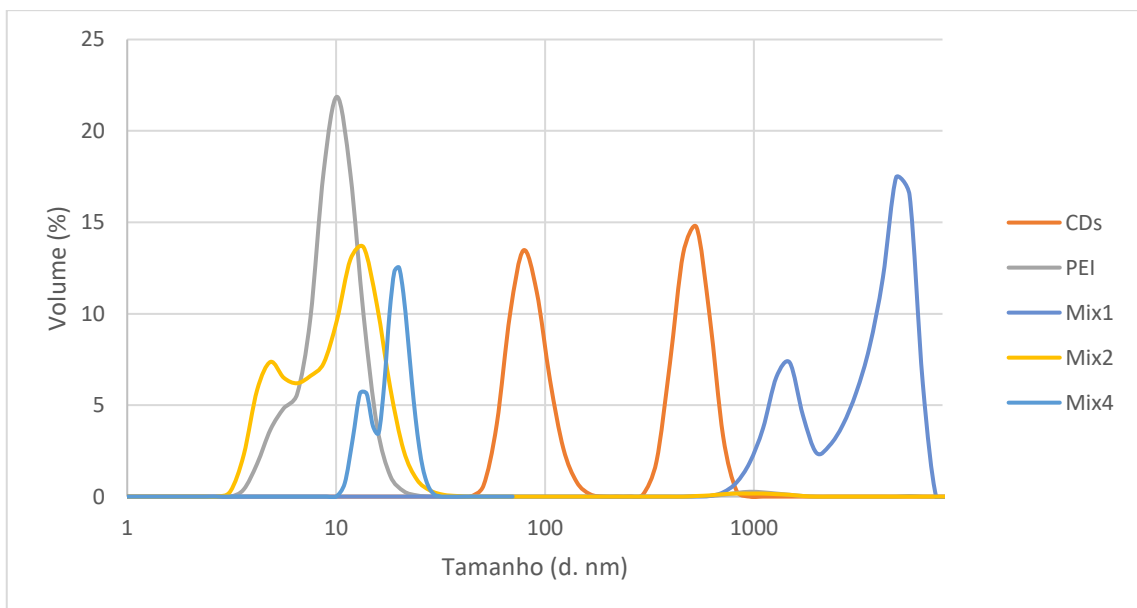


Figura A. 2. Percentagem (%) de volume dos nanoplexos CDs/PEI, assim como estes individualmente, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

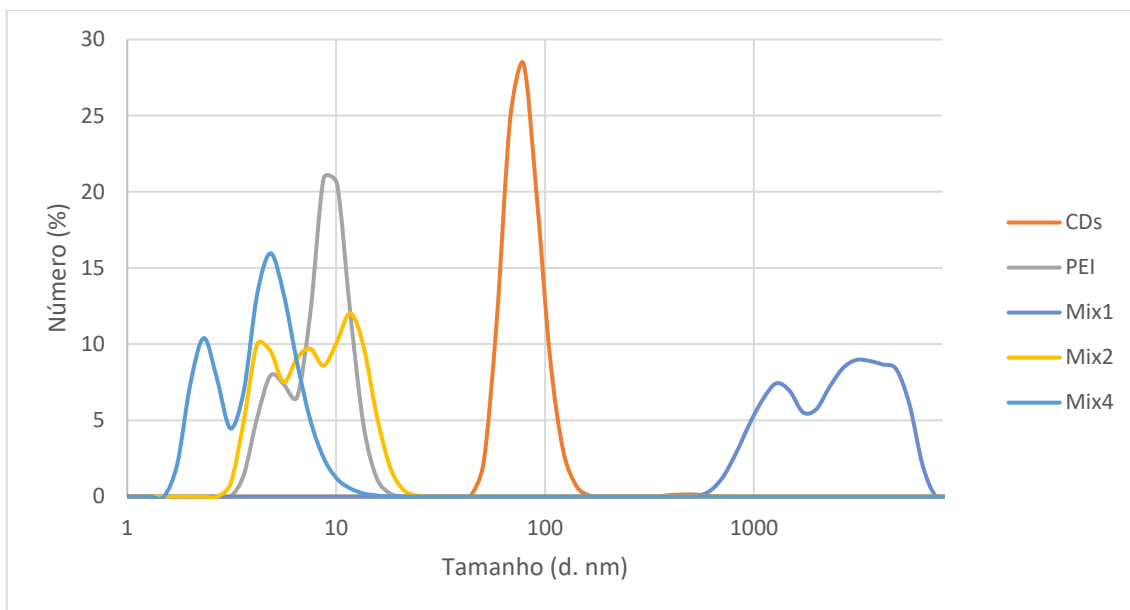


Figura A. 3. Percentagem (%) do número dos nanoplexos CDs/PEI, assim como estes individualmente, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

