



Telmo Galvão Pereira

Licenciado em Biotecnologia

Development of new gene delivery carriers based on lipid nanoparticles

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Lídia Maria Diogo Gonçalves, Professora
Doutora, Faculdade de Farmácia, Universidade de
Lisboa

Co-orientador: António José Leitão das Neves Almeida,
Professor Doutor, Faculdade de Farmácia, Universidade
de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares

Arguente(s): Doutora Joana Marques Marto

Vogal(ais): Prof. Doutora Lídia Maria Diogo Gonçalves



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2017



Telmo Galvão Pereira

Licenciado em Biotecnologia

Development of new gene delivery carriers based on lipid nanoparticles

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientadora: Lúcia Maria Diogo Gonçalves, Professora
Doutora, Faculdade de Farmácia, Universidade de
Lisboa

Co-orientador: António José Leitão das Neves Almeida,
Professor Doutor, Faculdade de Farmácia, Universidade
de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguente(s): Doutora Joana Marques Marto
Vogal(ais): Prof. Doutora Lúcia Maria Diogo Gonçalves

Copyright

“Development of new gene carriers based on lipid nanoparticles”

Copyright © Telmo Galvão Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia, a Universidade Nova de Lisboa, a Faculdade de Farmácia, a Universidade de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar não podia deixar de agradecer à Doutora Lídia Gonçalves, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, por todos os conselhos, pelos “truques”, pela preocupação e por todo o conhecimento científico transmitido ao longo deste ano. Foi um ano de muita aprendizagem que sei que em muito contribuirá para a minha vida profissional futura. Um obrigado sincero por tudo isso, sem a sua ajuda este trabalho não teria sido possível.

Em seguida, gostaria de agradecer ao Professor Doutor António Almeida da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela oportunidade de ingressar neste trabalho, pelo voto de confiança e pela oportunidade de integrar neste grupo de investigação. Obrigado também por todo o conhecimento transmitido e toda a ajuda prestada.

Queria também agradecer a todos os investigadores do Pavilhão Almeida Ribeiro, os quais agora posso chamar de colegas, por me terem acolhido tão bem e por me terem ajudado sempre que precisei. Um especial obrigado ao Sérgio e a J pelas brincadeiras e pela amizade demonstrada.

Um agradecimento especial à minha colega de laboratório, companheira de luta e, como não podia deixar de ser, à grande amiga que é. Uma amiga que sempre me apoiou e ajudou quando precisei, mesmo quando tudo parecia não dar resultado. Sem ela aquelas viagens intermináveis ao Lumiar não teriam sido as mesmas. Um grande obrigado Marina.

Aos amigos que fiz na FCT e aos que trouxe da Covilhã, que tornaram a mudança de universidade uma experiência enriquecedora e que sempre me fizeram sentir em casa. Um especial obrigado à Vanessa, Daniela e Oleksandra, pela amizade que será para sempre.

Aos amigos de sempre deixo o meu especial obrigado, por todo o apoio, conselhos e força transmitida. Amizades como essas não são esquecidas e ficarão sempre comigo. Por tudo, e para sempre, um obrigado à Sara de Almeida, à Tânia e ao Ricardo.

Por último, gostaria de agradecer aos meus pais, por todo o apoio, por serem os meus pilares e por sempre acreditarem em mim. Não só de agora, mas de sempre e para sempre, pelo apoio incondicional e por me manterem no melhor caminho para me tornar na pessoa que hoje sou. Um especial obrigado também a minha pequena, que por mais que cresça, será sempre assim para mim, um obrigado Tânia.

Abstract

Gene therapy is a potential strategy for treating numerous gene-associated human diseases. The main constrain for the successful application of gene-based therapy is dependent on the efficient gene delivery system, virus being so far, the most effective. However, this delivery system can have oncogenic and immunogenic effects, and induce inflammatory responses. Thus, nanoparticulate non-viral vectors have been developed based on lipid and polymers overcoming some of these concerns, besides having safety advantages. Among these, solid lipid nanoparticles (SLNs) are of particular relevance due to their size, shape, surface properties, and biological behaviour, which can be easily modulated.

The SLN developed on this work comprise two lipids, glyceryl distearate and glyceryl monostearate, emulsified using poloxamer 188 as surfactant. The capacity of pDNA condensation was improved on the developed SLN by modulating its surface charge by two strategies: including a positive lipid or a cationic surfactant, along with and without the addition of a positive peptide. Both strategies were effective on the increase of surface charge with zeta potential values greater than +30 mV. The obtained SLN present a mean particle size lower than 200 nm, which remained stable after two-month storage at 4°C and at room temperature. The cell viability evaluated after 24 h exposure was higher than 70% when compared to culture medium for membrane integrity and metabolic activity. The higher pDNA condensation capacity of SLN was shown for particles with the addition of the peptide, being these particles selected for further transfection and uptake studies. With the internalization study, it has been proven that the particles were internalized by the cells, as confirmed by the GFP expression values obtained in the transfection assays.

These studies showed that all formulations were effective, suggesting the proposed SLN approaches can be used as potential delivery system suitable for gene therapy.

Key words: Gene therapy, non-viral vectors, nanoparticles, SLNs

Resumo

A terapia genética representa uma potencial estratégia para o tratamento de doenças humanas associadas a genes. A principal restrição a uma aplicação bem-sucedida é a utilização de um sistema eficiente de administração de genes, sendo os vírus até agora os mais eficazes. No entanto, estes estão associados a problemas oncogénicos e imunogénicos.

Assim, têm sido desenvolvidos vetores não-virais nanoparticulados baseados em lípidos e polímeros que superam algumas dessas limitações. Entre estes, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) destacam-se devido ao tamanho, forma e propriedades de superfície, que podem ser facilmente modulados.

No presente trabalho foram desenvolvidas SLNs usando dois lípidos, monoestearato e diestearato de glicerilo, emulsionados usando poloxamero 188 como tensioativo. O aumento da capacidade de condensação de pDNA (DNA plasmídico), foi alcançada modulando a carga superficial seguindo duas estratégias: a adição de um lípido com carga superficial positiva ou de um tensioativo catiónico. Foram, também, realizados ensaios com e sem a adição de um péptido positivo, adjuvante de transfecção.

Ambas as estratégias resultaram num aumento da carga, com valores de potencial zeta superiores a +30 mV e com tamanho de partícula inferiores a 200 nm. As suspensões permaneceram estáveis após dois meses de armazenamento a 4°C e à temperatura ambiente. Após exposição de 24 h a viabilidade celular foi superior a 70% quando comparada ao meio de cultura, sendo avaliada a integridade de membrana como a atividade metabólica. A maior capacidade de condensação de pDNA foi alcançada nas partículas com péptido, sendo estas selecionadas para estudos de internalização e transfecção. Posteriormente verificou-se que as partículas eram internalizadas pelas células, sendo esta condição comprovada pelos valores da expressão da GFP (Green Fluorescence Protein), obtidos nos ensaios de transfecção.

Este estudo mostrou que todas as formulações foram eficazes, sugerindo que as abordagens propostas para as SLN podem ser usadas como potenciais sistemas de entrega para terapia genética.

Palavras-chave: Terapia genética, vetores não-virais, nanopartículas, SLNs

Índice

Capítulo 1 – Introdução	- 1 -
1.1. Terapia genética.....	- 1 -
1.2. Internalização celular e barreiras biológicas	- 2 -
1.3. Interações celulares e nanotoxicologia	- 4 -
1.4. Transportadores de material genético.....	- 5 -
1.4.1. Transportadores Virais	- 5 -
1.4.2. Transportadores não-virais	- 6 -
1.5. Nanomedicina e nanotecnologia	- 7 -
1.6. Nanopartículas (NPs)	- 7 -
1.7. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs).....	- 8 -
1.7.1. Métodos de produção.....	- 10 -
1.7.2. Composição das SLNs	- 11 -
1.7.2.1. Lípidos	- 11 -
1.7.2.2. Tensioativos	- 12 -
1.7.3. Caracterização.	- 12 -
1.7.4. Modificações das propriedades das SLNs	- 13 -
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	- 14 -
2.1. Materiais	- 14 -
2.2. Métodos	- 14 -
2.2.1. Produção das nanopartículas.....	- 14 -
2.2.1.1. Método de preparação	- 14 -
2.2.1.2. Seleção do tensioativo	- 15 -
2.2.1.3. Seleção de lípidos	- 15 -
2.2.1.4. Tempo de homogeneização	- 16 -
2.2.2. Modificação da carga de superfície.....	- 16 -
2.2.3. Caracterização das nanopartículas (tamanho e carga da superfície)	- 16 -
2.2.4. Caracterização morfológica.....	- 17 -
2.2.5. Estudos de viabilidade celular	- 17 -
2.2.6. Produção e purificação de plasmídeo com expressão de GFP	- 18 -
2.2.6.1. Produção de células de E.coli competentes e transformação com pGFP	- 18 -
2.2.6.2. Produção e purificação do plasmídeo pGFP.....	- 19 -
2.2.6.3. Preparação de géis de agarose	- 19 -
2.2.7. Ensaio de condensação de pDNA.....	- 20 -
2.2.8. Ensaio de internalização	- 20 -
2.2.8.1. Microscopia de fluorescência	- 21 -
2.2.9. Ensaio de transfecção	- 21 -
2.2.10. Hemólise.....	- 22 -
2.2.11. Estudos de estabilidade	- 22 -
2.2.11.1. Efeito da temperatura	- 22 -

2.2.11.2. Efeito da liofilização.....	- 23 -
2.2.11.3. Efeito das condições biológicas.....	- 23 -
2.2.12. Análise estatística de dados.....	- 24 -
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	- 25 -
3.1. Produção de Solid Lipid Nanoparticles (SLN).....	- 25 -
3.1.1. Influência do método de preparação.....	- 25 -
3.1.2. Escolha do tensioativo.....	- 26 -
3.1.3. Escolha do lípido.....	- 27 -
3.1.4. Tempo de homogeneização.....	- 28 -
3.2. Modificação das propriedades das SLNs.....	- 28 -
3.2.1. Modificação da carga superficial.....	- 28 -
3.2.1.1. Adição de um lípido secundário.....	- 29 -
3.2.1.2. Adição de um co-tensioativo.....	- 31 -
3.3. Estudos de viabilidade celular.....	- 35 -
3.3.1. Ensaio a 4h.....	- 35 -
3.3.2. Ensaio a 6h.....	- 36 -
3.3.3. Ensaio a 24h.....	- 38 -
3.4. Purificação do DNA plasmídico.....	- 40 -
3.5. Ensaio de condensação.....	- 41 -
3.5.1. Ensaio fluorométrico.....	- 41 -
3.5.2. Gel de agarose.....	- 43 -
3.6. Ensaio de internalização.....	- 44 -
3.6.1. Microscopia de fluorescência.....	- 45 -
3.7. Ensaio de transfecção.....	- 46 -
3.7.1. Microscopia de fluorescência.....	- 47 -
3.8. Hemólise.....	- 48 -
3.9. Estudos de estabilidade.....	- 50 -
3.9.1. Efeito da temperatura.....	- 50 -
3.9.1.1. Efeito da temperatura a 4°C e à temperatura ambiente.....	- 50 -
3.9.1.2. Efeito da temperatura a 37°C.....	- 53 -
3.9.2. Efeito da liofilização.....	- 54 -
3.9.3. Efeito das condições biológicas.....	- 54 -
3.9.3.1. Estabilidade em SBF.....	- 55 -
3.10. Caracterização morfológica.....	- 56 -
Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas futuras	- 58 -
Capítulo 5 - Referências	- 60 -

Índice de figuras

Fig. 1 Internalização de partículas durante o processo de transfecção	- 2 -
Fig. 2 Representação da estrutura de uma SLN	- 9 -
Fig. 3 Internalização de iodeto de propídio após 4h de exposição	- 35 -
Fig. 4 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 4h de exposição	- 36 -
Fig. 5 Internalização de iodeto de propídio após 6h de exposição.	- 36 -
Fig. 6 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 6h de exposição	- 37 -
Fig. 7 Internalização de iodeto de propídio após 24h de exposição.	- 38 -
Fig. 8 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 24h de exposição	- 38 -
Fig. 9 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 24h de exposição	- 39 -
Fig. 10 Gel de agarose após 1h de corrida a 70mV	- 41 -
Fig. 11 Gel de agarose após 1h de corrida a 70mV	- 43 -
Fig. 12 Quantificação da absorção celular in vitro das SLNs carregadas com coumarina-6.	- 44 -
Fig. 13 Imagens (100x) de microscopia de fluorescência.	- 46 -
Fig. 14 Expressão de GFP normalizada com a percentagem de células viáveis	- 47 -
Fig. 15 Imagens (100x) de microscopia de fluorescência células HEK293T.	- 48 -
Fig. 16 Placa de 96 poços com as amostras testadas para hemólise	- 49 -
Fig. 17 Tamanho médio e Pdl de SLNs recém-preparadas e após 1, 2 e 3 meses de armazenamento em suspensão a 4°C e temperatura ambiente	- 50 -
Fig. 18 Potencial zeta de SLNs recém-preparadas e após 3 meses com armazenamento em suspensão a 4°C e temperatura ambiente.....	- 51 -
Fig. 19 Tamanho médio e Pdl de SLNs recém-preparadas e após 1, 2 e 3 meses de armazenamento em suspensão a 4°C e temperatura ambiente	- 51 -
Fig. 20 Potencial zeta de SLNs recém-preparadas e finalizados os testes de estabilidade com armazenamento em suspensão a 4°C e temperatura ambiente	- 52 -
Fig. 21 Tamanho médio e Pdl de SLNs recém-preparadas e após 2 horas a 37°C	- 53 -
Fig. 22 Potencial zeta de SLNs recém-preparadas e após 2 horas a 37°C	- 53 -
Fig. 23 Tamanho médio e Pdl de SLNs recém-preparadas e após 24 horas em suspensão em PBS	- 55 -
Fig. 24 Tamanho médio e Pdl de SLNs recém-preparadas e após 24 horas em suspensão em SBF.....	- 55 -
Fig. 25 Caracterização morfológica por TEM	- 56 -

Índice de tabelas

Tabela 1 Soluções de tensioativos testadas para a produção de SLNs.	15 -
Tabela 2 Lipidos testados para a produção de SLNs.	16 -
Tabela 3 Tempos de homogeneização testados e variações de massa lipídica	16 -
Tabela 4 Reagentes utilizados para a modulação de carga superficial das SLNs	16 -
Tabela 5 Reagentes utilizados para a preparação de células competentes de E. coli.	19 -
Tabela 6 Composição do tampão TBE	20 -
Tabela 7 Soluções de crio-protetores utilizadas para a liofilização e respectivas concentrações..	23 -
Tabela 8 Reagentes utilizados na produção de 1000mL de solução de SBF.....	23 -
Tabela 9 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de Precirol® e Compritol® produzidas para os dois métodos de produção testados	25 -
Tabela 10 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de Precirol® produzidas para os dois tensioativos testados	26 -
Tabela 11 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs produzidas com os diversos lípidos testados.....	27 -
Tabela 12 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta das SLNs de Precirol® produzidas com diferentes tempos de homogeneização e várias massas de lípido	28 -
Tabela 13 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs produzidas com diferentes lípidos testados e estearilamina	29 -
Tabela 14 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para SLNs de Precirol® produzidas e diferentes massas de estearilamina.....	30 -
Tabela 15 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para SLNs de Precirol® e Geleol™ produzidas com diferentes massas de estearilamina.....	30 -
Tabela 16 Soluções de tensioativo utilizadas para a modulação da carga superficial das SLNs. -	31 -
Tabela 17 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de Precirol® com diferentes soluções de tensioativo	31 -
Tabela 18 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para SLNs de Precirol® com diferentes soluções de tensioativo (n=3, média ± DP).....	32 -
Tabela 19 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta SLNs de Precirol® produzidas e CTAB.....	33 -
Tabela 20 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta SLNs de Precirol®, CTAB/SA e protamina (0,01%)	34 -
Tabela 21 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de Geleol™ com CTAB/SA e protamina (0,01%)	34 -
Tabela 22 Composição das amostras de SLNs otimizadas	35 -
Tabela 23 Quantificação e grau de pureza após ensaio de purificação de pDNA.....	40 -
Tabela 24 Composição das SLNs utilizadas nos ensaios de condensação	42 -
Tabela 25 Percentagem de pGFP livre e condensado.....	42 -

Tabela 26 Resultados de condensação de pGFP para 10, 20 e 40µL de partículas.....	- 43 -
Tabela 27 Composição das SLNs selecionadas após os ensaios de condensação	- 44 -
Tabela 28 Percentagem de hemólise	- 49 -

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
BZ	Cloreto de Benzalconio
CTAB	Brometo de cetil trimetilamónia
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
F127	Pluronic® F127
F68	Pluronic® F68
FDA	Food and Drug Administration
GFP	Green fluorescence protein
GL	Geleol™
GRAS	Generally recognize as safe
IW	Inwitor 491®
NP	Nanopartículas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PdI	Índice de polidispersão
pDNA	DNA plasmídico
PE	Precirol®
PEI	Polietilenimina
PI	Iodeto de propídio
PRT	Sulfato de protamina
RNA	Ácido ribonucleico
SA	Estearilamina
SBF	Simulated body fluid
SLN	Solid lipid nanoparticles
ST	Ácido esteárico
TA	Temperatura ambiente
TEM	Transmission electron microscopy
TSB	Meio caldo de soja trípico

Objetivos

O objetivo global e principal da presente tese consistiu na produção, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de novos sistemas de entrega de genes, com base em nanopartículas sólidas lipídicas.

Objetivos específicos foram:

- Otimização da produção das nanopartículas;
- Modulação das propriedades de superfície das nanopartículas formadas;
- Caracterização físico-química das nanopartículas;
- Avaliação das estabilidade físico-química sobre condições ambientais relevantes;
- Avaliação da eficiência dos vetores produzidos;

Este trabalho encontra-se organizado em quatro capítulos principais e respectivas referências, incluindo: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, e Conclusões e Perspetivas futuras.

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Terapia genética

Com o avanço científico atual, grandes desenvolvimentos têm vindo a ser realizados no campo das tecnologias de ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante, simplificando assim a manipulação de sequências de ácido nucleico [1]. Com isso, tanto sequências de DNA como de ácido ribonucleico (RNA) são cada vez mais aplicadas em vários campos científicos, como o caso específico da terapia genética.

Trata-se uma terapia baseada no uso e entrega de material genético, seja ele DNA ou RNA, em células-alvo específicas. Para que os tratamentos sejam eficazes e seguros, deve haver uma resposta clínica efetiva. Esta resposta é conseguida através da entrada e acumulação de material genético nas células alvo em concentrações apropriadas [2]. Isto levará à indução da apoptose ou à reparação de anormalidades genéticas verificadas a nível molecular. Por outras palavras, a libertação localizada de material genético induz a inibição de genes indesejáveis ou a expressão de proteínas terapêuticas úteis na luta contra a anomalia genética verificada [3]–[5].

Este tipo de terapia tem-se tornado numa das perspetivas mais promissoras no futuro da medicina molecular, representando um papel de destaque no alívio ou cura de muitas doenças sem terapêutica eficaz, tanto ao nível de doenças hereditárias como doenças sistêmicas adquiridas [6].

Atualmente apresenta-se como uma das áreas com maior interesse científico, sendo cada vez mais proposta para avaliação num grande número de ensaios clínicos [3]. É considerada uma terapia inovadora, uma vez que, em vez de se concentrar apenas nos sintomas, atua diretamente na raiz da doença, aumentando assim a eficácia dos tratamentos [7].

Esta é uma abordagem que traz consigo novas estratégias para o diagnóstico, tratamento e prevenção de numerosas doenças, como por exemplo, cancro, esclerose múltipla entre tantas outras, indo muito além da eficácia dos tratamentos existentes, como a radioterapia e a quimioterapia [4], [8], [9].