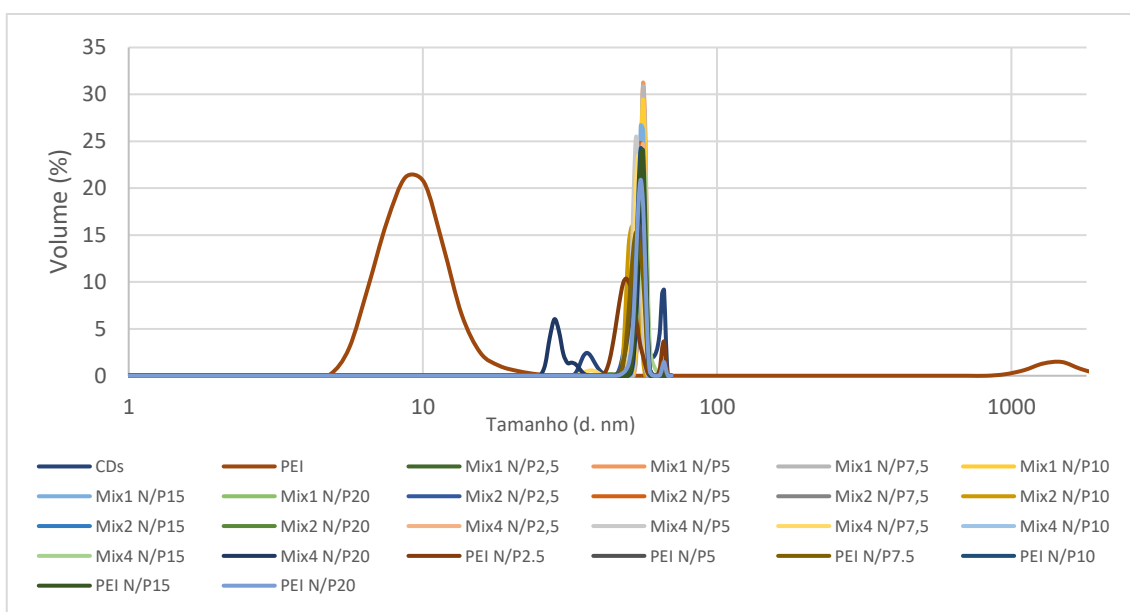


Figura A. 4. Percentagem (%) de volume dos nanoplexos com o pDNA, assim como dos CDs e PEI individualmente, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