Em estudos iniciais, e surgindo como uma das primeiras formas de terapia genética, recorreu-se à administração direta de DNA por via intravenosa no local de interesse [10]. No entanto, no que diz respeito ao material genético utilizado com esta terapia, deve ser tida em conta a carga negativa dos ácidos nucleicos, visto que estes não possuem a habilidade inata de penetrar a membrana celular e, conseqüentemente, terem capacidade para entrar no núcleo das células alvo, levando a baixos níveis de transfecção.

Assim, diversos tipos de transportadores têm vindo a ser desenvolvidos de forma a tornar possível a entrega de material genético nas células [5], [11]. Os transportadores tornam-se assim um dos pontos fulcrais para o sucesso da terapia genética, visto que a sua baixa eficiência trará limitações para a terapia [2], [3], [12].

Independentemente do tipo de transportador, estes devem ser desenvolvidos tendo em conta duas premissas. No que diz respeito ao seu funcionamento, não devem ser tóxicos para o organismo e devem ser capazes de transportar de forma eficiente material genético que não seja original do próprio organismo [4], [5], [13].

1.2. Internalização celular e barreiras biológicas

Para garantir o sucesso da terapia genética, a entrega de agentes terapêuticos deve ser assegurada pelos complexos transportadores e para tal, estes devem estar na proximidade das células alvo. Posteriormente, devem ter a capacidade de libertar o material genético no núcleo para que assim este seja codificado, tornando os transportadores eficazes para a execução de terapia genética [14], [15].

No entanto, para que isso ocorra, os complexos formados pelos transportadores e ácidos nucleicos devem superar uma série de barreiras biológicas, mantendo-se estáveis, desde a sua administração até à entrega do agente terapêutico [16].

A internalização celular é considerada a primeira barreira à entrada nas células já que pode influenciar as ações que ocorrem ao nível celular. O processo de internalização diz respeito não só à interação entre complexos e células alvo, mas também à interação entre o transportador e o material genético [17].

Este processo consiste na ligação do complexo terapêutico à bicamada de fosfolípidos da membrana celular, através de interações electrostáticas, levando à sua ingestão e à consequente libertação do material genético transportado no citoplasma ou no núcleo das células alvo para que possa alcançar a maquinaria celular [2], [18].

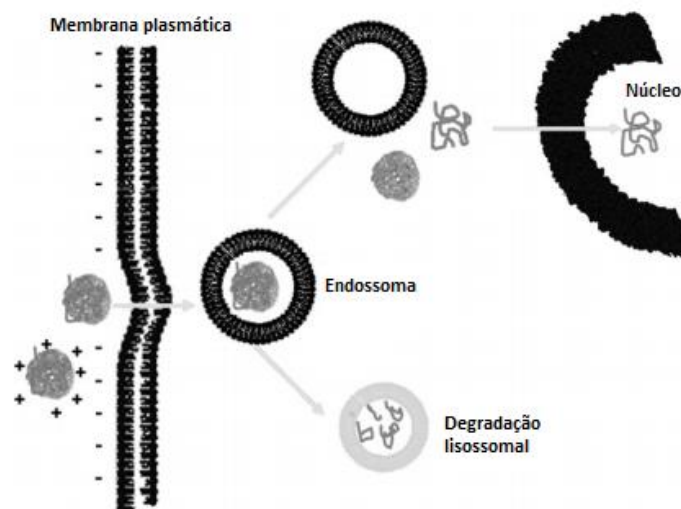


Fig. 1 Internalização de partículas durante o processo de transfecção por interações electrostáticas com a membrana plasmática. Adaptada de [24]

A internalização é dependente de diversos fatores, entre eles o tipo de célula, a carga superficial e forma do transportador, assim como o respetivo tamanho. É um processo difícil que é específico tanto para células como transportadores, levando a que os mesmos complexos sejam internalizados de forma diferente em diferentes tipos de célula ou até no

mesmo tipo. Além disso, à medida que o número de partículas que são internalizadas aumenta, mais difícil se torna a internalização.

Para que a internalização ocorra, esta pode seguir uma de duas vias, pelas vias não-endocíticas ou vias endocíticas.

A endocitose, além dos aspectos inerentes a qualquer via de internalização, apresenta também como ponto crucial a transferência dos genes do endossoma para o citosol, antes de ocorrer a fusão com lisossomas [12], [18]. Tratando-se do mecanismo celular de entrada mais comum, inclui os processos de fagocitose, micro-pinocitose, endocitose mediada por clatrina e endocitose mediada por caveolina [12], [17]. Trata-se também da via de internalização que apresenta maior vantagem, já que a entrega de genes é efetuada para mais próximo do local de transcrição em comparação com outras vias [19].

Idealmente, os complexos terapêuticos utilizados na terapia genética devem ter tamanho inferior a 200 nm. Com esse tamanho, a sua internalização e acumulação em células alvo ocorrem em meia hora ou até menos tempo. Estudos realizados indicam que geralmente complexos terapêuticos com estes tamanhos são internalizados preferencialmente através de endocitose mediada por clatrina. Em contraste, complexos de tamanho superiores a 200nm são internalizados pela via de endocitose mediada por caveolina, processo que ocorre em horas [14].

No que diz respeito a tamanhos superiores a 1000 nm não se registra qualquer internalização por estes mecanismos de endocitose, mas sim através de mecanismos de fagocitose, através da ação fagócitos [20].

Em termos de barreiras além da internalização celular, os complexos terapêuticos devem enfrentar outras, tais como:

- Opsonização;
- Distribuição não específica;
- Limitações de fluxo de vasos sanguíneos;
- Degradação de ácidos nucleicos no espaço extracelular por nucleases;
- Dissociação do complexo terapêutico [11], [21], [22].

A internalização de ácidos nucleicos nus já aplicada em estudos anteriores revelou não ser muito eficiente. Os ácidos nucleicos são polianions de fosfato que quando são administrados de forma independente, são rapidamente removidos da circulação sanguínea. Essa remoção ocorre através de degradação enzimática ou através do metabolismo hepático, e deve-se sobretudo às cargas negativas que possuem. Além da degradação a que estão sujeitos, do ponto de vista termodinâmico, a elevada densidade eletrônica que possuem torna o processo desfavorável [2], [23]. Por esta razão, a investigação tem-se focado no desenvolvimento de transportadores, de modo que a internalização e todas as outras barreiras à entrada de complexos terapêuticos possam ser ultrapassadas antes da síntese do material genético codificado assim, assegurando-se a eficácia da terapia [24].

1.3. Interações celulares e nanotoxicologia

Para que a internalização das nanopartículas (NPs) seja possível deverá haver interação entre a superfície das partículas e os componentes biológicos. Estas compreendem interações físico-químicas dinâmicas, assim como trocas termodinâmicas e cinéticas entre as superfícies envolvidas [25].

Por norma, uma maior internalização está associada a uma maior eficácia da terapia aplicada. No entanto, com o seu aumento também existem mais interações entre as NPs e os componentes sub-celulares. Consequentemente, esse aumento de interações, leva à estimulação de diversas vias de sinalização que por sua vez levam ao aumento do stress celular o que poderá provocar danos em organelos ou até morte celular [26]. A internalização tem assim um papel de destaque para uma avaliação correta da potencial toxicidade das NPs.

Assim, associado às interações nano-bio, e como principal consequência surge a nanotoxicologia. Esta diz respeito a uma das áreas da toxicologia, que tendo em conta as propriedades físico-químicas dos nanomateriais, avaliando a sua biocompatibilidade, tanto a nível crónico como agudo. A nanotoxicologia diverge para a área de toxicologia convencional na medida em que, devido ao pequeno tamanho apresentado pelas NPs, estas se comportam de forma diferente, resultando em um perfil tóxico distinto.

No que diz respeito aos fatores que influenciam a toxicidade das NPs, estes encontram-se divididos em dois conjuntos. Aqueles que se relacionam intrinsecamente com as NPs, sejam eles por exemplo a forma, composição, carga ou tamanho de partícula. Em especial, o tamanho das NPs representa uma grande influência, na avaliação da toxicidade. Devido ao tamanho reduzido das partículas, estas representam um grande desafio já que têm a capacidade de induzir toxicidade mesmo a baixas concentrações, durante uma exposição crónica *in vivo*.

O outro conjunto diz respeito aos aspetos relacionados com a aplicação da NPs, como por exemplo a presença de opsoninas, a interação com o meio de cultura ou a adsorção a superfícies celulares [27].

1.3.1. Citotoxicidade

Quando se realizam estudos com potenciais vetores para a entrega de genes, do ponto de vista farmacológico, os ensaios de citotoxicidade ganham um papel de destaque. Estes servem como primeira avaliação da resposta celular à exposição destes agentes para as condições experimentais em uso. Através dos ensaios de citotoxicidade torna-se possível verificar quais os intervalos de dosagem mais apropriados, e assim poder elaborar uma terapia mais eficaz e principalmente mais segura.

São geralmente ensaios indicadores de danos celulares, existindo uma variedade de diferentes ensaios disponíveis para caracterizar o potencial citotóxico do composto estudado. Por norma, melhores resultados são obtidos quando vários indicadores são testados e

analisados. Estes indicadores podem incluir avaliação da integridade da membrana celular, o estado metabólico da célula entre outros.

1.4. Transportadores de material genético

Apesar dos avanços científicos que ocorreram nas últimas duas décadas na terapia genética, ainda existem muitos obstáculos a serem superados para difundir a aplicação da terapia em doenças humanas, tornando-a numa terapia totalmente aceite pela comunidade científica.

Para que a terapia genética seja eficaz, deve existir uma entrega eficiente do material genético, o que facilitará a internalização celular e o processamento intracelular das moléculas exógenas [28]. Para tal, um dos pontos largamente estudados tem sido o desenvolvimento de transportadores para o transporte de material genético.

Idealmente, um transportador deve ter um baixo potencial antigénico, uma elevada capacidade de incorporar e proteger o material genético que transporta, bem como possuir uma elevada eficiência de transdução [2], [13]. Também deve ser seguro para o meio ambiente e para o paciente e ainda apresentar baixos custos de produção [15].

Levando em consideração todos esses fatores, os avanços científicos têm tomado dois rumos distintos para o desenvolvimento de dois diferentes tipos de transportadores, os virais e não-virais, tendo sempre em conta as respetivas vantagens e desvantagens dos dois tipos de transportadores.

1.4.1. Transportadores Virais

A maioria dos transportadores virais foca-se essencialmente na aplicação de transportadores de forma direta e local nos locais afetados.

Estes são compostos por vírus geneticamente alterados, ou seja, possuem o genoma modificado de forma a prevenir replicações virais, reduzir a citotoxicidade e permitir a incorporação do material genético terapêutico [21].

Estes transportadores podem compreender vários vírus, nomeadamente derivados de vírus naturais, como é o caso dos adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, poxvírus e herpes-vírus, cada um apresentando as suas próprias vantagens e limitações [4]. Os adenovírus são os mais utilizados, uma vez que são os mais eficientes para a transfecção e os que apresentam maior capacidade de realizar a fuga endossomal através de mecanismos especializados [7].

Apesar da elevada eficácia que apresentam mesmo com o uso de uma única partícula viral na administração, vários estudos pré-clínicos demonstraram que esta é dependente da via de administração. Sendo a administração sistémica que garante o alcance de um índice terapêutico significativo, isso implica uma forte resposta imunológica, bem como uma toxicidade significativa, factos que devem ser superados [9], [21], [29]. Além da forte resposta

imunológica, a inserção deste tipo de vetores pode levar a alterações mutacionais, assim como ao aumento do risco de oncogenicidade [30].

Outro dos principais problemas deste tipo de transportador é a sua baixa especificidade no tecido alvo. Essa falta de especificidade pode levar a problemas de imunotoxicidade, que pode ser agravada pela necessidade de uma administração continuada. Além disso, são transportadores que carregam cargas genéticas baixas (<5Kbp) quando comparados com outros tipos de transportadores e que apresentam uma grande dificuldade na adaptação à produção à escala industrial [7], [30].

Apesar das vantagens que possam apresentar, todos os aspectos anteriormente descritos impõem um limite à dose terapêutica aplicada, limitando assim a sua utilização e eficácia dos transportadores virais [3], [29].

1.4.2. Transportadores não-virais

Nos últimos anos, com vista a fazer frente às desvantagens apresentadas pelos vetores virais, um novo tipo de vetor tem sido estudado como uma alternativa, os vetores não virais.

Sendo estudados de forma intensiva para aplicações em terapia genética, tratam-se de transportadores maioritariamente compostos por lípidos ou polímeros catiónicos [12]. A sua ação é baseada na introdução deliberada de material genético simples ou complexo em células alvo com moléculas transportadoras sintéticas, recorrendo a princípios utilizados na nanotecnologia. Na sua maioria são usados componentes catiónicos que interagem com ácidos nucleicos carregados negativamente, estabelecendo interações eletrostáticas, sendo assim possível a condensação do material genético com o respetivo transportador.

Apesar da menor eficiência que apresentam, quando comparados com os transportadores virais, estes vetores apresentam muitas vantagens em termos de segurança e versatilidade, destacando-se a diminuição de complicações patogénicas provenientes da sua administração, o que torna mais segura uma possível administração sistémica deste tipo de vetor [31], [32]. Estas propriedades são possíveis, uma vez que são sujeitos a um controlo rigoroso da sua composição, com as seguintes vantagens adicionais:

- Produção e análise simplificadas;
- Flexibilidade no tamanho do material genético a ser entregue;
- Baixa imunogenicidade;
- Biocompatibilidade;
- Grande capacidade de encapsulamento de genes [3], [11], [17].

Associado a estas vantagens, e a grande estabilidade que apresentam tanto a nível químico como a nível físico, os vetores não virais, têm-se tornado numa perspetiva promissora para sistemas de entrega de genes.

1.5. Nanomedicina e nanotecnologia

Numerosos sistemas de entrega de genes foram estudados até ao momento, mas ainda existem muitos obstáculos a serem superados.

Para uma execução eficaz na entrega de agentes terapêuticos há que ter em conta que a maioria dos locais de interesse à terapia está acessível apenas através de microcirculação pelos capilares sanguíneos ou pelos poros presentes nas diversas superfícies celulares e membranares. Assim, esses locais, tanto a nível celular e como sub-celular, apenas estão acessíveis a agentes terapêuticos à escala nanométrica [33].

Levando em consideração o desafio de usar a terapia genética e romper as barreiras existentes à entrega de genes para um local específico, e tendo em consideração o tamanho exigido para os agentes terapêuticos, surge a nanomedicina associada ao uso de estruturas baseadas em nanotecnologia.

Trata-se de uma área interdisciplinar que envolve uma variedade de campos de estudo, em que se exploram as características notáveis dos nanomateriais [1].

A sua aplicação tem por principal objetivo a entrega de agentes terapêuticos, que apresentem baixa toxicidade, especificidade e elevada taxa de libertação [34]. Além disso, fornece novas formas de investigação para superar todos os obstáculos inerentes aos métodos utilizados para a entrega dos agentes terapêuticos, sejam eles fármacos ou material genético.

Com a aprovação dos nano-fármacos pela Food and Drug Administration (FDA), a nanomedicina tem tido um papel muito importante na luta contra doenças sem terapêutica eficaz, representando assim um caminho promissor, através do uso de partículas à nanoescala, com implicações na entrega de genes [4].

A nanomedicina, que resulta da junção da medicina com a nanotecnologia, é uma área da tecnologia com o potencial para revolucionar a forma como são desenvolvidas novas terapias, assim como levar à otimização das atuais [35]. A sua pesquisa tem recaído recentemente em diferentes tipos de biomateriais e nanomateriais, especialmente as NPs coloidais e não coloidais, que desempenham cada vez mais um papel proeminente.

1.6. Nanopartículas (NPs)

Tendo em conta esses aspetos, a terapia de genes através do uso de NPs tornou-se uma das áreas mais investigadas e de mais rápido desenvolvimento nos últimos anos. Em farmácia o termo nanopartícula refere-se a um sistema específico de entrega de agentes terapêuticos, onde o tamanho médio de partícula se encontra entre os 1 e 1000 nm [35].

As NPs são integradas por células de forma mais eficaz que as micropartículas, tornando-se assim veículos ideais para aplicações em áreas como oncologia, diagnóstico de doenças genéticas ou para uma entrega mais eficiente de agentes terapêuticos [36].

A sua eficácia está diretamente relacionada com o seu tamanho, o que lhes permite uma penetração mais fácil nas membranas celulares, bem como a ligação e a evasão à degradação dos lisossomas após a endocitose. Possibilita também uma maior proteção contra

a degradação ácida e enzimática, conduzindo a um aumento do tempo de circulação na corrente sanguínea dos complexos terapêuticos [16].

As NPs podem ser compostas de metais, fosfolípidos, polímeros ou lípidos, sendo as lipídicas amplamente estudadas, levando a avanços significativos para sua aplicação em terapias que envolvem a entrega local de material genético [35].

O transporte de genes, dependendo da constituição e método de preparação das NPs, pode ser realizado encapsulando o plasmídeo ou formando complexos através de interações electrostáticas levando a uma adsorção na superfície das nanopartículas por conjugação ou armadilha de polímero modificado [15].

Todos esses sistemas, independentemente do tipo de partícula utilizada ou da sua constituição, tal como referido anteriormente têm várias barreiras que devem ser superadas, como a estabilidade física e química do DNA e do seu veículo de entrega, a internalização celular pela endocitose, a fuga dos endossomas antes da fusão com os lisossomas e a transferência para através do invólucro nuclear para que ocorra a transcrição. Por esta razão, todos os sistemas de administração de genes são produzidos de forma a superar as barreiras existentes, a fim de aumentar a eficiência e eficácia dos tratamentos.

A sua eficácia muitas vezes pode ser aumentada por modificações de superfície ou por conjugação com biomoléculas que melhorem o processo.

Os vários tipos de NPs descritos podem classificar-se em dois grupos distintos: sistemas líquidos que incluem lipossomas, micelas e micro- /nanoemulsões, compostos por moléculas anfifílicas ou poliméricas e sistemas sólidos que incluem as NPs compostas por lípidos, polissacarídeos, poliésteres, ou outros polímeros biodegradáveis, assim como metais nobres (Au, Ag) ou óxidos de metais magnéticos (Fe).

A par com as NPs lipídicas, os sistemas constituídos por polímeros, são dos mais estudados em terapia genética. No entanto, devido a diferentes propriedades dos polímeros nomeadamente a sua insolubilidade em solução aquosa para além do elevado custo, a sua utilização tem sido descontinuada, sendo substituídos por transportadores à base de lípidos [37].

1.7. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs)

Sendo propostas pela primeira vez em 1990, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) logo assumiram um papel importante como alternativa para a administração de genes.

As SLNs são tipicamente NPs esféricas constituídas por um núcleo lipídico sólido, que é estabilizado por uma monocamada superficial constituída por um tensoativo [38].



Fig. 2 Representação da estrutura de uma SLN. [5]

São apresentadas como uma alternativa vantajosa para outros sistemas convencionais de transportadores coloidais, como emulsões, lipossomas e NPs de polímeros, no entanto conjugando as vantagens apresentadas pelos sistemas anteriormente referidos.

No caso particular das NPs poliméricas, estas apresentam maior toxicidade e consequentemente menor biocompatibilidade quando comparadas com as SLNs, devido à presença de monómeros tóxicos, solventes ou produtos de degradação tóxica [39]. Todos estes aspetos são superados pelo uso de compostos biocompatíveis na produção das SLNs.

Apesar da grande difusão e aceitação pela comunidade científica do uso de lipossomas, as SLNs aparecem como uma alternativa vantajosa. Além do potencial de transfecção em muito semelhante aos lipossomas, assim como a elevada biocompatibilidade e afinidade para a membrana celular partilhada por ambos os sistemas, as SLNs possuem uma estabilidade química e física muito maior do que os lipossomas em ambientes biológicos [5], [40].

Dos produtos biocompatíveis que compõem SLNs, o uso de lípidos biodegradáveis com comprimentos de cadeia de carbono bem definidos desempenha um papel importante na estabilidade das NPs. Estes podem incluir triglicerídeos, fosfolípidos, ácidos gordos, diglicerídeos entre muitos outros.

Estas partículas podem ser aplicadas através de várias vias, entre elas por via oral, transdérmica/tópica, oftálmica, retal e a mais usual, a via parentérica. São partículas aplicadas em áreas científicas distintas como a área farmacêutica, cosmética, biotecnológica ou de engenharia de genes [41]. Uma das aplicações mais estudadas tem sido entrega de genes, onde estudos anteriores comprovam a aplicabilidade deste tipo de partículas, sobretudo devido aos resultados apresentados em ensaios de entrega de antígenos para terapêutica anti-tumoral [42].

Uma das grandes estratégias inovadoras deste tipo de NPs é o uso de lípidos sólidos. Tal facto permite melhorar a sua capacidade de liberação controlada do fármaco ou gene encapsulado, bem como retardar a sua mobilidade no núcleo lipídico em comparação com um lípido líquido [43].

Além do uso de compostos biocompatíveis, o que representa uma vantagem quando se trata de transportadores a serem aplicados em um ambiente biológico, as SLNs apresentam várias vantagens, nomeadamente:

- Produção em larga escala por homogeneização de alta pressão;
- Resistência contra a degradação química;
- Liberação controlada de fármacos;
- Ausência de solventes orgânicos;
- Possibilidade de muitas combinações entre lípidos e tensioativos [44].

Além das vantagens apresentadas, uma das características mais valorizadas das SLNs é a sua capacidade de acumulação, devido a um fenômeno de direcionamento passivo designado de efeito de aumento de permeabilidade e retenção (EPR). Este efeito leva a que os agentes terapêuticos se acumulem na vizinhança das células alvo. Para o caso específico dos tumores, esse efeito é devido à grande quantidade de vasos sanguíneos que rodeiam o tumor [14], [45]. Como em qualquer aplicação comercial, também este tipo de partículas está dependente dos custos de produção para uma possível produção em larga escala. Os materiais usados para a sua produção, visto serem materiais de fácil aquisição torna a produção num processo de baixo custo. A juntar a esse fator, foi demonstrada a facilidade de aumento de escala tanto em sistemas contínuos como descontínuos [46].

1.7.1. Métodos de produção

Os métodos de produção encontram-se divididos em duas categorias distintas. Aqueles baseados em solventes, recorrem ao uso de solventes orgânicos para a dissolução dos lípidos sólidos, seguindo-se a evaporação dos solventes utilizados após a emulsão dos componentes e respetiva produção de partículas. Fazem parte deste tipo o método de emulsão/evaporação de solvente. Nos métodos que não fazem uso de solventes orgânicos, os lípidos são fundidos e posteriormente emulsificados, resultando na formação das partículas, após arrefecimento dos componentes. Destes fazem parte os métodos de homogeneização de alta velocidade e ultrassons, os de alta pressão, e as microemulsões [47]. O método de alta velocidade pode ser usado para aplicações em larga escala, apresentando bons resultados. Com o uso de elevadas temperaturas há uma diminuição da viscosidade da fase interna o que resulta na produção de partículas de tamanhos reduzidos [48]. A não utilização de solventes orgânicos também representa uma vantagem [49].

Independentemente do método de produção selecionado, este deve ser escolhido com base na via de administração, na possível temperatura de degradação e na composição da matriz lipídica [50]. Além disso a escolha deve ser executada com vista a uma otimização da energia despendida para a produção das suspensões, tendo em conta as restrições energéticas do método [39].

1.7.2. Composição das SLNs

As características das nano-estruturas e em especial das SLNs estão diretamente relacionadas e dependentes da escolha dos compostos utilizados para a sua produção [15].

Para a composição das SLNs, devem ser tidos em conta diversos aspetos de forma a possibilitar a formação de nanopartículas o mais eficaz e estável possível. Tratando-se de nanopartículas lipídicas estabilizadas por um tensoativo, a escolha destes dois componentes deve ter um papel de destaque.

1.7.2.1. Lípidos

Tratam-se de biomateriais amplamente utilizados na entrega de proteínas e ácidos nucleicos, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. A sua escolha deve focar-se na eficiência, segurança, especialmente para aplicações em terapia génica. Quando utilizados na produção de vetores de transporte e respetiva formação de complexos terapêuticos, têm como principal função a proteção dos agentes terapêuticos que transportam.

Maioritariamente são usados fosfolípidos, lípidos catiónicos, óleos entre outros para aplicações em nanotecnologia [15]. Para uma melhor escolha, devem ser tido em conta aspetos como as modificações cristalinas que estes podem sofrer, a concentração ideal a empregar, a hidrofobicidade e em especial a sua estrutura [35]. Por norma recorrem-se a lípidos com comprimento das cadeias carbonadas bem definido, já que estas desempenham um papel de destaque na estabilidade das nanopartículas [43]. É reconhecido que longas cadeias laterais de ácidos gordos formam partículas de maior tamanho, daí ser recomendado o uso de combinações de lípidos de forma a ser atingida uma melhor qualidade nos sistemas produzidos [35].

Um aumento na massa de lípido utilizada tende a formar partículas de maior tamanho, enquanto massas inferiores levam à formação de partículas de tamanhos inferiores. O fenómeno de aumento de tamanho com o aumento de massa é explicado pela tendência inerente a qualquer lípido de coalescer em concentrações elevadas [51].

No conjunto de lípidos mais usados, os lípidos catiónicos tomam um lugar de destaque. Tratam-se de moléculas anfífilas que foram pela primeira vez aplicadas em 1987 e trazem consigo inúmeras vantagens [30], [52]. Dada a natureza aniónica do DNA, a utilização deste tipo de lípidos leva a formação de complexos terapêuticos mais compactos, devido às interações eletrostáticas estabelecidas entre os lípidos e os ácidos nucleicos [53]. Podem ser aplicados sozinhos nas formulações ou em combinação com outros de forma a combinar as potencialidades de diferentes lípidos [35]. No entanto existem limitações ao seu uso. Por possuírem carga positiva, é lhes atribuído uma elevada toxicidade, que apenas é neutralizada pela complexação com os ácidos nucleicos que transportam [15]. Apesar da importância do uso de lípidos catiónicos, outro aspeto deve ser considerado na escolha de lípidos. Lípidos com estatuto geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognized As Safe- GRAS*), atribuído pela FDA atribuem um elevado componente de segurança aos sistemas biológicos

onde as SLNs poderão ser aplicadas. Exemplo disso são os glicéridos comumente utilizados na produção de SLNs. Estes são compostos por ácidos gordos presentes em emulsões para nutrição parentérica [54].

1.7.2.2. Tensioativos

Compostos anfífilos que reduzem a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis. Podem também ser aplicados como emulsionantes no caso das nano-estruturas. O seu uso leva ao aumento de estabilidade, inibição de agregação e aglomeração e redução comprovada do tamanho de partícula., tendo em conta a concentração utilizada [15].

O aumento da concentração do tensioactivo, conduz a um aumento da capacidade de diminuição do tamanho de partícula devido às propriedades de superfície ativa, no entanto elevadas concentrações podem aumentar a toxicidade da formulação [44], [55]. Em contrapartida, baixas concentrações apesar de levarem a uma diminuição de toxicidade, podem tornar-se insuficientes para cobrir a totalidade da superfície das nanopartículas formadas, resultando num aumento de tamanho e instabilidade da suspensão coloidal [56], [57].

Na produção de nanopartículas são utilizados três tipos de tensioativos, os polioxilados, os polisorbatos e os poloxameros, cada um com vantagens comprovadas [35].

Os poloxameros tratam-se de tensioativos de co-polímeros de tribloco não iónicos que têm uma larga aplicação na indústria biofarmacêutica. Estes são usados maioritariamente como aditivos para meios de cultura, pois lhes é atribuída a capacidade inata de protecção de culturas de células do ambiente turbulento provocado nos bio-reactores [58], [59]. Como exemplo de poloxamero, é amplamente utilizado o Poloxamero 188 (Pluronic® F-68) em aplicações biológicas. Além da protecção celular que este confere, o seu uso para fins farmacêuticos em aplicação intravenosa encontra-se aprovado pela FDA [40].

1.7.3. Caracterização.

Um dos aspetos importantes na avaliação das nanopartículas em suspensão é a sua estabilidade físico-química assim como a avaliação da sua toxicidade [60].

A falta de estabilidade das suspensões pode levar à formação de grandes agregados de partículas, e no caso de uma aplicação intravenosa conduzir a formação de coágulos na corrente sanguínea e a consequentes fenómenos de embolismo, vulgo trombozes [14].

O tamanho determina a internalização das SLNs, uma vez que é determinante na via de internalização celular a ser seguida. Partículas de tamanho reduzido levam a uma razão superfície-volume elevada, o que se traduz numa maior reatividade em ambiente biológico e a uma consequente internalização mais eficiente.

Um outro aspeto crítico é a dispersão dos tamanhos das nanopartículas que pode ser avaliado pelo parâmetro do índice de polidispersividade (Pdl). Através deste parâmetro é

confirmada a natureza homogénea das suspensões. Idealmente uma boa suspensão coloidal pode apresentar um Pdl até 0,3 [32], [38].

A carga superficial é outro parâmetro a considerar na estabilidade das nanopartículas que pode ser avaliada por medição do potencial zeta (ζ). Este é um indicador da extensão atingida pela força de repulsão partícula-partícula [35]. A carga definida pelo potencial zeta leva a que não haja aglomerações ou agregações de partículas. Quanto maior for o potencial zeta, tanto mais positivo ou mais negativo, maior será a repulsão entre partículas. Com um potencial a partir de $\pm 30\text{mV}$ o sistema coloidal é considerado estável [51].

1.7.4. Modificações das propriedades das SLNs

Um dos aspetos cruciais para a realização de uma terapia genética eficaz, é a internalização dos complexos terapêuticos nas células alvo. Para tal é necessário que estes apresentem capacidade para penetrar na célula atravessando a membrana plasmática assim como a membrana nuclear.

Idealmente os complexos formados pelos vetores de transporte de material genético, devem ter uma carga electrostática positiva. Essa carga deve ser suficientemente positiva para que a interação com a membrana plasmática seja facilitada e a passagem para o citosol seja efetuada e simultaneamente, não provoque toxicidade no hospedeiro, característica esta inerente a compostos com elevada carga catiónica. Além da melhor interação, uma carga positiva possibilita um prolongamento do tempo de circulação das SLNs na corrente sanguínea, bem como conduz a uma acumulação seletiva em locais específicos de interesse [22]. Todos estes aspetos ganham ainda mais destaque quando é pretendida uma aplicação intravenosa. Têm sido realizados estudos de modificações de superfície quer através da conjugação com biomoléculas ou pela adição de componentes para alteração da carga superficial [5], [40].

Independentemente da via escolhida para a alteração a efetuar, ambas levam ao aumento da biodisponibilidade, assim como ao aumento da internalização celular e à diminuição dos processos de degradação enzimática do material genético [53], [61].

As modificações de superfície podem envolver a conjugação com outras biomoléculas como por exemplo com proteínas e péptidos fusogénicos que têm a capacidade de aumentar a atividade biológica dos complexos terapêuticos. Por outro lado, péptidos como as poliaminas e em particular a protamina além de atribuírem maior estabilidade, têm a capacidade de funcionar como agentes de condensação de DNA [62]. Além disso alguns destes componentes funcionam como disruptores de membrana, podendo destabilizar os endossomas durante o processo de endocitose, levando a que a libertação e respetiva transfecção do material genético transportado sejam facilitadas melhorando a eficiência do processo [12].

Mais concretamente, péptidos que possuam resíduos de arginina na sua sequência mostraram ter uma elevada atividade de translocação, atividade essa com alcance máximo quando o péptido possui entre seis a oito resíduos de arginina consecutivos, como no caso do sulfato de protamina.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Para os estudos efetuados foram utilizados seis lípidos. O dibehenato de glicerilo (Compritol®), diestearato de glicerilo (Precirol®) e monoesterato de glicerilo (Geleol™) generosamente oferecidos pela Gattefossé (França). Foram também utilizados Imwitor 491® adquirido da CREMER OLEO GmbH & Co. KG (Alemanha), octadecilamina (Esterarilamina) e ácido esteárico ambos obtidos através da Sigma-Aldrich (EUA). Os tensoativos utilizados foram brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) (Alfa Aesar; EUA), cloreto de benzalcónio (Sigma-Aldrich; EUA), Pluronic® F68 (Poloxamero 188) e F127 (Poloxamero 407) ambos da AppliChem (Germany). Foi utilizado um péptido, Protamina, adquirido à Sigma-Aldrich (EUA).

A linha celular do rim embrionário humano, HEK293T (ATCC CRL-11268), foi obtida da ATCC (USA) e foi usada nos estudos celulares. O meio de cultura (RPMI 1640) e os suplementos (soro fetal, glutamina e antibióticos) são da Gibco, as sondas fluorescentes (DAPI, PI, Rhodamina-Faloidina) da Invitrogen (ThermoFisher Scientific, USA). O paraformaldeído, PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7.4), foram adquiridos à Sigma-Aldrich (EUA), resazurina (Alamar Blue) e iodeto de propídio da AppliChem (Germany).

A água purificada utilizada na preparação de todas as soluções foi obtida por osmose inversa (Millipore, Elix 3) e filtrada com um filtro de poro de 0,45 mm. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico e foram usados sem purificação adicional.

2.2. Métodos

2.2.1. Produção das nanopartículas

2.2.1.1. Método de preparação

Numa fase inicial deste trabalho, e com o objetivo de selecionar o melhor método para a produção das suspensões de nanopartículas, foram realizados ensaios com duas técnicas, evaporação de solvente e homogeneização a quente de alta velocidade, técnicas estas já anteriormente descritas [63], [64].

Como lípidos teste foram utilizados o Compritol® (CO) e o Precirol® (PE), e como tensoativo Tween® 20.

2.2.1.1.1. Evaporação de solvente

No método de evaporação de solvente o lípido foi dissolvido com diclorometano (DCM), e em seguida adicionada a solução de tensoativo. A homogeneização dos componentes foi realizada utilizando um homogeneizador de laboratório de alta rotação (Silverson L5M, Reino Unido) à rotação máxima (10000 rpm).

A suspensão obtida foi colocada em agitação constante, a 300 rpm durante 2 h para evaporação do DCM.

2.2.1.1.2. Homogeneização a quente de alta velocidade,

Para o método de homogeneização a quente de alta velocidade, o lípido foi previamente fundido em banho de água a uma temperatura de cerca de 80°C, aproximadamente 10°C acima do ponto de fusão do lípido. Em seguida, adicionou-se a solução de tensioativo previamente preparada, estando à mesma temperatura do lípido fundido. Como no método anterior, o passo de homogeneização foi realizado usando o mesmo homogeneizador de laboratório de alta velocidade com os dois componentes colocados em permanência em banho de água quente.

Após a homogeneização, as dispersões de SLNs foram obtidas pelo arrefecimento das nano-emulsões em banho de gelo durante uma hora com agitação suave durante os primeiros 5 min.

2.2.1.2. Seleção do tensioativo

De forma a testar qual o tensioativo a usar na preparação das formulações, foram testados dois poloxameros descritos na literatura como seguros para aplicação biológica [65], [66]. Assim, foram elaboradas soluções de diferentes concentrações de Pluronic® F68 (F68) e Pluronic® F127 (F127) como descrito na tabela 1. Cada um deles foi aplicado em vários ensaios com o objetivo de encontrar a concentração ideal a ser usada.

Tabela 1 Soluções de tensioativos testadas para a produção de SLNs.

Tensioativo	Concentração da solução (%)
F68	0,1
	0,5
F127	1
	2

Para cada ensaio, inicialmente foram utilizados 5 ml de solução de tensioativo. Devido à baixa homogeneização em alguns ensaios, a quantidade foi alterada para 10ml durante a otimização.

2.2.1.3. Seleção de lípidos

Com o objetivo de selecionar qual o melhor lípido para a produção das NPs, foi realizada uma variedade de ensaios com diferentes lípidos (Tabela 2). Em todos eles, utilizou-se uma massa lipídica de 0,050 g com 10 mL de solução 0,1% de Pluronic® F-68 como tensioativo.

Tabela 2 Lípidos testados para a produção de SLNs.

Lípidos
Precirol® (Gliceril Palmitoesterato)
Geleol™ (Gliceril Monoesterato)
Imwitor 491® (Gliceril Esterato)
Ácido Esteárico

2.2.1.4. Tempo de homogeneização

O estudo do efeito do tempo de homogeneização nas características das SLNs foi efetuado com duas quantidades diferentes de Precirol® e adicionando 10 mL da solução Pluronic® F68 a 0,1% com tensoativo (Tabela 3)

Tabela 3 Tempos de homogeneização testados e variações de massa lipídica

Homogeneização (min)	Precirol® (g)
5	0,050
10	
5	0,100
10	

2.2.2. Modificação da carga de superfície

Para modulação da carga superficial das SLNs foram estudados dois tensoativos e um lípido (Tabela 4). No caso do lípido este foi adicionado ao Precirol® (PE) e Geleol™ (GL), enquanto que os tensoativos foram adicionados à fase externa, isto é, à solução de tensoativo Pluronic® F68 a 0,1%.

Junto com a adição dos reagentes moduladores de carga superficial foram também realizados ensaios com adição de protamina.

Tabela 4 Reagentes utilizados para a modulação de carga superficial das SLNs

Tensoativo	Lípido
Brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB)	Estearilamina (SA)
Cloreto de benzalcónio (BNZ)	

2.2.3. Caracterização das nanopartículas (tamanho e carga da superfície)

O tamanho de partícula foi analisado por espectroscopia de correlação de fotões utilizando o Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, Reino Unido). As medições foram feitas a

25,0 °C, mantendo as amostras em cuvettes de poliestireno com uma diluição apropriada em água purificada e filtrada

Para a avaliação da carga superficial mediu-se o potencial zeta no Zetasizer Nano Z (Malvern Instruments, Reino Unido). Para esta análise, após a diluição apropriada com água purificada filtrada, as amostras foram colocadas em uma cuvette específica onde foi estabelecido um potencial de -150 mV.

Todas as medições foram realizadas em triplicado e os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média ± DP) em relação ao tamanho de partícula, Pdl e potencial zeta.

2.2.4. Caracterização morfológica

A caracterização morfológica das partículas foi realizada por TEM (microscopia eletrônica de transmissão) num microscópio Hitachi H8100 (Hitachi High-Tech Europe GmbH, Alemanha), equipado com uma câmara de aquisição de imagem digital (CCD MegaView II) [67]. Para analisar as amostras, uma gota de suspensão foi depositada na grelha de cobre com uma película formvar e seca à temperatura ambiente.

2.2.5. Estudos de viabilidade celular

A citotoxicidade foi avaliada utilizando dois tipos de ensaios gerais de viabilidade celular. O método de redução da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Alamar Blue) [63] foi utilizado para a avaliação do estado metabólico celular e para determinação da integridade de membrana foram realizados ensaios de internalização de corante de iodeto de propídio (PI) [64].

A resazurina é um corante azul, fracamente fluorescente que é reduzido por células viáveis a resofurina que apresenta tons cor rosa e elevada fluorescência na gama do vermelho.

Por outro lado, o PI é uma sonda fluorescente vermelha, à qual a membrana celular é impermeável, logo a entrada de PI não é possível em células viáveis com membranas intactas. No entanto quando as células não se encontram viáveis e com a membrana celular comprometida, a sonda consegue penetrar e ganhar acesso ao interior da célula.