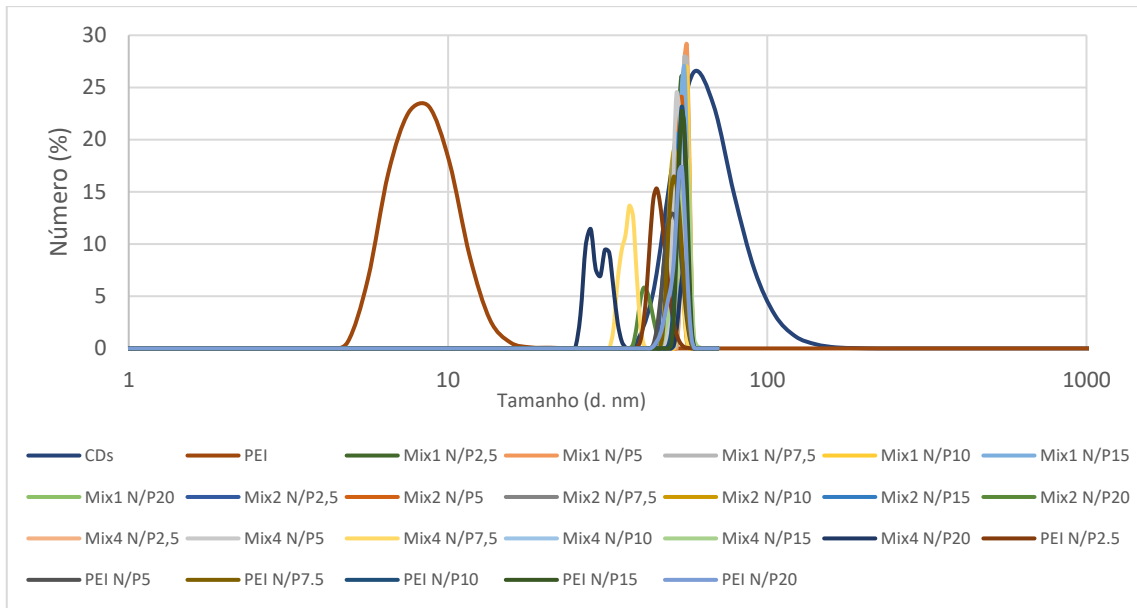


Figura A. 5. Percentagem (%) de número dos nanoplexos com o pDNA, assim como dos CDs e PEI individualmente, determinados por DLS. Os resultados provêm de medições em triplicado, independentes (n=3).

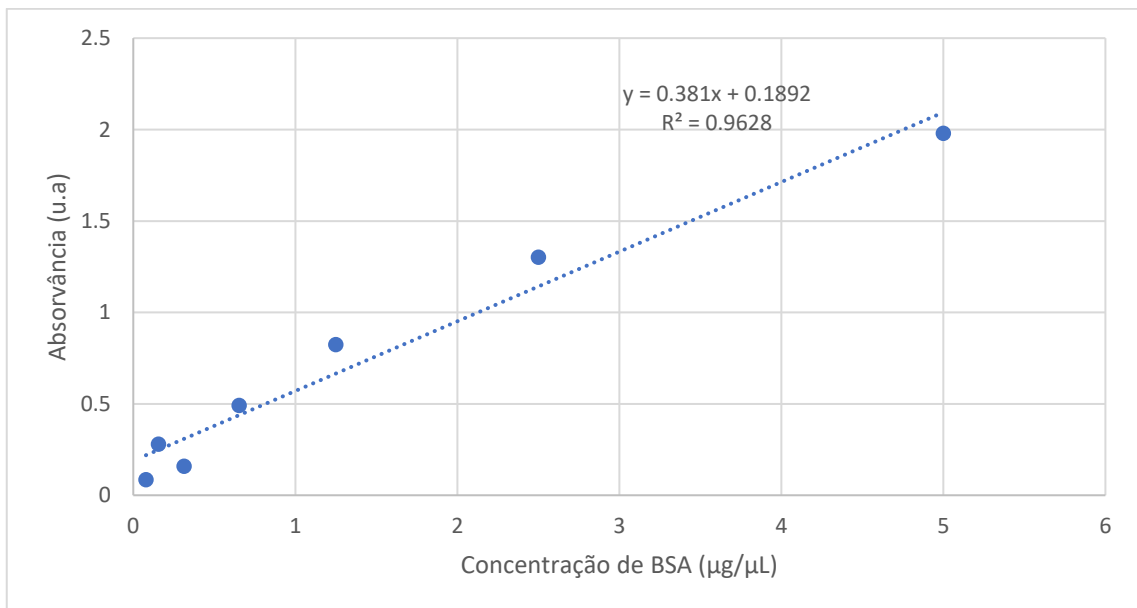


Figura A. 6. Retra padrão obtida pela construção do gráfico das absorvâncias do BSA vs concentração de BSA (µg/µL).