Quando PI obtém acesso a ácidos nucleicos e os intercala, a sua fluorescência aumenta drasticamente e, portanto, é usada para identificar células comprometidas no que diz respeito à integridade de membrana.

Para determinar o efeito da exposição das NPs às células, a viabilidade celular foi avaliada após 4h, 6h e 24h de incubação da linha celular escolhida exposta com as partículas a concentrações de 500 e 250 µg / mL.

No dia anterior à realização dos ensaios, a linha celular HEK 293T foi inoculada em placas de cultura de tecidos de 96 poços de base plana estéril, em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades / mL de penicilina G (sal de sódio),

100 µg / mL de sulfato de estreptomicina e L-glutamina 2 mM , com uma densidade celular de 2×10^5 células / mL 100 µL por poço. As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo as diferentes amostras a serem analisadas sendo cada concentração testada em oito poços por placa. As células foram incubadas durante os tempos previamente indicados. Foi utilizado como controlo negativo meio de cultura e o dodecilsulfato de sódio como controlo positivo (SDS) a 1 mg / mL. Após o tempo de exposição, o meio foi substituído por iodeto de propídio 0,3 mM em meio de cultura (solução *stock* 1,5 mM em DMSO, diluída com meio de cultura 1: 5000). A fluorescência foi medida (excitação, 485 nm; emissão, 590 nm) num leitor de microplacas (FLUOstar Omega, BMGLabtech, Alemanha), sendo em seguida realizado o teste Alamar Blue. Para tal, o meio foi substituído por meio contendo 5 mM de resazurina, as células incubadas por mais 3 h e a fluorescência (530 nm de comprimento de onda de excitação e 590 nm de comprimento de onda de emissão) foi medida para o ensaio de resazurina num leitor de microplacas de fluorescência (FLUOstar Omega, BMGLabtech, Alemanha).

A viabilidade celular relativa (%) em comparação com as células de controlo foi calculada por $\frac{[\text{Fluorescência}] \text{ da amostra}}{[\text{Fluorescência}] \text{ do controlo}} \times 100$ para o teste de resazurina e $\frac{[\text{Fluorescência}] \text{ da amostra}}{[\text{Fluorescência}] \text{ do controlo}}$ para o teste de internalização de PI.

2.2.6. Produção e purificação de plasmídeo com expressão de GFP

2.2.6.1. Produção de células de *E. coli* competentes e transformação com pGFP

Com o objetivo de as células bacterianas poderem ser transformadas com DNA plasmídico, numa primeira etapa, as células de *E. coli* foram tornadas competentes, através de melhoramento da permeabilidade da membrana.

O primeiro passo para a obtenção de *E. coli* competentes consistiu em cultivar uma colónia de *E. coli* em 6 mL de meio caldo de soja tríptico (meio TSB) a 37°C por 14-16h com agitação constante. Após este período a cultura foi adicionada a 300 mL de meio TSB e colocada em incubação aproximadamente durante 2 horas até uma densidade ótica entre 0,45 e 0,55 medida a 600 nm.

A suspensão celular foi decantada em seis tubos de 50 ml e estes arrefecidos em gelo durante 15 min com agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.500 rpm durante 15 min.

Após a remoção completa do sobrenadante, cada um dos *pellets* formado foi re-suspenso em 15 mL de MgCl₂ (0,1 M) frio realizando agitação suave em vortex. Posteriormente, as células foram combinadas em dois tubos e centrifugadas nas condições anteriormente descritas.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi completamente removido e cada *pellet* foi suspenso em 20 mL de CaCl₂ 0,1 M frio e depois incubado em gelo durante 20 min. Depois foi realizada uma centrifugação nas mesmas condições de antes, durante 10 min.

O sobrenadante foi removido e cada *pellet* suspenso em 6 ml de CaCl₂ 0,1 M / 15% de glicerol. As células competentes foram distribuídas para tubos estéreis e congeladas a -80 ° C para posterior utilização.

Posteriormente, após descongelar uma das anteriores amostras, as células de *E. coli* foram transformadas por meio do método de choque térmico com o vetor plasmídeo pVAX1 codificando GFP (pGFP) (Green Fluorescence Protein) (ThermoFisher Scientific, EUA). Os clones positivos foram selecionados em agar suplementado com canamicina.

Tabela 5 Reagentes utilizados para a preparação de células competentes de *E. coli*.

Soluções	Composição
caldo de soja trípico (TSB)	5 g/L NaCl 5 g/L Extrato de levedura 10 g/L Triptona 1 ml/L 1.0 M NaOH
0.1 M CaCl₂/15% Glicerol	15% (v/v) Glicerol Preparado em 0.1 M CaCl ₂
0.1 M CaCl ₂ 0.1 M MgCl ₂ 1.0 M NaOH	

2.2.6.2. Produção e purificação do plasmídeo pGFP

A estirpe recombinante de pGFP *E. coli* foi inoculada em 1 L de meio de caldo de soja trípico (Biokar, França) suplementado com canamicina (100 mM), a 37°C sob agitação constante (250 rpm) até 10 h de crescimento. As células foram isoladas por centrifugação e o sedimento celular foi lavado com solução salina tampão de fosfato a pH 7,4 (PBS 10 mM, Invitrogen, Reino Unido). A extração e purificação de pDNA foi realizada com base no procedimento do kit de purificação de plasmídeo Midi QIAfilter (QIAGEN Inc., Alemanha).

O doseamento de plasmídeo purificado foi efetuado por medição da absorvência a 260nm e a respetiva quantidade calculada através da fórmula:

$$\text{Concentração de pDNA (ng/}\mu\text{l)} = 50 * [\text{absorvência a 260nm}]$$

As amostras de todos os passos da purificação foram analisadas num gel de agarose a 1%.

2.2.6.3. Preparação de géis de agarose

Para a preparação do gel de agarose a 1%, foi adicionada 0,5 g de agarose a 50 ml de tampão TBE (tabela 6). A mistura foi aquecida num micro-ondas aproximadamente durante 2

minutos até à completa dissolução da agarose. A solução obtida foi arrefecida até cerca de 45-50 ° C e foram adicionados 3 µL de brometo de etídio (solução a 10%).

Após a preparação da solução esta foi vertida na tina de eletroforese horizontal, onde foram colocados os pentes apropriados. A tina permaneceu à temperatura ambiente durante cerca de 30 min para arrefecimento da agarose e respetiva polimerização em gel.

Após a polimerização, os pentes foram retirados, o gel coberto pela solução tampão TBE e as amostras aplicadas nos respetivos poços. A corrida foi iniciada com uma tensão constante de 70 volts durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Os géis obtidos foram fotografados num transiluminador com lâmpada de UV para posterior análise dos resultados obtidos.

Tabela 6 Composição do tampão TBE

Reagentes	Quantidade
Tris-hidroximetil-aminometano	54,0 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA	3,72 g
Água Bidestilada	1000 mL

2.2.7. Ensaio de condensação de pDNA

Os ensaios de condensação foram realizados em placas de 96 poços com diferentes proporções de SLNs com o plasmídeo pGFP.

Para a preparação das amostras foram adicionados 20µL de pGFP a cada lote de partículas, deixando a mistura repousar durante 30 minutos à temperatura ambiente, de forma a garantir a formação dos complexos. Foram utilizados diferentes rácios de nanopartículas, sendo adicionado a cada poço 20µL de PI. Como controlo positivo foi utilizado apenas o plasmídeo junto com PI.

A fluorescência foi medida a um comprimento de onda de excitação de 530nm e de emissão de 590nm num leitor de microplacas (FLUOstar BMGLabtech, Alemanha).

De forma a confirmar a eficácia da condensação do pGFP com as partículas, os complexos previamente formados foram adicionados a um gel de agarose a 1% realizando uma corrida de 1 hora a 70mV.

2.2.8. Ensaio de internalização

A internalização das SLNs foi avaliada na linha celular HEK293T cultivada numa placa de 96 poços com uma densidade de 2×10^5 células/mL e incubadas durante 24 h.

O meio de cultura foi removido e substituído por meio de cultura contendo 167 µg/mL e 83 µg/mL de SLNs contendo Coumarina-6 (98%, Sigma Aldrich, Reino Unido). A fluorescência

foi então medida (comprimento de onda de 485 nm de excitação: e 520 nm de emissão) e os valores obtidos considerados 100% das NPs.

Após incubação das células durante 1 h, a 37°C e a 5% de CO₂, foi medida a fluorescência. Após adição de 50 µL de Azul tripano [0,4% (v/v)] a cada poço a fluorescência foi medida novamente e após comparação destes com o total da fluorescência das partículas determinou-se a percentagem de internalização.

2.2.8.1. Microscopia de fluorescência

A linha celular HEK 293T foi cultivada no mesmo meio de cultura e densidade celular que descrito no ensaio de internalização em placas de 24 poços contendo laminas de vidro estéril durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Foram adicionadas SLNs contendo coumarina-6 e após um tempo de incubação de 1h, as células foram lavadas três vezes com 5 mL de 10 mM PBS contendo glicina (20 mM) a pH 7.4.

As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (m/v), protegidas da luz e foram lavadas novamente três vezes com solução de PBS.

Após permeabilização com 0,5% de Triton X-100 durante 4 minutos e lavadas três vezes com solução de PBS, foi adicionado 1 mL de faloidina marcada com rodamina (6,6 µM) durante 45 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Foi realizada uma ultima lavagem das células, três vezes com PBS.

As lâminas foram deixadas a secar ao ar e montadas usando o reagente de montagem ProLong® Gold fluorescente contendo DAPI (Life Technologies, Reino Unido).

A fluorescência foi observada com três filtros (verde para as partículas, azul para os núcleos e vermelho para a actina) no microscópio de fluorescência Axioscop 40 (CarlZeiss, Alemanha) equipado com uma câmera AxioCam HRc (Carl Zeiss, Alemanha).

A aquisição das imagens foi possível usando o software AxioVision Rel. 4.8.1 (Carl Zeiss, Alemanha).

As imagens obtidas foram montadas usando o software Image J v.10 (NIH, USA).

2.2.9. Ensaio de transfecção

Para a realização dos ensaios de transfecção foi utilizada a linha celular HEK 293T. As células foram cultivadas até atingirem uma densidade celular de 1x10⁴ células por poço em meio RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U de penicilina e 0,1 mg de estreptomicina por mililitro, a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera com 90% humidade.

A transfecção celular foi realizada em placas de 96 poços com nanopartículas contendo pGFP, plasmídeo que contem o gene da proteína de fluorescência verde. Foram testadas duas concentrações de partículas (167 e 83 µg/mL) com uma razão de NP:pGFP (m:m), de 208 e 104 respetivamente, sendo utilizado por poço 8 ng de pGFP. A solução PEI a 1mg/mL foi utilizada como controlo positivo e como controlo negativo foi utilizado meio de cultura.

Para a preparação das amostras adicionou-se cada lote de partículas ao plasmídeo, à temperatura ambiente, deixando a mistura em repouso por 30 minutos.

Após 14 h de incubação, as formulações foram removidas e foi adicionado 100 µL de meio fresco a cada poço da placa.

A fluorescência foi medida com comprimentos de onda de 485nm excitação e 525nm de emissão num leitor de microplacas (FLUOstar BMGLabtech, Alemanha) após 48 h de transfecção.

A viabilidade celular foi também avaliada após o ensaio de transfecção através do ensaio de *Alamar Blue* descrito anteriormente. Os resultados encontram-se apresentados normalizados para o total de células viáveis. O ensaio foi realizado em 8 poços para cada formulação e repetido duas vezes.

2.2.10. Hemólise

A percentagem de hemólise foi avaliada por EDTA-sangue anticoagulado [68]. As amostras de SLNs foram incubadas com sangue na proporção de sangue:SLNs de 100:20 (v/v) e incubadas a 37 ° C, durante 2 h, sob condições de agitação suave de aproximadamente 200 rpm.

Como controlo foi utilizado sangue tratado com PBS (lise espontânea) e sangue tratado com Triton X-100 1% (m/v) (100% de lise). Após o tempo de incubação as amostras foram centrifugadas a 800 x g, durante 15 min, a 25 ° C.

Para estimar a extensão da lise de eritrócitos, a hemoglobina libertada foi medida no sobrenadante por colorimetria a 545 nm. A propriedade hemolítica das SLNs foi calculada como percentagem de hemólise sendo obtida de acordo com:

$$\text{Hemólise (\%)} = [\text{Teste Hb}] * 100 / [\text{Controlo positivo Hb}]$$

A concentração de hemoglobina (Hb) de controle positivo é o valor da hemoglobina no sangue total (amostra tratada com Triton X-100) e a concentração de hemoglobina em teste é a hemoglobina libertada no plasma quando o sangue é exposto à amostra testada.

2.2.11. Estudos de estabilidade

2.2.11.1. Efeito da temperatura

Para avaliar a estabilidade das formulações, foram realizados vários testes, tendo-se utilizado as propriedades físico-químicas (diâmetro médio das partículas, Pdl e o potencial zeta) como parâmetros do estudo. Com as amostras otimizadas, foram realizadas medições mensais durante um período de 3 meses. As medições foram realizadas com alíquotas de todas as amostras armazenadas a 4°C e à temperatura ambiente.

Foi também realizado um teste de estabilidade das suspensões à temperatura de 37°C. Para tal as alíquotas das suspensões otimizadas foram colocadas durante 2h em banho de água a 37°C.

2.2.11.2. Efeito da liofilização

O efeito da liofilização nas SLNs otimizadas foi efetuado com diferentes crioprotectores (Tabela 7), num liofilizador (Christ Alfa 1-4, Osterode am Harz, Alemanha. Após a liofilização as amostras foram re-suspensas em água e a respetiva caracterização físico-química efetuada.

Tabela 7 Soluções de crio-protetores utilizadas para a liofilização e respetivas concentrações

Solução de crio-protetor	Concentração
Trealose	10% (m/m) *
	10% (v/v)
	5% (v/v)
Glucose	5% (v/v)

*massa trealose: massa de lípido

2.2.11.3. Efeito das condições biológicas

Estudou-se a estabilidade das nanopartículas em dois meios 10mM PBS pH 7,4 (10mM) e *simulated body fluid* (SBF) (Tabela 8) após 24h a 4°C [69].

Tabela 8 Reagentes utilizados na produção de 1000mL de solução de SBF [69]

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	8,035 g
2	NaHCO ₃	0,355 g
3	KCl	0,225 g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,231 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,311 g
6	1.0M-HCl	39 ml
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	Tris	6.118 g
10	1.0M-HCl	0–5 ml

2.2.12. Análise estatística de dados

Os dados são expressos como média e desvio padrão (média \pm DP) de experiências separadas. A avaliação estatística dos dados foi realizada utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA). O teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (software GraphPad PRISM 5, EUA), foi usado para comparar a significância da diferença entre os grupos, sendo aceite um $P < 0,05$ como significativo.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1. Produção de *Solid Lipid Nanoparticles* (SLNs)

3.1.1. Influência do método de preparação

Conforme mencionado no capítulo de materiais e métodos foram utilizados dois procedimentos para a produção de SLNs, a evaporação de solvente e a homogeneização a quente de alta velocidade.

Os ensaios descritos baseiam-se em estudos previamente otimizados [1],[2]. A escolha de dois métodos foi realizada com o objetivo de selecionar o método mais adequado para a obtenção de NPs com características físico-químicas mais próximas do ideal para uma aplicação em terapia genética.

Foram utilizados 10mL de Tween® 20 (0,05%) como tensioativo em cada amostra, e 0,05g de CO e PE como lípidos.

Os resultados da caracterização das SLNs são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de PE e CO produzidas para os dois métodos de produção testados (n=3, média ± DP)

Método	Lípido	Amostra	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mv)
Evaporação de solvente	PE	1	923 ± 67	0,388 ± 0,006	-27 ± 0
Homogeneização a quente		2	>1000,0	0,755 ± 0,066	-33 ± 0
Evaporação de solvente	CO	3	623 ± 28	0,368 ± 0,033	-34 ± 1
Homogeneização a quente		4	368 ± 83	0,625 ± 0,145	-40 ± 1

Como se pode observar pelos resultados (tabela 9) o método de homogeneização a quente é o que permite obter SLNs com menor tamanho (368 ± 83 nm), enquanto que com o método de evaporação de solvente o tamanho de partícula menor se situa na gama dos 623 ± 28 nm.

O método de homogeneização a quente foi o escolhido para os estudos seguintes não somente pela obtenção de partículas com reduzido tamanho, mas porque apresenta outras vantagens, nomeadamente a não utilização de solventes orgânicos. Assim tem-se um processo com maior segurança e um menor risco para uso em sistemas biológicos, já que um dos principais objetivos das NPs produzidas neste trabalho prevê uma possível aplicação intravenosa [48], [50].

Os valores de temperatura utilizados no método não tiveram qualquer impacto na qualidade das formulações. Uma outra vantagem deste método é a sua adequabilidade para uma aplicação do fabrico das SLNs em larga escala [49].

3.1.2. Escolha do tensioativo

Para a seleção do tensioativo a utilizar para a produção das suspensões de SLNs foram testados dois poloxameros, F68 e F127, alterando a concentração conforme apresentado na tabela 10.

Cada formulação foi realizada com o método de homogeneização a quente, utilizando uma massa lipídica de 0,05g e 10mL de tensioativo. A respetiva caracterização físico-química das suspensões foi realizada, tal como nos ensaios anteriores.

Tabela 10 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de Precirol® produzidas para os dois tensioativos testados (n=3, média ± DP).

Amostra	Lípido	Tensioativo	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
5	PE	F68 2%	208 ± 97	0,501 ± 0,251	-6 ± 0
6		F68 1%	102 ± 1	0,374 ± 0,049	-26 ± 4
7		F68 0,5%	99 ± 3	0,413 ± 0,031	-5 ± 2
8		F68 0,1%	164 ± 1	0,178 ± 0,010	-2 ± 0
9		F127 2%	109 ± 9	0,542 ± 0,053	7 ± 1
10		F127 1%	72 ± 1	0,418 ± 0,019	-4 ± 1
11		F127 0,5%	92 ± 3	0,619 ± 0,034	-8 ± 1
12		F127 0,1%	183 ± 1	0,255 ± 0,013	-17 ± 1

Hipoteticamente, uma maior concentração de tensioativo levaria a partículas com um valor de tamanho médio e Pdl baixos. No entanto, à medida que a concentração aumenta tal não se verificou. A formulação nº10 é a que apresenta um menor valor de tamanho de partícula, no entanto um valor de Pdl muito elevado.

No entanto, apenas o tensioativo F68 se encontra descrito pela FDA como aceite em aplicações farmacêuticas para aplicação parentérica. Assim, tendo em conta que um dos principais objetivos do trabalho desenvolvido seria a produção de nanopartículas com vista a uma aplicação intravenosa, optou-se por utilizar como tensioativo principal o F68 [40].

Observando as várias concentrações utilizadas para este tensioativo a amostra nº 8 é a que mais se destaca. Embora não seja aquela que produziu o tamanho de partícula menor, é a que apresenta um Pdl menor, o que é vantajoso para a continuação do trabalho, visto se tratar de um indicador de uniformidade de tamanhos das suspensões.

Assim sendo, os estudos prosseguiram com a utilização de F68 como tensioativo com uma concentração de 0,1%.

3.1.3. Escolha do lípido

A escolha do lípido a ser utilizado para a produção das nanopartículas é um dos aspetos críticos a ser considerado. Diferentes lípidos podem atribuir características completamente distintas às NPs.

A constituição da matriz lipídica é responsável pela estabilidade, e também pelo comportamento de libertação [70]. A escolha do lípido deve recair sobre aquele que atribuir às nanopartículas formadas o menor tamanho de partícula assim como o menor Pdl.

Foram avaliados diferentes lípidos (tabela 11). O lípido Imwitor 491® (IW) formou muita espuma durante a homogeneização pelo que não foi possível obter nanopartículas com este lípido.