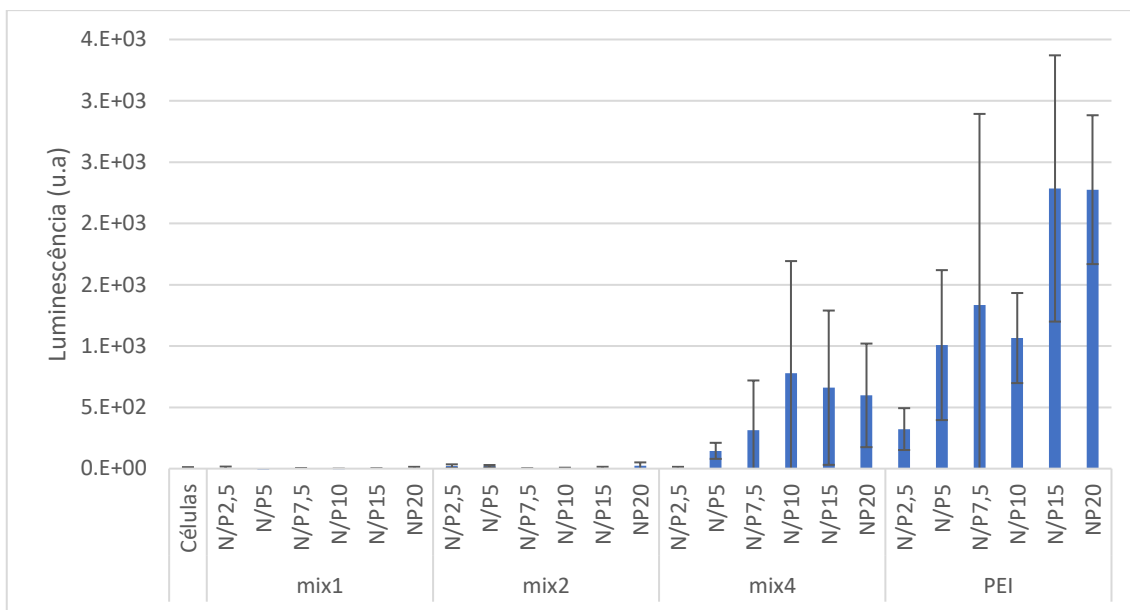


Figura A. 7. Avaliação da atividade da luciferase, nas células HEK293T, dos nanoplexos CDs/PEI em estudo, a diferentes razões N/P.

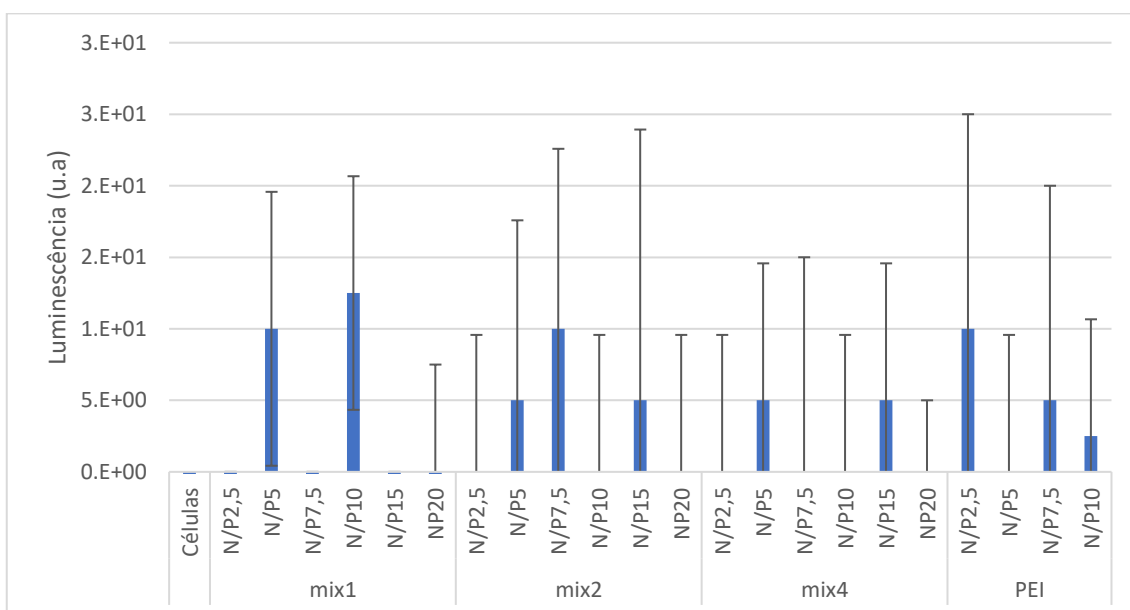


Figura A. 8. Avaliação da atividade da luciferase, nas hMSCs, dos nanoplexos CDs/PEI em estudo, a diferentes razões N/P.

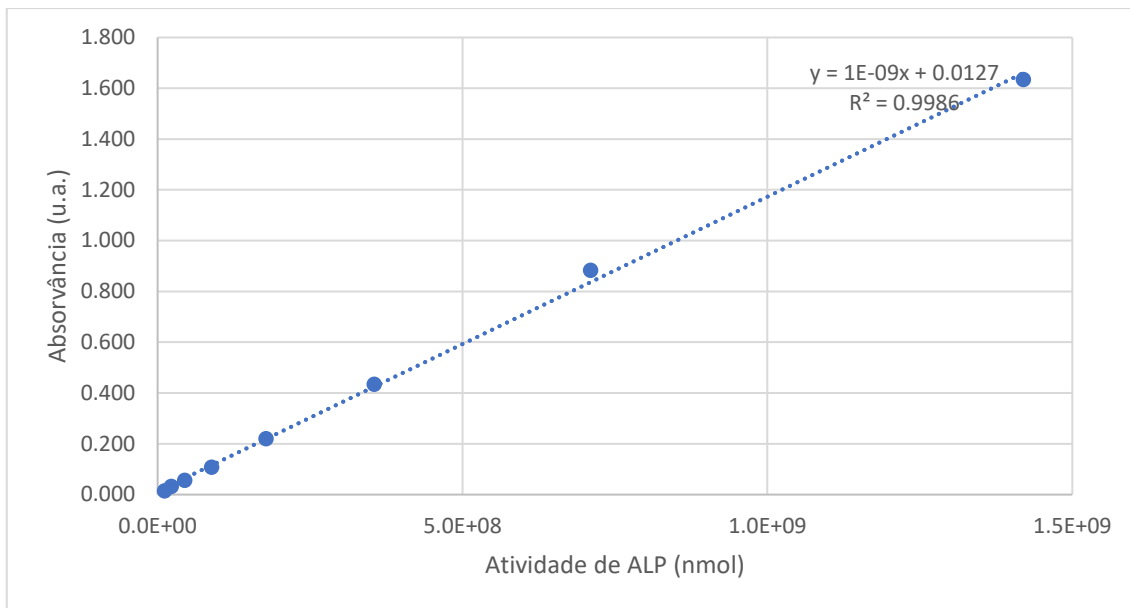


Figura A. 9. Retas padrão obtida pela construção do gráfico das absorvância do ALP vs atividade de ALP (nmol).

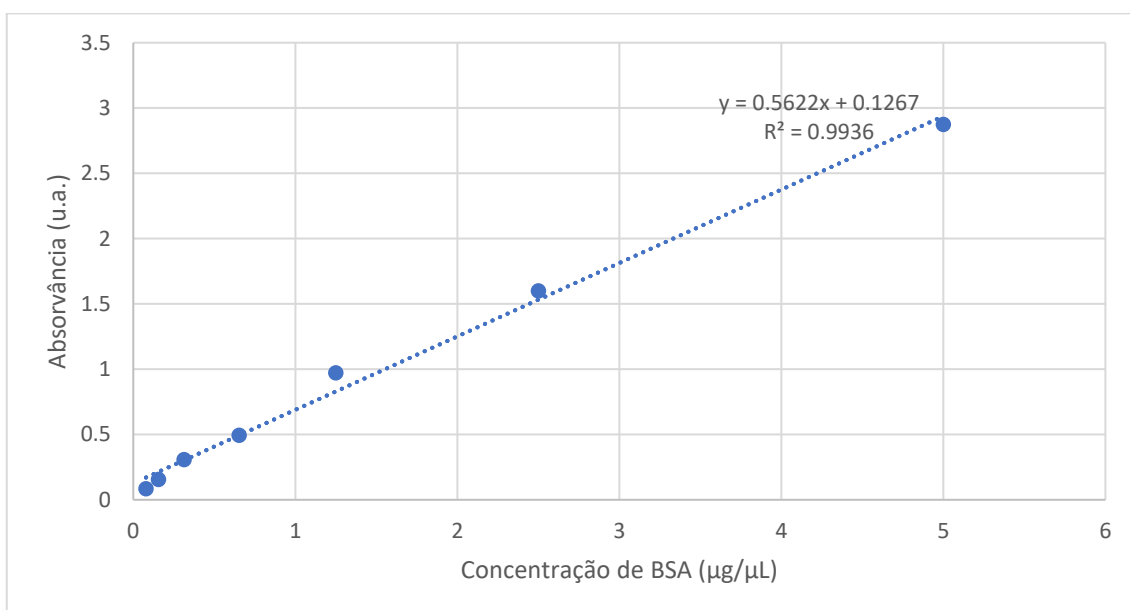


Figura A. 10. Retas de calibração obtida pela construção do gráfico das absorvâncias do BSA vs concentração de BSA (µg/µL).