Para as amostras contendo ácido esteárico (ST), apesar de ser possível concluir o processo de homogeneização, ao ler o tamanho médio e o potencial zeta, as amostras apresentavam elevada quantidade de flóculos e um depósito considerável, o que impossibilitou a leitura das mesmas.

Em contraste, as amostras produzidas pelos outros dois lípidos revelaram tamanhos inferiores a 200nm, ideais para a continuação do estudo. Para o caso de (PE) obteve-se uma média de tamanhos de 157 ± 10 nm e para GL uma média de 170 ± 34 nm.

Tabela 11 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs produzidas com os diversos lípidos testados ($n=3$, média \pm DP).

Amostra	Lípido (0,05g)	Pluronic® F-68 (0,1%) (mL)	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
13	PE	10	157 ± 10	$0,235 \pm 0,023$	-24 ± 1
14	GL		170 ± 34	$0,244 \pm 0,087$	-2 ± 8
15	ST		Agregação		
16	IW		Agregação		

Os lípidos PE e GL foram selecionados para estudos posteriores. Para além de se tratam de lípidos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), são do conjunto de lípidos testados, aqueles com menor ponto de fusão, o que leva a formação de partículas de menor tamanho [71].

3.1.4. Tempo de homogeneização

Uma das etapas cruciais na produção das nanopartículas é o passo de homogeneização. Além da escolha do método a utilizar, o tempo de homogeneização pode influenciar a qualidade das suspensões coloidais obtidas.

Foram produzidas várias formulações para determinar o melhor tempo de homogeneização e, ao mesmo tempo, avaliar a influência da variação da massa lipídica. Estas novas NPs foram produzidas com PE com uma variação da massa lipídica como indicado na tabela 12 com 10mL de F68 a 0,1%.

Tabela 12 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta das SLNs de Preciro[®] produzidas com diferentes tempos de homogeneização e várias massas de lípido (n=3, média ± DP).

Amostra	Massa lipídica (g)	Tempo de homogeneização (min)	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
17	0,050	5	157 ± 10	0,235 ± 0,023	-24 ± 1
18	0,050	10	164 ± 5	0,217 ± 0,027	-25 ± 0
19	0,100	5	203 ± 3	0,196 ± 0,009	-30 ± 1
20	0,100	10	206 ± 16	0,183 ± 0,008	-27 ± 1

Pela observação dos dados obtidos verifica-se que o aumento de massa lipídica leva à produção de partículas com maiores tamanhos, alguns dos quais acima dos 200nm. Assim para os estudos seguintes utilizou-se uma massa de 0,05g lípido.

O efeito do tempo de homogeneização na dimensão das partículas não é estatisticamente significativo. Assim o tempo de homogeneização selecionado para os estudos posteriores foi de 5 min.

3.2. Modificação das propriedades das SLNs

3.2.1. Modificação da carga superficial

Numa primeira abordagem apenas foi avaliado o tamanho médio e Pdl, uma vez que a carga apresentada, apesar de apresentar valores negativos, seria modulada posteriormente, para assim promover a condensação com pDNA de forma eficaz.

Com o objetivo de induzir uma agregação eletrostática de DNA plasmídico na superfície das nanopartículas e assim levar a uma melhoria da condensação de pDNA foi realizada uma modificação da carga superficial das SLN. Desta forma foram realizados vários ensaios usando duas estratégias distintas.

A primeira estratégia teve por base a modulação da carga de superfície utilizando um lípido secundário de elevada carga positiva. Este foi adicionado simultaneamente com o lípido principal antes da fusão do mesmo.

A segunda estratégia consistiu no uso de diversas soluções contendo diferentes tensoativos catiónicos, sendo estes adicionados após a fusão do lípido e imediatamente antes do passo de homogeneização.

Assim os estudos de modulação da carga superficial foram efetuados com as partículas anteriormente otimizadas, produzidas pelo método de homogeneização a quente, utilizando PE e GL como lípidos principais, sendo homogeneizados durante 5 min, recorrendo a 10mL de F68 0,1% como tensoativo.

3.2.1.1. Adição de um lípido secundário

Nos primeiros ensaios para determinar a melhor estratégia para a modulação da carga superficial, a esterilamina (SA) foi utilizada como lípido secundário. Trata-se de um lípido catiónico, com capacidade de modular a superfície das NPs [72].

Vários testes foram realizados utilizando como lípidos principais os dois com os melhores testes de tamanho obtidos anteriormente, nomeadamente o PE e GL. A introdução de SA poderia de algum modo estabilizar as formulações com dois lípidos anteriormente testados, IW e ST, pelo que foram incluídos neste estudo, apesar de terem sido descartados pelos resultados obtidos nos estudos anteriores.

Durante a preparação das formulações, utilizou-se a mesma massa lipídica para todos os ensaios (0,05 g). Foram adicionados 10 ml de F68 0,1% como tensoativo utilizando-se uma massa inicial de 0,01g de SA (tabela 13).

Tabela 13 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs produzidas com diferentes lípidos testados e SA (n=3, média ± DP).

Amostra	Lípido	Estearilamina (g)	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
21	PE	0,01	197 ± 8	0,367 ± 0,053	+60 ± 3
22	GL		178 ± 9	0,297 ± 0,047	+69 ± 1
23	ST		409 ± 32	0,353 ± 0,061	-21 ± 1
24	IW		Agregação		

Pelos dados apresentados na tabela 13, pode observar-se que os melhores resultados são obtidos nas formulações com os lípidos PE e GL, uma vez que são aqueles com tamanhos mais baixos e potenciais zeta mais altos. Estes apresentam tamanho de partículas inferiores a 200nm e cargas de superfície acima de +30 mV. As cargas apresentadas são ideais para a interação eletrostática com ácidos nucleicos e garantem a estabilidade das formulações coloidais.

Para os restantes lípidos testados, no caso do IW, verificou-se agregação das partículas. No caso do ST, contrariamente ao ocorrido durante o processo de otimização,

verifica-se que a adição de SA permite obter suspensões coloidais com tamanho médio de 409 ± 32 nm, no entanto a carga superficial mantém-se negativa com um potencial zeta médio de -21 ± 1 mV. Por estas razões, para os estudos posteriores estes dois lípidos não foram mais considerados.

Apesar da média de tamanho das partículas de PE ser inferior a 200nm (197 ± 8), o valor obtido encontra-se muito próximos dos limites permitidos para o estudo. Assim, novos testes foram realizados aumentando a massa de SA para o dobro e para o triplo, com vista a obter melhores tamanho de partícula.

Tabela 14 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para SLNs de PE produzidas e diferentes massas de SA ($n=3$, média \pm DP).

Amostra	Lípido	Estearilamina (g)	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
25	PE	0,01	197 ± 8	$0,367 \pm 0,053$	$+60 \pm 3$
26		0,02	204 ± 8	$0,355 \pm 0,075$	$+62 \pm 1$
27		0,03	205 ± 27	$0,284 \pm 0,070$	$+64 \pm 3$

Com o aumento da massa de SA não são verificadas variações significativas no tamanho médio de partícula, no entanto verifica-se um aumento nos valores de Pdl, o que indica uma diminuição da homogeneidade da suspensão coloidal.

Como os valores de potencial zeta são muito elevados, foi estudado o efeito de diminuição da SA (tabela 15) para os dois lípidos PE e GL.

Tabela 15 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para SLNs de PE e GL produzidas com diferentes massas de SA ($n=3$, média \pm DP)

Amostra	Lípido	Estearilamina (g)	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
25	PE	0,01	197 ± 8	$0,367 \pm 0,053$	$+60 \pm 3$
22	GL	0,01	178 ± 9	$0,297 \pm 0,047$	$+69 \pm 1$
28	PE	0,005	180 ± 13	$0,290 \pm 0,016$	$+64 \pm 1$
29	GL	0,005	143 ± 15	$0,314 \pm 0,039$	$+62 \pm 5$

Como se pode observar pela tabela 15 os valores de tamanho de partícula são mais baixos com 0,005g de SA comparativamente a 0,01g e os valores de potencial zeta acima dos +50mV. Em termos de tamanho de partícula foi obtido um valor médio de 180 ± 13 nm e de 143 ± 15 nm, com um Pdl de $0,290 \pm 0,016$ e $0,314 \pm 0,039$ para PE e GL respetivamente.

Em termos de carga superficial foram obtidos valores médios para PE de $+64 \pm 1$ mV e para GL de $+62 \pm 1$ mV. Os valores apresentados além da estabilidade que atribuem as suspensões coloidais, do ponto de vista teórico garantem uma boa condensação com pDNA.

Além da melhoria nas propriedades das SLNs, a redução da quantidade de SA representa uma grande vantagem, uma vez que é um lípido muito citotóxico, a redução diminui os riscos que uma futura aplicação em sistemas biológicos poderia ter.

Pela adição de 0,005g de SA foi assim possível modular a carga superficial das partículas por introdução do lípido positivo com redução de tamanho de partícula.

3.2.1.2. Adição de um co-tensioativo

Concluídos os estudos e respetivas otimizações, para a modificação de carga superficial com a utilização de um lípido catiónico, procedeu-se a uma segunda estratégia de modulação de carga.

A nova estratégia baseou-se no uso de co-tensioativos também de elevada carga positiva com vista a permitir a produção de NPs com carga superficial suficientemente positiva para que a ligação eletrostática com o pDNA fosse facilitada, usando para este efeito CTAB e BNZ. Ambos se tratam de sais quaternários de amónia com uma longa cadeia carbonada [52], [73]. Sendo tensioativos catiónicos apresentam elevada toxicidade, devendo ser realizado um controlo rigoroso para a determinação das quantidades a usar, assim como testes de citotoxicidade [8]. Apesar das desvantagens apresentadas, no caso específico do CTAB existem estudos prévios que indicam que este possui a capacidade de reduzir o tamanho de partícula [74].

Todos os ensaios foram realizados com o método e condições previamente otimizadas. Foi utilizada uma percentagem mássica inicial de 0,1% para a preparação de ambas as soluções de co-tensioativos utilizadas, como indicado na tabela 16.

Tabela 16 Soluções de tensioativo utilizadas para a modulação da carga superficial das SLNs.

Solução (100ml)	BNZ (g)	CTAB (g)	Pluronic F68 (g)
Solução Tensioativo 1	0,1	---	0,1
Solução Tensioativo 2	---	0,1	0,1

Tabela 17 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de PE com diferentes soluções de tensioativo (n=3, média ± DP).

Co-Tensioativo	Amostra	Lípido	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
CTAB 0,1%	30	PE	797 ± 76	0,549 ± 0,015	+41 ± 2
	31	GL	249 ± 22	0,468 ± 0,111	+45 ± 1
BNZ 0,1%	32	PE	502 ± 48	0,558 ± 0,059	+31 ± 2
	33	GL	340 ± 27	0,560 ± 0,024	+41 ± 2

Verifica-se com os resultados obtidos (tabela 17) que, independentemente do tipo de co-tensioativo aplicado, os tamanhos das NPs aumentam assim como os valores de Pdl, muitos acima dos valores pretendidos. O aumento de tamanho de partícula e o valor de Pdl é mais acentuado para o lípido PE do que para GL.

Uma vez que os valores de potencial zeta obtidos com os dois tensioativos são superiores a +30mV, foi estudado o efeito da diminuição da percentagem dos dois co-tensioativos (tabela 18).

No caso do CTAB, a diminuição da percentagem mássica estabeleceu-se nos 0,005% e para BNZ em 0,05%. A maior redução no CTAB é justificada pelo facto de que este tensioativo é significativamente mais tóxico do que BNZ, portanto, uma maior diminuição possibilita a produção de NPs biologicamente mais seguras. Essa redução também é sustentada pelo facto de que em soluções aquosas, utilizando concentrações superiores à concentração crítica miscelar, os surfactantes tendem a formar micelas, logo a redução ajudará a afastar a concentração utilizada de valores críticos [75].

Tabela 18 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para SLNs de PE e GL com diferentes soluções de tensioativo (n=3, média ± DP).

Co-Tensioativo	Amostra	Lípido	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
CTAB 0,005%	34	PE	120 ± 14	0,258 ± 0,007	+11 ± 2
	35	GL	121 ± 13	0,338 ± 0,099	+30 ± 2
BNZ 0,05%	36	PE	256 ± 12	0,437 ± 0,032	+13 ± 2
	37	GL	220 ± 5	0,503 ± 0,006	+26 ± 2

A diminuição na quantidade de tensioativo tem um impacto na carga superficial das partículas, sendo mais acentuada para o lípido PE do que GL.

Verifica-se que há um impacto no tamanho da partícula com a diminuição da quantidade de tensioativo, que é mais acentuada para o CTAB, mas que é consistente com a menor quantidade utilizada. Assim pode dizer-se que há uma correlação direta entre a quantidade de tensioativo, o tamanho de partícula e a carga superficial da partícula que também está dependente do lípido.

Tendo em conta a correlação existente, a utilização de BNZ, foi descartada de futuras formulações, uma vez que a massa utilizada para a preparação da solução de tensioativo não poderia descer para valores inferiores visto que a carga superficial obtida, já apresentava um valor médio muito abaixo dos +30mV.

Tabela 19 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta SLNs de PE e GL produzidas com CTAB (n=3, média \pm DP).

Co-tensioativo	Amostra	Lípido	Tamanho médio (nm)	PI	ζ (mV)
CTAB 0,01%	38	PE	134 \pm 8	0,308 \pm 0,005	+38 \pm 4
	39	GL	112 \pm 7	0,346 \pm 0,033	+38 \pm 6

Aumentado a concentração de CTAB para 0,01% (tabela 19) é possível modular a carga superficial das partículas para ambos os lípidos (potencial zeta > +30mV), ideal para garantir estabilidade das suspensões coloidais. Foram também obtidos tamanhos de partícula inferiores a 200nm.

3.2.2. Adição de um adjuvante de internalização

A adição de péptidos fusogénicos às formulações de nanopartículas, tem demonstrado ser algo com comprovadas vantagens. Estes péptidos quando se encontram a um valor de pH baixo, apresentam alterações conformacionais permitindo a sua ligação às membranas endossomais e respetiva lise [33]. Torna-se assim num aspeto bastante vantajoso para o trajeto percorrido pelas NPs durante o processo de internalização, mais concretamente na fase da fuga endossomal.

Assim, após as otimizações realizadas para a modulação de carga superficial, procedeu-se a realização de ensaios com adição de um péptido adjuvante de internalização, nomeadamente sulfato de protamina (PRT). Trata-se de um péptido catiónico de estrutura pequena, com elevada quantidade de arginina, aproximadamente com 6 a 8 resíduos. Encontra-se aprovado pela FDA para aplicações intravenosas e possui a capacidade intrínseca de proteger DNA contra a ação da DNase I, comprovado por estudos *in vitro*. Apresenta também um elevada propriedade de localização no núcleo [32], [76].

Tendo em conta todas as vantagens apresentadas por este péptido foram realizados ensaios com uma percentagem mássica de 0,05%, tendo-se adicionado o péptido à solução de tensioativo. Apesar de não ser um elemento chave para a produção das SLNs foram necessários ensaios para verificar possíveis alterações nas propriedades das suspensões coloidais.

Tabela 20 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta SLNs de PE, CTAB/SA e PRT (0,01%) (n=3, média ± DP).

Modulador de carga	Amostra	Lípido	Péptido	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
CTAB	40	PE	PRT 0,05%	145 ± 25	0,267 ± 0,040	29 ± 0
SA	41			150 ± 9	0,245 ± 0,027	+35 ± 1
CTAB	42		--	134 ± 8	0,308 ± 0,005	+38 ± 4
SA	43			165 ± 3	0,303 ± 0,004	+55 ± 0

Como se pode observar pelos resultados obtidos (tabela 20) para as SLNs produzidas com PE, em termos de valor de tamanho médio de partículas não se verificam alterações significativas. Com adição de PRT, foi obtido um valor médio de 148 ± 3nm, valor igual aos 150 ± 16nm obtidos para as partículas obtidas sem a adição do péptido.

No valor de Pdl, verifica-se uma diminuição do seu valor na presença de PRT, indicador do aumento da qualidade das suspensões coloidais. Foi obtido um valor médio de 0,256 ± 0,011 e de 0,306 ± 0,03 para a adição e sem a adição de PRT respetivamente.

Tabela 21 Tamanho médio, Pdl e potencial zeta para as SLNs de GL com CTAB/SA e PRT (0,01%) (n=3, média ± DP).

Modulador de carga	Amostra	Lípido	Péptido	Tamanho médio (nm)	Pdl	ζ (mV)
CTAB	44	GL	PRT 0,05%	128 ± 2	0,269 ± 0,004	+35 ± 1
SA	45			121 ± 7	0,286 ± 0,021	+35 ± 0
CTAB	46		--	118 ± 24	0,286 ± 0,043	+44 ± 3
SA	47			143 ± 7	0,281 ± 0,004	+55 ± 1

Tal como apresentado nos resultados obtidos para as partículas de PE, também os tamanhos médios nas partículas de GL não apresentam variações significativas com a introdução de PRT. Foi obtido um valor médio de 125 ± 4nm para as SLNs com adição de PRT e de 131 ± 13nm sem adição da mesma. No entanto, contrariamente ao ocorrido com PE, desta vez os valores de Pdl não sofreram qualquer alteração significativa, sendo os valores médios de 0,278 ± 0,009 e 0,284 ± 0,003 para a adição e sem a adição do péptido respetivamente.

Finalizados os estudos de modulação das propriedades das SLNs, obtiveram-se oito lotes distintos de partículas a serem utilizadas nos estudos posteriores. Estas comportam dois lípidos, PE e GL, dois moduladores de carga de superfície, SA e CTAB, e um adjuvante de internalização, PRT.

Tabela 22 Composição das amostras de SLNs otimizadas

Amostra
Precirol + CTAB
Precirol + SA
Geleol + CTAB
Geleol+ SA
Precirol + CTAB + PRT
Precirol + SA + PRT
Geleol + CTAB + PRT
Geleol + SA + PRT

3.3. Estudos de viabilidade celular

Conforme descrito no capítulo de materiais e métodos, a viabilidade celular foi avaliada usando dois métodos fluorométricos diferentes. O ensaio *alamar blue* para a avaliação do estado metabólico celular e o ensaio de internalização de iodeto de propídio para avaliação da integridade membranar. Em ambos os casos, os ensaios foram realizados por um período de 4, 6 e 24 horas para a totalidade de amostras otimizadas, usando linhas celulares HEK293T. Tratam-se de linhas celulares embrionárias de rim humano, amplamente utilizadas em ensaio *in vitro* e cujas condições de cultura e manipulação se encontram otimizadas [24]. A sua utilização torna-se também vantajosa já que linhas celulares primárias fornecem excelentes sistemas para o estudo da bioquímica normal e resposta celular à exposição química.

3.3.1. Ensaio a 4h

Os ensaios de citotoxicidade foram iniciados com testes a 4h, tendo em consideração que este seria o tempo mínimo para que uma possível aplicação das SLNs pudesse causar efeitos adversos em ambiente biológico.

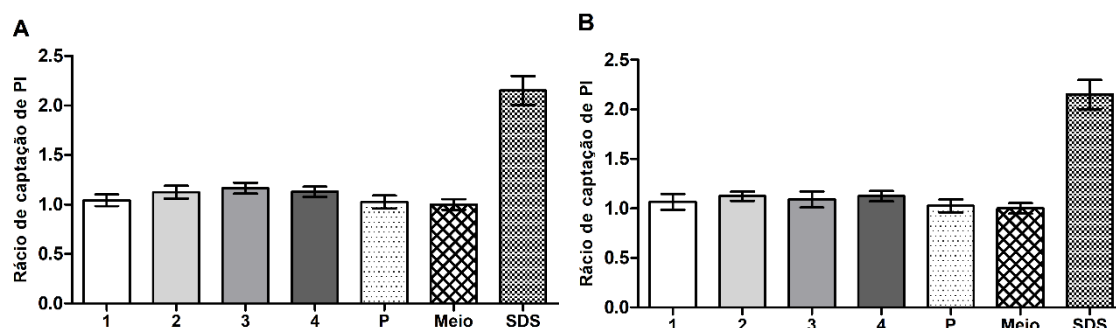


Fig. 3 Internalização de iodeto de propídio após 4h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SLNs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo positivo. A concentração de nanopartículas foi de 500 µg / mL em todas as amostras (n = 8, média ± DP).

Na figura 4 (A e B) estão representados graficamente os dados obtidos após o ensaio de verificação de integridade da membrana. Verifica-se que independentemente do lípido utilizado, todas as SLNs, assim como o tensoativo principal testado não afetam a integridade da membrana celular da linha celular utilizada, uma vez que os valores obtidos para a internalização de iodeto de propídio aproximam-se do valor médio obtido para o controlo negativo (meio de cultura).

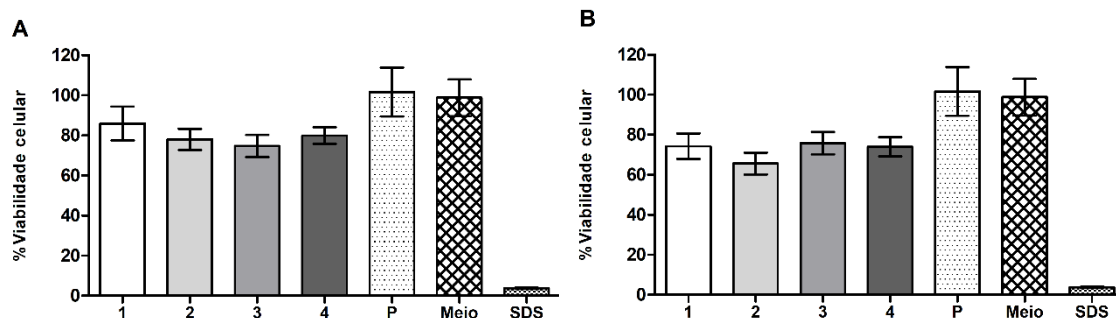


Fig. 4 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 4h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SLNs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo positivo. A concentração de nanopartículas foi de 500 mg / mL em todas as amostras. (n=8, média ± DP).

Observando os dados obtidos para a viabilidade celular é possível constatar que esta se mantém em valores iguais ou superiores a 70% para qualquer uma das amostras. Para os valores obtidos para o GL verifica-se uma ligeira diminuição quando comparado com o PE, indicador de uma maior toxicidade. Independentemente dos factos descritos, uma percentagem de 70% de viabilidade é ideal para as SLNs testadas serem consideradas seguras para aplicações biológicas. Destaca-se o valor obtido para o tensoativo principal utilizado na produção das SLNs, sendo que este valor se aproxima dos 100%, o que revela que até as 4h o tensoativo utilizado, em nada influencia a potencial toxicidade das NPs.

3.3.2. Ensaio a 6h

Para a avaliação da integridade de membrana realizada com exposição durante 6 horas, os resultados obtidos são idênticos para ambos os tipos de SLN testadas.

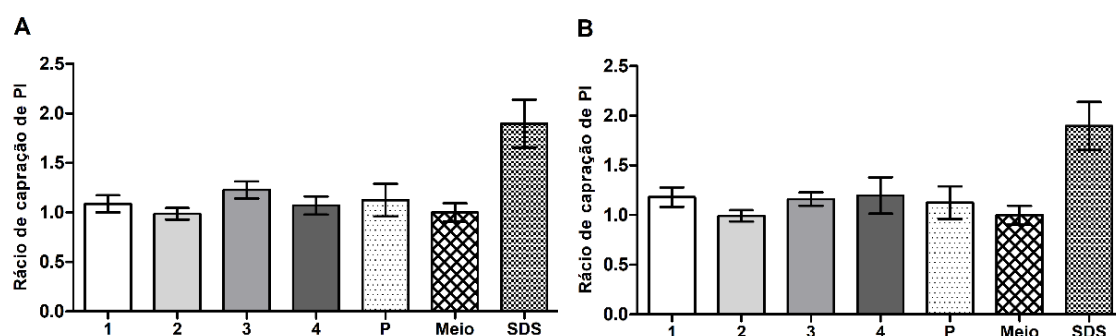


Fig. 5 Internalização de iodeto de propídio após 6h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SLNs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo positivo. A concentração de nanopartículas foi de 500 mg / mL em todas as amostras (n=8, média ± DP).

Independente da suspensão de nanoparticulas avaliada (PE ou GL), ambas apresentam valores de internalização de iodeto de propidio proximo de 1, como o obtido para o respectivo controlo. Assim, é seguro afirmar que as SLNs não comprometem a integridade membranar podendo ser consideradas biologicamente seguras tendo em conta este teste realizado.

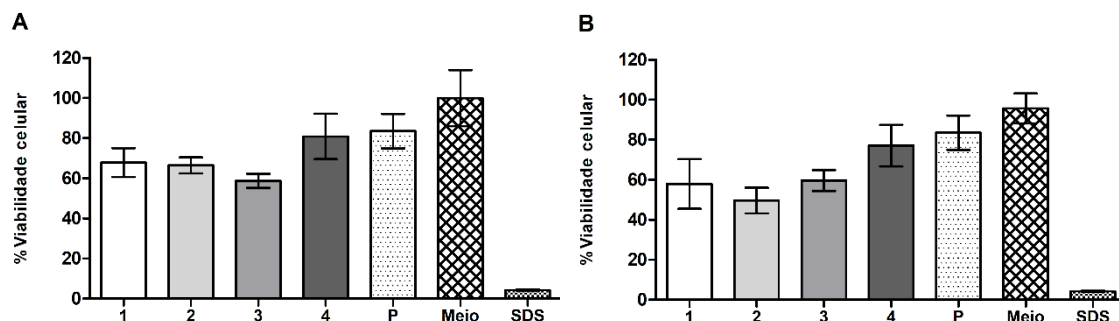


Fig. 6 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 6h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SLNs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo positivo. A concentração de nanoparticulas foi de 500 mg / mL em todas as amostras (n=8, média ± DP).

Avaliando a percentagem de viabilidade celular constata-se uma diminuição quando os dados são comparados com os obtidos para o ensaio de 4 horas. Nas SLNs de GL essa diminuição é bastante mais acentuada, chegando a atingir valores inferiores a 60%, em oposição com os 80% obtidos para um tempo de exposição de 4h. Para as SLNs de PE essa diminuição não é tão acentuada, obtendo-se valores médios aproximadamente de 70%.

Apesar da condição geral ser a diminuição da viabilidade celular, existe uma amostra que se destaca. Independentemente do lipido base utilizado, as SLNs constituídas por SA e com adição de PRT não apresentam qualquer diminuição estatisticamente relevante no que diz respeito à viabilidade celular, mantendo valores médios de 80%, apesar do aumento do tempo de exposição.

Contrariamente também ao verificado para as 4h de exposição, a viabilidade celular para o tensoativo é afectada, no entanto mantendo valores aproximadamente de 80%.

3.3.3. Ensaios a 24h

Por último foram efectuados ensaios de citotoxicidade das diferentes formulações para 24h de tempo de exposição..

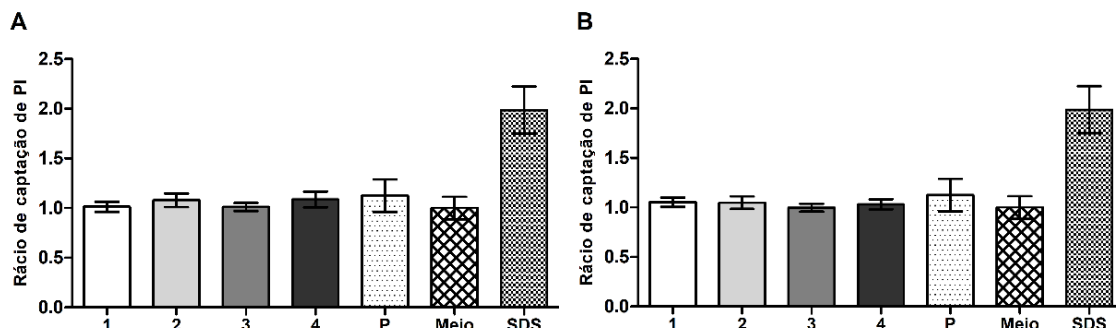


Fig. 7 Internalização de iodeto de propídio após 24h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SLNs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo positivo. A concentração de nanopartículas foi de 500 mg / mL em todas as amostras (n=8, média ± DP).

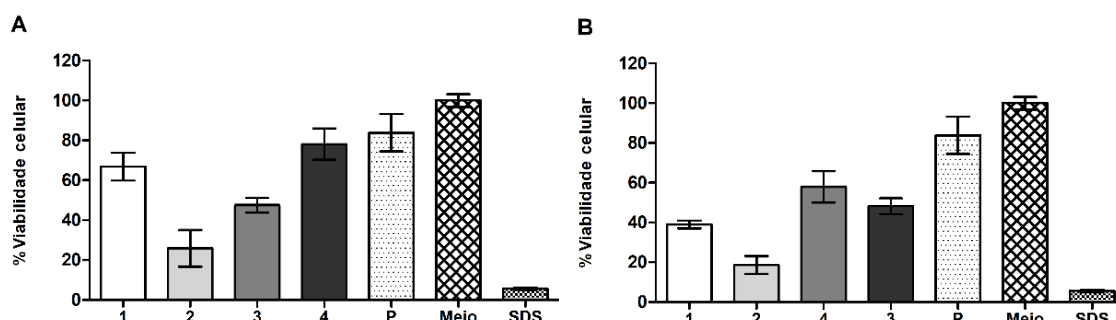


Fig. 8 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 24h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SLNs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo positivo. A concentração de nanopartículas foi de 500 mg / mL em todas as amostras (n=8, média ± DP).

Não são verificados efeitos ao nível da membrana celular para todas as formulações estudadas (Fig. 7) mesmo para uma exposição prolongada. No entanto para a viabilidade celular pelo método do estado metabólico celular (Fig.8) verifica-se que as partículas com GL (Fig.8-B) induzem uma redução da percentagem de viabilidade celular, atingindo valores abaixo de 50%. Para as partículas com PE, as formulações que contêm CTAB+PRT e SA são as que apresentam valores mais baixos. Contrariamente, a amostra 1 e amostra 4 não revelam alterações nos valores de viabilidade celular. Estas amostras conseguem manter valores acima dos 70%, valores estes considerados bastante aceitáveis.

Apesar da qualidade dos valores obtidos para a avaliação da integridade de membrana, uma exposição de 24h, inviabiliza uma aplicação das SLNs testadas. A maioria percentagens obtidas para a manutenção do metabolismo celular, com valores abaixo dos 50% levam a um risco acrescido para a segurança do hospedeiro, já que as NPs comprometem a viabilidade celular.

Numa hipotética aplicação das SNLs para a realização de terapia genética, uma administração com uma concentração de suspensão coloidal de 500mg/mL seria extremamente elevada e desnecessária para que fosse atingido um índice terapêutico desejado. No entanto para comprovar com relativa segurança a aplicabilidade em ambiente biológico das SNLs foram realizados ensaios com estas concentrações. No entanto, visto os resultados respeitantes à citotoxicidade não serem os mais promissores, e tendo em conta que a concentração das amostras ser bastante elevada, novos testes foram realizados com diminuição da concentração, para 250mg/mL.

Mantendo o tempo de exposição, foram então realizados novos ensaios, com a nova concentração de SNLs a fim de obter valores de viabilidade celular satisfatórios.

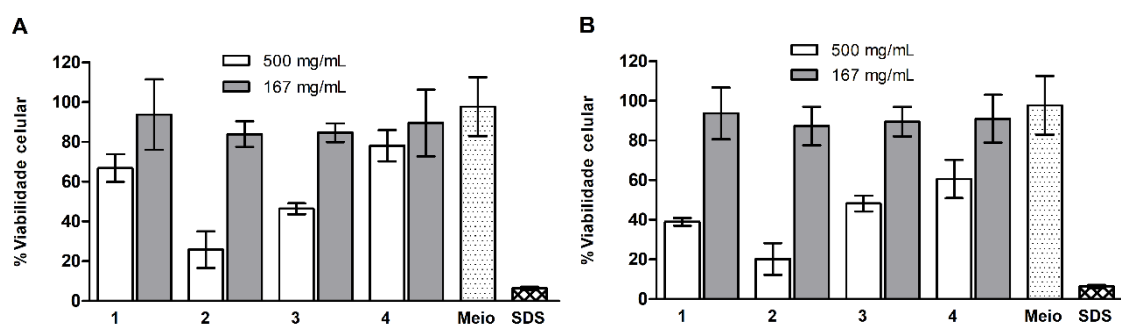


Fig. 9 % de viabilidade celular de linhas celulares HEK293T após 24h de exposição com (P) Pluronic F68 0,1% e SNLs de (A) Precirol e (B) Geleol com (1) CTAB 0,01%; (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%; (3) SA e (4) SA + PRT 0,05%, tendo como respetivos controlos (Meio) controlo negativo; (SDS) controlo (n=8, média \pm DP).

Após a execução dos novos ensaios, tornam-se visíveis os efeitos causados pela diminuição da concentração das SNLs testadas. Como seria de esperar, tanto nas SNLs de PE como de GL a diminuição da concentração das suspensões leva a um aumento significativo da percentagem de viabilidade celular, com um valor médio de aumento na ordem dos 41%.

Para as partículas de PE foi obtida uma média de 88% e muito semelhantemente foi obtida uma percentagem de 90% para as partículas de GL. Mesmo para as amostras que tinham anteriormente sofrido uma maior quebra na viabilidade celular, com a redução da concentração são obtidos valores bastante aceitáveis e encorajadores para uma futura aplicação das partículas.

Terminados os ensaios de viabilidade celular existem certos aspetos de devem ser referidos. Em termos de manutenção de integridade de membrana, independentemente da amostra ou tempo de exposição, são obtidos valores sempre equivalentes ao controlo utilizado, o que revela a grande segurança das partículas testadas para o ensaio realizado. No entanto para os estudos de manutenção do metabolismo celular o mesmo não é verificado. A partir das 6h são notórias alterações significativas na viabilidade celular, com ênfase das partículas de GL, alterações essas agravadas para uma exposição de 24h. Apesar do estatuto GRAS que possui, a maior citotoxicidade, comparativamente as SNLs de PE pode ficar a dever-se aos componentes associados utilizados na produção das SNLs, o que poderá derivar um complexo mais citotóxico, formado pelo lípido e respetivo modulador de carga. Esta afirmação também é

suportada pelo facto de que as nanopartículas produzidas neste estudo que possuem na sua composição CTAB, independentemente do lípido utilizado, são tendencialmente mais citotóxicas, o que vem confirmar a citotoxicidade associada aos tensoativos catiónicos como o caso do CTAB.

No entanto apesar de todas as contradições, pela redução da concentração da concentração de SLNs aplicadas, a percentagem de viabilidade celular é recuperada para valores bastante aceitáveis, sendo ultrapassadas todas as dificuldades encontradas ao longo do estudo realizado. Confirma-se assim que para uma concentração de 250mg/mL de suspensão colóide, qualquer uma das amostras testadas, para uma exposição de 24h conseguem manter a viabilidade celular para os dois pontos finais testados, integridade de membrana e metabolismo celular.

3.4. Purificação do DNA plasmídico

A quantidade de plasmídeo foi doseada por espectrofotometria (260nm) e calculada pela fórmula anteriormente expressa no capítulo de materiais e métodos. Para determinar a pureza do plasmídeo produzido mediu-se também a absorvência a 280nm. A razão entre os valores da absorvência a 260nm e 280nm devem ser superiores a 1,8 para que o grau de pureza do plasmídeo seja considerado elevado. Como se pode observar pela tabela 23, o grau de pureza foi elevado para a purificação realizada.

Tabela 23 Quantificação e grau de pureza após ensaio de purificação de pDNA

Amostras	Concentração (ng/μL)	Grau de pureza
Purificação 1	269,81	1,84

Durante o processo de purificação do plasmídeo foram retiradas diversas alíquotas em etapas específicas do processo de purificação com vista a que num ensaio posterior fosse confirmada a eficácia do processo de purificação, ensaio esse que recorreu a execução de uma corrida em gel de agarose.

Assim, para executar uma separação total de DNA, utilizou-se uma concentração de 1% de agarose, executando uma corrida durante 1 hora a 70mV, onde foram colocadas as várias alíquotas retiradas, assim como uma alíquota do plasmídeo purificado, a fim de confirmar que realmente este teria sido obtido após as várias etapas do processo de purificação.

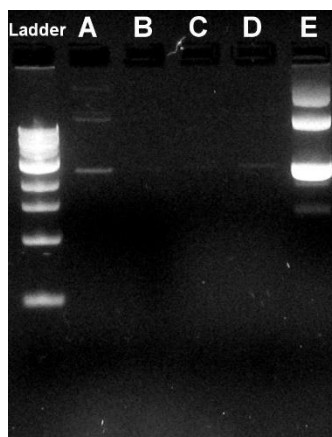


Fig. 10 Gel de agarose após 1h de corrida a 70mV com (A; B; C; D) amostras da purificação e (E) Plasmídeo

Como esperado, as amostras A, B, C e D apresentam apenas vestígios mínimos de material genético, fator bastante satisfatório que revela que a maioria do material genético foi purificada, não existindo perdas durante o processo de purificação. A grande maioria do plasmídeo purificado encontra-se na amostra E, visível pela intensidade das bandas.

Os resultados vêm confirmar que a purificação do plasmídeo realizada através do Kit foi bem-sucedida, confirmando os dados de quantificação mencionados anteriormente.

3.5. Ensaio de condensação

3.5.1. Ensaio fluorométrico

Finalizados os processos de otimização e modulação de propriedades das SLNs produzidas, foram realizados ensaios de condensação com o plasmídeo anteriormente purificado (pGFP). Foi utilizada como sonda fluorescente o iodeto de propídio. Para a formação dos complexos (SLN+pGFP) foram utilizados os vários lotes de partículas otimizados (5 μ L), sendo realizados ensaios em triplicado por lote (tabela 24). As partículas tiveram um tempo de contacto com o plasmídeo de 30 minutos, necessários à formação dos complexos, sendo adicionado iodeto de propídio que se ligou ao plasmídeo que se encontrava livre. Pela medição da fluorescência das amostras em comparação com o plasmídeo na mesma quantidade livre foi possível determinar os valores da percentagem de plasmídeo condensado pelas partículas.

Tabela 24 Composição das SLNs utilizadas nos ensaios de condensação

Amostra	Composição
1	Precirol + CTAB
2	Precirol + SA
3	Geleol + CTAB
4	Geleol+ SA
5	Precirol + CTAB + PRT
6	Precirol + SA + PRT
7	Geleol + CTAB + PRT
8	Geleol + SA + PRT

Tabela 25 Percentagem de pGFP livre e condensado (n=3, média ± DP)

Amostra	Composição	Livre (%)	Condensado (%)
1	Precirol + CTAB	77 ± 4	23 ± 4
2	Precirol + SA	53 ± 6	47 ± 6
3	Geleol + CTAB	99 ± 1	1 ± 1
4	Geleol+ SA	51 ± 12	49 ± 12
5	Precirol + CTAB + PRT	13 ± 3	87 ± 3
6	Precirol + SA + PRT	9 ± 5	91 ± 5
7	Geleol + CTAB + PRT	6 ± 3	94 ± 3
8	Geleol + SA + PRT	9 ± 1	91 ± 1

Como se pode observar pelos resultados obtidos para a percentagem de pGFP livre e condensado (tabela 25) as partículas com protamina são as que apresentam valores mais elevados.

Contrariamente, as percentagens de condensação obtidas para as formulações sem a adição do péptido apresentam valores abaixo dos 50%, com destaque para as partículas que utilizam CTAB nas quais a percentagem de condensação alcança os valores mais baixos.

Com este ensaio determinou-se que a adição de protamina, torna a condensação mais eficaz, obtendo-se assim uma maior quantidade de complexos formados (SLN+pGFP). O aumento da condensação pela adição da protamina pode ficar a dever-se a uma diminuição do impedimento estereoquímico, o que possibilita uma melhor interação eletrostática entre o material genético e as NPs.

De modo a otimizar os resultados de condensação foram realizados ensaios posteriores, com a utilização de dois diferentes rácios de SLNs, nomeadamente 10 e 40 µL (tabela 26).

Tabela 26 Resultados de condensação de pGFP para 5, 10 e 40µL de partículas.

Amostra	Composição	5 µL		10 µL		40 µL	
		Livre (%)	Condensado (%)	Livre (%)	Condensado (%)	Livre (%)	Condensado (%)
5	Precirol + CTAB + PRT	13	87	25	75	87	52
6	Precirol + SA + PRT	9	91	10	90	91	69
7	Geleol + CTAB + PRT	6	94	24	76	94	33
8	Geleol + SA + PRT	9	91	17	83	91	45

Para os ensaios demonstrados anteriormente foi obtida uma percentagem media de condensação de 81% para um rácio de 10µL, de 50% para um rácio de 40µL e já obtido no ensaio inicial uma percentagem de 91% para um rácio de 5µL. Constata-se assim que idealmente deve ser utilizado um rácio de 5µL de suspensão de SLNs para que seja obtida uma percentagem de condensação maximizada. Apesar de inferiores, os restantes rácios apresentam só por si valores também bastante satisfatórios.

3.5.2. Gel de agarose

Finalizados os ensaios fluorométricos, tal como aconteceu após a purificação do vetor plasmídico, foi efetuado um teste em gel de agarose com os complexos formados com as partículas com o plasmídeo. Como controlo positivo foi utilizada polietilenimina (PEI) 25KDa, já que este se encontra descrito como tendo elevada capacidade de condensação [77].

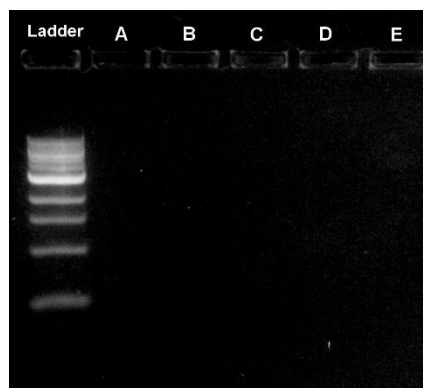


Fig. 11 Gel de agarose após 1h de corrida a 70mV de (A)PE+CTAB+PRT; (B)PE+SA+PRT; (C) GL+CTAB+PRT; (D)GL+SA+PRT e (E) controlo positivo.

Pela a observação da imagem obtida do gel de agarose (Fig. 11) confirma-se os resultados obtidos nos ensaios fluorométricos anteriormente discutidos. Como era esperado, apenas são visíveis bandas na corrida efetuada pelo *ladder*. A inexistência de qualquer outra banda nos restantes poços (A, B, C e D) é um indicador que o material se encontra praticamente na sua totalidade condensado com as SLNs, visível no topo do gel. Caso isso não se verificasse, e o pDNA se encontrasse livre, seriam visíveis bandas ao longo das corridas.

Confirmados os resultados obtidos para o ensaio fluorométrico, pela realização de corrida em gel de agarose e determinado qual o melhor rácio de SLNs a ser aplicado para a otimização da condensação, ficou determinado que em estudos posteriores seriam apenas utilizadas as SLNs, nas quais fora adicionado PRT. A escolha fica a dever-se ao facto de que para as restantes nanopartículas os valores de condensação obtidos foram insatisfatórios, o que impossibilitaria a formação dos complexos terapêuticos e conseqüente não execução de uma terapia eficaz.

Tabela 27 Composição das SLNs selecionadas após os ensaios de condensação

Amostra	Composição
5	Precirol + CTAB + PRT
6	Precirol + SA + PRT
7	Geleol + CTAB + PRT
8	Geleol + SA + PRT

3.6. Ensaio de internalização

Como se pretende que estas partículas transportem o DNA para o interior da célula é importante a realização de ensaios que determinem a sua internalização. Além disso, consoante o grau de internalização, assim serão influenciadas as interações físico-químicas entre os complexos e as membranas biológicas. Um maior grau de internalização coincidirá com um aumento dessas interações, o que levará a um possível aumento de toxicidade.

Usando cumarina-6 como sonda, foi possível através da medição da fluorescência que esta emite, determinar a concentração de SLNs internalizadas pelas células HEK293T.

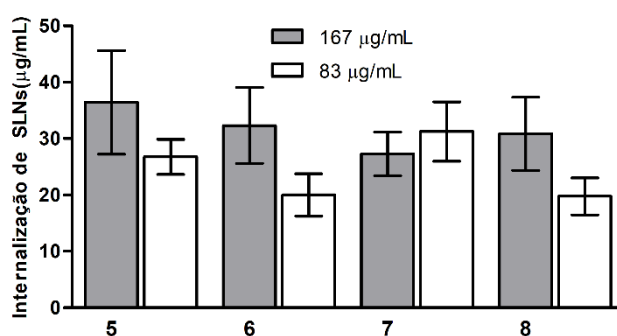


Fig. 12 Quantificação da absorção celular *in vitro* das SLNs carregadas com coumarina-6 por células HEK293T a duas concentrações de SLNs. ($n = 8$, média \pm DP).

Usando duas concentrações iniciais distintas (Fig. 12), consta-se que independentemente da amostra utilizada, todas as SLNs são internalizadas de forma eficaz. Verifica-se uma internalização dependente de concentração, já que uma concentração superior leva a uma maior internalização, com exceção da amostra 7. Verificam-se diferenças estatísticas na internalização entre amostras para a concentração mais baixa, no entanto,

essas diferenças são dissipadas pelo aumento da concentração de partículas e respectivo aumento de internalização.

3.6.1. Microscopia de fluorescência

Para melhor compreender e assegurar uma maior confiabilidade nos ensaios de internalização anteriormente realizados, as células expostas às SLNs foram observadas através de microscopia de fluorescência. Com esta técnica multicolor de fluorescência, é possível definir a localização aproximada das SLNs dentro das células.

Para isso foram utilizadas SLNs carregadas com Coumarin-6, utilizando as mesmas condições de incubação das células com as NPs. Foi executado procedimento de multicoloração, a partir do qual foi possível distinguir o compartimento nuclear e citoplasmático. Da mesma forma foi possível distinguir de forma clara as SLNs contendo uma fluorescência verde.

Com a utilização do DAPI (4', 6-Diamidino-2-Fenilindole, Di-hidrocloreto) foi possível marcar o compartimento nuclear das células. Trata-se de um marcador de ácidos nucleicos, em especial para aglomerados de adenina-tirosina.

Além disso, para a observação do compartimento citoplasmático foi utilizada uma sonda de faloidina marcada com rodamina, sendo que esta é altamente seletiva para a marcação da F-actina. Esta proteína pode ser facilmente encontrada no citoesqueleto de eucariotas e, por essa razão, tem a capacidade de definir os limites celulares.

A Fig. 13 apresenta as imagens adquiridas, através das quais foi possível confirmar os resultados obtidos no ensaio de internalização.

Observando os diferentes compartimentos celulares, hipoteticamente não é possível garantir que as SLNs se encontram no compartimento nuclear. Em contraste, tal como verificado nos ensaios de internalização, é verificada a internalização das SLNs independentemente do tipo de lípido utilizado.

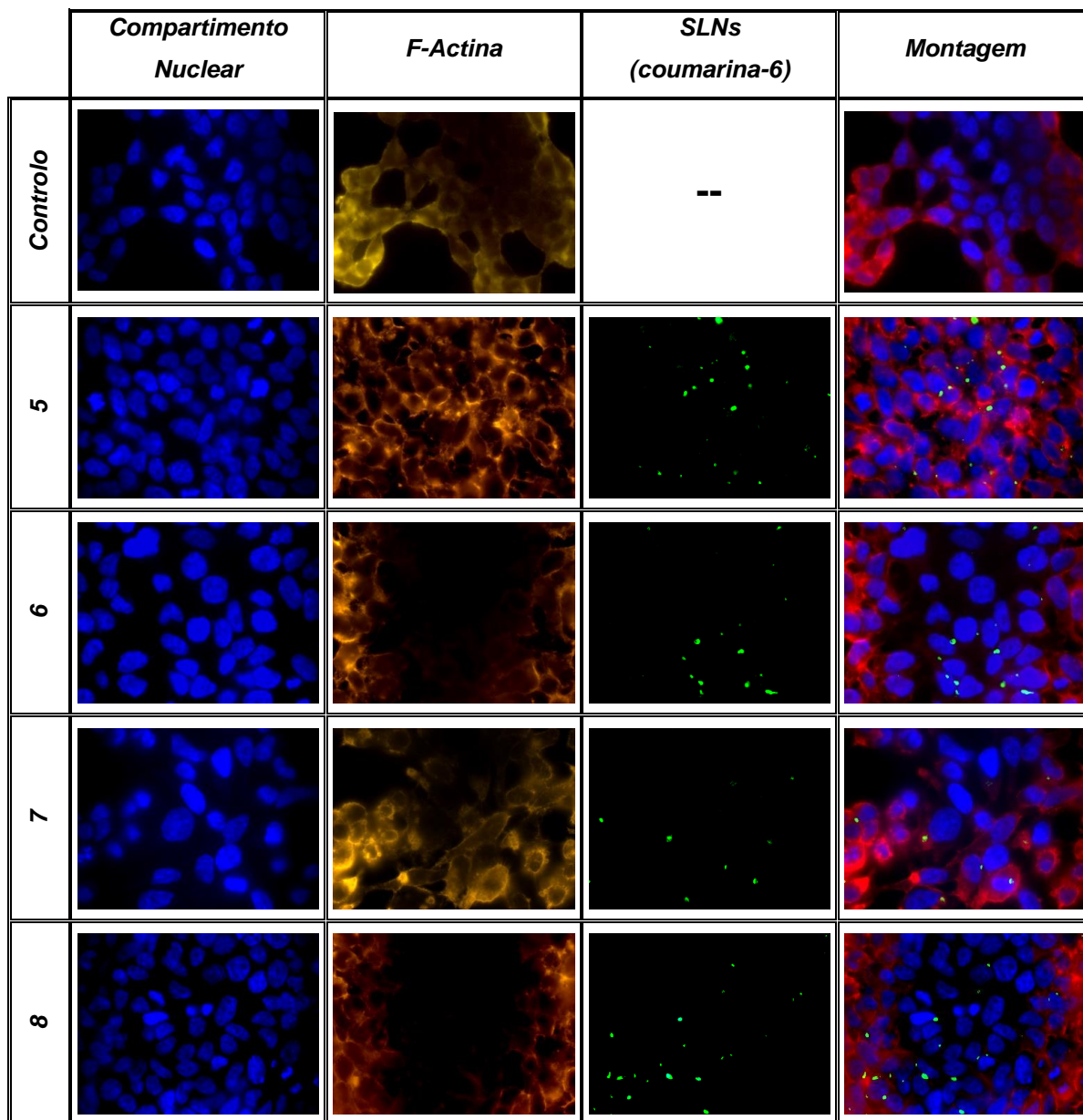


Fig. 13 *Imagens (100x) de microscopia de fluorescência. As colunas indicam os componentes singulares das células marcadas e as nanopartículas carregadas com Coumarina-6. A última coluna diz respeito à junção de todas as imagens.*

3.7. Ensaio de transfecção

Para confirmar que as partículas efetivamente tinham a capacidade de transportar o plasmídeo pGFP até ao núcleo das células HEK293T, e assim ser expresso em proteína fluorescente procedeu-se a estudos de transfecção celular com as partículas que apresentaram os melhores resultados de condensação de plasmídeo [78].

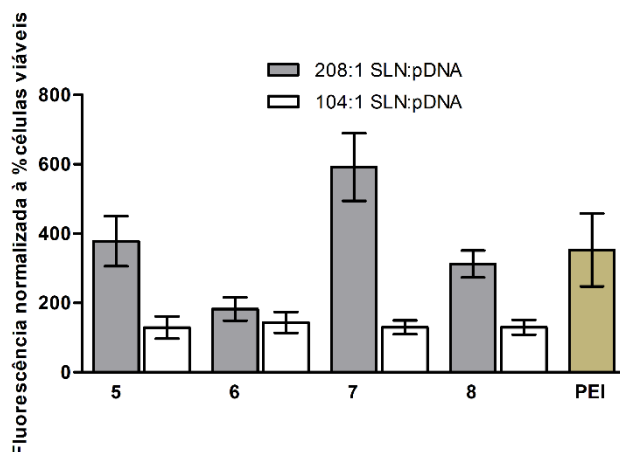


Fig. 14 Expressão de GFP normalizada com a percentagem de células viáveis 48h pós-transfecção da linha celular HEK293T com duas proporções de SLN: pGFP (208:1, 104:1) com as amostras de SLN de (5) PE+CTAB+PRT; (6) PE+SA+PRT; (7) GL+CTAB+PRT e (8) GL+SA+PRT

Finalizado o ensaio de viabilidade celular, e calculada a fluorescência normalizada à percentagem de células viáveis, numa primeira observação constata-se que para a razão mássica mais baixa de SLNs:pGFP (104:1), a transfecção é substancialmente inferior aos valores obtidos para a razão de 208:1.

Tendo em conta a composição das SLNs estudadas, verifica-se que para as amostras com uma menor razão, a composição em nada interfere na transfecção, no entanto, para a maior razão, o mesmo já não se verifica. Existem uma grande disparidade de valores entre as partículas constituídas por SA ou CTAB. Para estas as últimas a transfecção apresentam valores muito mais elevados e assim uma transfecção mais eficiente. Constata-se também uma maior transfecção para as partículas de GL quando comparado as de PE.

3.7.1. Microscopia de fluorescência

Semelhantemente ao ensaio realizado após os ensaios fluorométricos de internalização, também para a confirmação dos resultados obtidos para a transfecção foram realizados ensaios de microscopia de fluorescência.

Para isso foram utilizados os complexos anteriormente produzidos (SLN+pGFP), foram transfetadas células HEK293T cultivadas em lâminas de vidro. Após 48h de transfecção as células foram fixadas e marcadas os núcleos com DAPI e as amostras analisadas por microscopia de fluorescência.

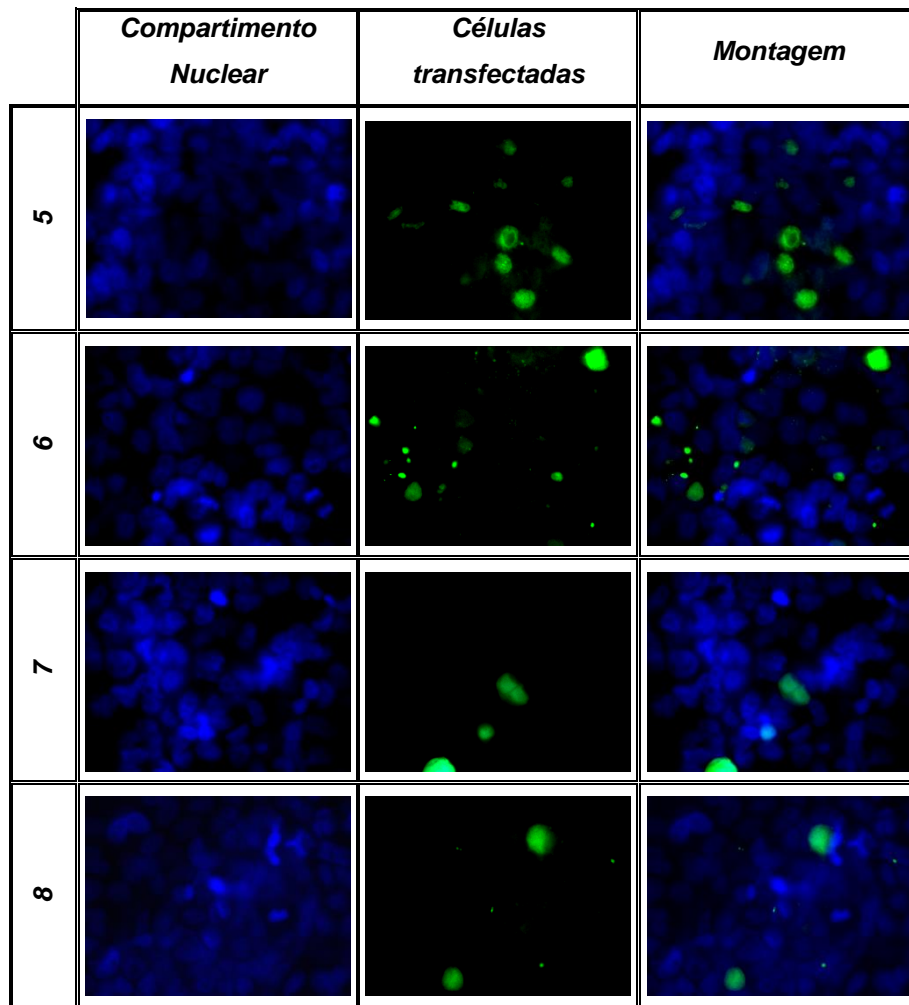


Fig. 15 *Imagens (100x) de microscopia de fluorescência células HEK293T após 48h de transfecção com nanoparticulas com pGFP.. (núcleos marcados com DAPI e as células a expressarem proteína GFP (verde)).*

Tal como pretendido, pela análise das imagens da figura 15, verifica-se que as SLNs com pGFP têm capacidade para transfetar as células HEK293T. É possível observar em todas as amostras estudadas que existiu expressão da GFP, denotada pela coloração verde existente. São assim confirmados de forma qualitativa os dados quantitativos obtidos anteriormente, no ensaio de transfecção.

3.8. Hemólise

O desenvolvimento de materiais sintéticos, polímeros, lípidos e seu crescente uso em áreas como a nanomedicina tornam a pesquisa da hemocompatibilidade dos biomateriais produzidos muito relevante [79]. Esta associada a uma correta determinação da citotoxicidade das NPs, garante uma maior segurança para uma futura aplicação em ambiente biológico.

Tendo em conta a possível aplicação intravenosa das NPs produzidas, um dos requisitos necessário para o seu uso é a obtenção de um tempo de circulação o mais longo possível na corrente sanguínea, mantendo a maior estabilidade possível tanto de SLNs como dos componentes sanguíneos [80].

A determinação da hemocompatibilidade ganha também uma importância crítica para o alcance de perfis fármaco-terapêuticos eficientes [68].

Afim de avaliar a hemocompatibilidade, foi executada um ensaio de hemólise, ensaio que avalia a percentagem de destruição de eritrócitos e respectiva libertação de hemoglobina. Foi realizada a respetiva leitura da absorvência em placa de 96 poços (Fig.16), resultante da hemoglobina libertada após contacto das SLNs com amostras de sangue humano. Os dados obtidos foram analisados e a percentagem de hemólise calculada segundo a formula apresentada no capítulo de materiais e métodos.

Tabela 28 Percentagem de hemólise

Amostra	Hemólise (%)
PE+CTAB+PRT	11,2 ± 0,6
PE+SA+PRT	9,1 ± 3,1
GL+CTAB+PRT	3,7 ± 2,6
GL+SA+PRT	7,5 ± 0,7
PBS	0,6 ± 0,2
Tris X-100 1%	80,3 ± 14,2



Fig. 16 Placa de 96 poços com as amostras testadas para hemólise

Não existindo descrito em literatura valores limite de hemólise, torna-se difícil realizar um estudo mais completo de hemólise, no entanto, observando os valores obtidos, conclui-se que na sua grande maioria os resultados são bastante aceitáveis. Foi obtida uma média de 7,9% de hemólise, sendo que as amostras de GL revelam uma menor destruição de eritrócitos quando comparados com os valores obtidos para as SLNs de PE. Das amostras testadas, aquela constituída por GL+CTAB+PRT é a que apresenta o valor mais baixo de percentagem de hemólise.

3.9. Estudos de estabilidade

3.9.1. Efeito da temperatura

3.9.1.1. Efeito da temperatura a 4°C e à temperatura ambiente

Sabe-se que, quando se trabalha com nanopartículas como suspensão aquosa, a sua estabilidade química e física (agregação ou fusão de partículas) é de grande importância. A instabilidade nas formulações pode levar a limitações na aplicação das nanopartículas e assim comprometer a sua eficácia.

No que diz respeito ao trabalho desenvolvido, é importante realçar a importância da estabilidade das partículas, uma vez que estas são produzidas com o propósito de uma futura aplicação intravenosa. Aglomerados ou agregação de partículas podem levar a coágulos na corrente sanguínea, pondo em causa a segurança do paciente, podendo conduzir a casos de trombose, hemorragias ou embolia.

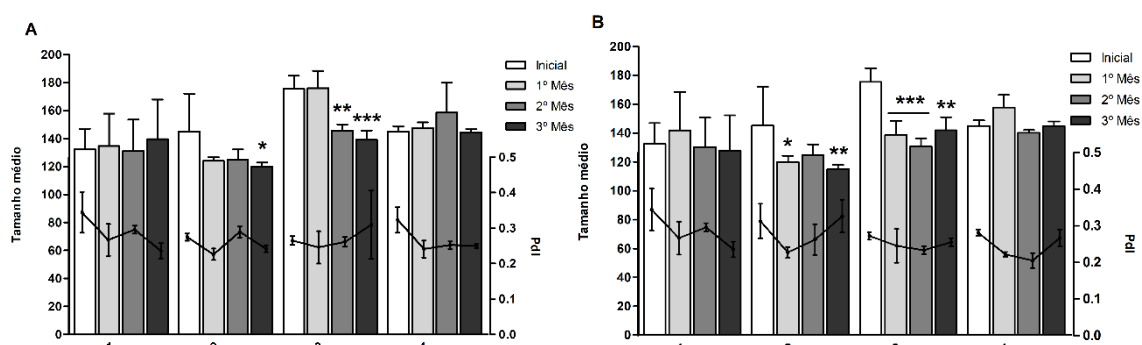


Fig. 17 Tamanho médio e Pdl de (1): PE + CTAB 0,01% SLN, (2) PE + CTAB 0,01% + PRT 0,05% SLN, (3) PE + SA SLN e (4) PE + SA + PRT 0,05% SLN recém-preparadas e após 1, 2 e 3 meses de armazenamento em suspensão a (A) 4°C e (B) temperatura ambiente (n = 9, média ± DP).

No que diz respeito às amostras de PE é possível verificar a existência diferenças estatísticas significativas nas amostras constituídas por CTAB+PRT e SA (Fig.17). As diferenças são observáveis tanto a 4°C como à temperatura ambiente, no entanto não relevantes para o estudo em questão já que, tal como acontece nas restantes amostras, os tamanhos são mantidos abaixo dos 200nm e os valores de Pdl mantidos abaixo dos 0,3.

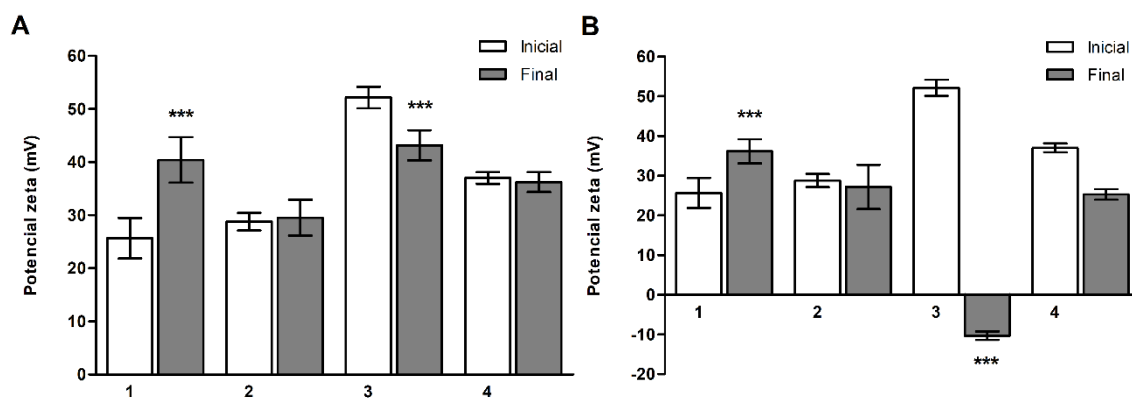


Fig. 18 Potencial zeta de (1): PE + CTAB 0,01% SLN, (2) PE + CTAB 0,01% + PRT 0,05% SLN, (3) PE + SA SLN e (4) PE + SA + PRT 0,05% SLN recém-preparadas e após 3 meses com armazenamento em suspensão a (A) 4°C e (B) temperatura ambiente (n=9, média; ± DP).

Apesar da estabilidade demonstrada na para o tamanho médio de partícula e Pdl, o mesmo não é verificado para o potencial zeta. Para as amostras sem adição de PRT são verificadas alterações estatisticamente significativas, em ambas as condições de estabilidade avaliadas. Para os ensaios a 4°C apesar das alterações verificadas, estas não comprometem a qualidade das suspensões coloidais, uma vez que conseguem permanecer em valores aceitáveis (>30mV;).

Contrariamente nos ensaios realizados a TA, levam a que a amostra 3, tome valores de potencial zeta negativos, sendo impraticáveis para a realização da condensação com material genético. As alterações verificadas na amostra 1, apesar de levarem a um aumento de carga, não influencia a estabilidade das suspensões.

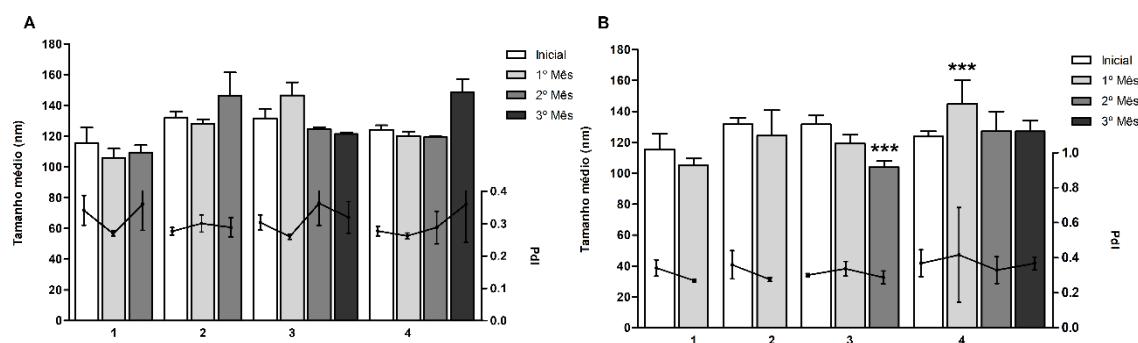


Fig. 19 Tamanho médio e Pdl de (1): GL + CTAB 0,01% SLN, (2) GL + CTAB 0,01% + PRT 0,05% SLN, (3) GL+ SA SLN e (4) GL + SA + PRT 0,05% SLN recém-preparadas e após 1, 2 e 3 meses de armazenamento em suspensão a (A) 4°C e (B) temperatura ambiente (n=9, média; ± DP).

Contrariamente ao verificado nas suspensões de PE, a maioria das amostras de GL não apresentam estabilidade após os 3 meses. É de notar que as suspensões que possuem na sua composição CTAB (1 e 2) são as que apresentam menor estabilidade.

Nos estudos realizados a 4°C, as amostras anteriormente referidas apenas alcançam estabilidade até ao 2º mês, tempo após o qual as suspensões precipitam, inviabilizando a continuação dos estudos. As amostras que se mantêm estáveis durante os 3 meses são as suspensões constituídas por SA (amostra 3 e 4). Em ambas mantém tamanhos médios de

partícula sem alterações significativas, assim como valores de Pdl inferiores a 0,4, no entanto revelando uma ligeira subida ao longo dos 3 meses do estudo.

À temperatura ambiente as amostras com adição de CTAB apenas são estáveis durante o primeiro mês, findo o qual acabam por precipitar tal como acontecera nos ensaios a 4°C. A amostra com maior estabilidade é aquela constituída SA com adição de protamina, mantendo valores de tamanho médio de partícula inferiores a 150nm e um valor de Pdl inferior a 0,4. Apesar da falta de estabilidade verificada nas restantes amostras, antes da ocorrência de precipitação de qualquer uma das amostras o tamanho de partícula se mantém sempre abaixo dos 200nm.

É de notar também que quando comparados os dados da estabilidade a 4°C e à temperatura ambiente, as SLNs constituídas por GL são mais instáveis, destacando-se as que possuem na sua composição CTAB, cuja estabilidade apenas se mantém unicamente por um mês.

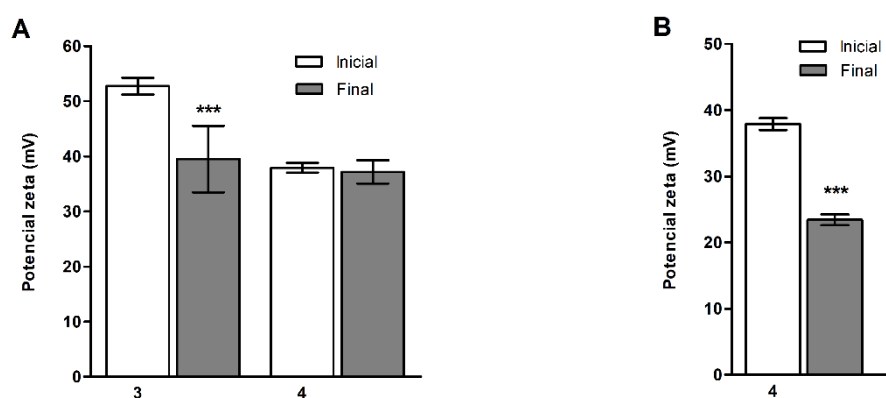


Fig. 20 Potencial zeta de (3) GL + SA SLN e (4) GL + SA + PRT 0,05% SLN recém-preparadas e finalizados os testes de estabilidade com armazenamento em suspensão a (A) 4°C e (B) temperatura ambiente (n=9, média; ± DP)

Das amostras que não sofreram precipitação, tal como ocorrera para o PE, foram medidos os valores de potencial zeta no início e no final dos estudos de estabilidade. Nos resultados obtidos para as amostras a 4°C são observáveis diferenças estatísticas para a amostra 3. Apesar da diminuição do potencial zeta, não existe qualquer comprometimento da qualidade da amostra, uma vez que o valor de carga se mantém acima dos 30mV.

O mesmo não é verificado para a amostra 4 a TA, onde a carga diminui para um valor médio de 23mV, o que põe em causa a estabilidade da amostra, mesmo sem serem registadas anteriormente alterações no tamanho médio de partícula.

Finalizados os estudos de estabilidade a 4°C e a TA, existem vários aspetos que ressaltam. As amostras de PE na generalidade são as mais estáveis em termos de manutenção de tamanho de partícula, no entanto, essa estabilidade apenas é verificada para as amostras com adição de PRT para o potencial zeta. Já para as amostras de GL a estabilidade é alcançada exclusivamente para a amostra de SA+PRT a 4°C, tanto para tamanho de partícula como de potencial zeta. A maior estabilidade alcançada para as amostras

onde o péptido foi adicionado, pressupõe a capacidade da PRT de indução de estabilidade nas suspensões coloidais.

3.9.1.2. Efeito da temperatura a 37°C

A fim de reproduzir o comportamento das nanopartículas à temperatura corporal humana, foi realizado um ensaio de 2h, colocando as suspensões coloidais a 37°C durante esse período tempo, registrando e comparando com os valores iniciais de tamanho médio de partícula e potencial zeta.

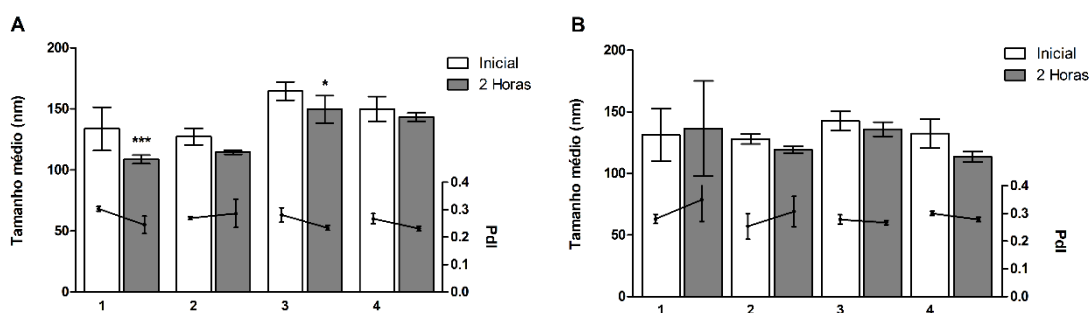


Fig. 21 Tamanho médio e Pdl de SLNs de (A) PE e (B) GL com (1) CTAB 0,01%, (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%, (3) SA e (4) SA + PRT 0,05 recém-preparadas e após 2 horas a 37°C (n=9, média; ± DP)

Independentemente do tipo de lípido utilizado a totalidade das suspensões de SLNs mantém-se estável após as 2 horas em banho de água a 37°C. Apesar das diferenças estatísticas existentes, especificamente nas suspensões constituídas por PE com CTAB estas não revelam ser pertinentes para o estudo em causa, visto que o tamanho de partícula se mantém muito abaixo dos 200nm, tal como acontece nas restantes suspensões. Além do tamanho, o Pdl também não apresenta alterações significativas mantendo valores abaixo dos 0,3.

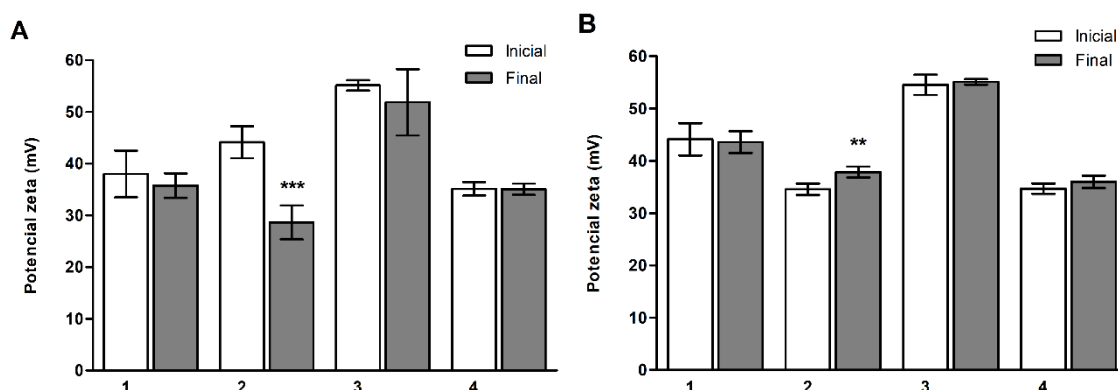


Fig. 22 Potencial zeta de (A) PE e (B) GL com (1) CTAB 0,01%, (2) CTAB 0,01% + PRT 0,05%, (3) SA e (4) SA + PRT 0,05 recém-preparadas e após 2 horas a 37°C (n=9, média; ± DP).

Na maioria nas amostras testadas, não são verificadas alterações estatísticas significativas. Após 2h em banho de 37°C as suspensões coloidais, mantém a carga superficial inicial. A exceção encontra-se na amostra 2, onde existe uma redução significativa do potencial

zeta. No entanto, apesar de reduzido, a carga superficial ainda se mantém muito próxima dos 30mV, o que poderá eventualmente garantir uma estabilidade da amostra para as condições testadas.

Fica assim verificado que para uma possível aplicação das amostras num sere humano, a estabilidade das amostras não é afetada pela temperatura corporal até um período de 2h.

3.9.2. Efeito da liofilização

Finalizado o processo de liofilização, os pós obtidos foram reconstituídos em água MilliQH₂O, no mesmo volume de amostra adicionado anteriormente e a respetiva homogeneização realizada. Devido à ineficácia da reconstituição, foram liofilizadas novas amostras e além da adição de água, as amostras foram colocadas em banho de ultrassons por 3min, seguido de 3 ciclos de agitação por *vortex*, com 30 segundos cada.

Terminado o processo de reconstituição das amostras foi observável uma grande quantidade de flóculos nas amostras, assim como uma elevada quantidade de precipitado, não sendo realizada uma correta homogeneização.

Apesar das diferentes soluções de crio-protetores utilizadas, assim como diferentes concentrações das respetivas soluções, não foi possível realizar a caracterização das amostras.

Apesar da utilização de crio-protetores, o processo de liofilização pode levar podem a vários stresses nas amostras tanto durante os passos de congelamento como de secagem que podem resultar na desestabilização das suspensões coloidais. Exemplo disso são os cristais formados durante o congelamento das amostras que podem induzir stress mecânico nas partículas [81].

3.9.3. Efeito das condições biológicas

Para finalizar os ensaios de estabilidade foram realizados ensaios em dois tampões diferentes, ambos com a finalidade de mimetizar as condições biológicas a que as NPs estarão sujeitas após administração.

O primeiro ensaio foi realizado em PBS, tendo em conta que se trata de uma solução isotónica, com uma concentração salina aproximada à do corpo humano. Foi também realizado um ensaio com SBF, uma solução com uma concentração iónica muito próxima à do plasma sanguíneo humano [82].

Após a e elaboração de uma solução de 10mM de PBS, as amostras foram diluídas num rácio de 1:4 (amostra:PBS) e mantidas em tampão por um período de 24 horas. Após esse período foi realizada a caracterização em termos de tamanho médio de partícula. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos antes da adição do PBS e a respetiva análise estatística elaborada.

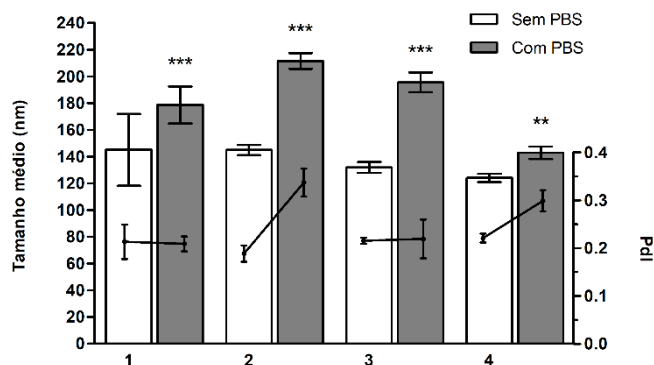


Fig. 23 Tamanho médio e Pdl de SLNs de (1) PE+CTAB 0,01%+PRT 0,05%, (2) PE+SA+PRT 0,05%, (3) GL+CTAB 0,01%+PRT 0,05% e (4) GL+SA+PRT 0,05% recém-preparadas e após 2 horas em suspensão em PBS (10mM) (n=9, média; \pm DP).

Apesar das diferenças estatísticas observadas, os dados recolhidos demonstram que apesar do aumento de tamanho do tamanho médio de partícula, na maioria das amostras são mantidos abaixo dos 200 nm. O mesmo ocorre no Pdl que apesar do aumento que sofre, os valores são mantidos abaixo dos 0,3. A exceção ocorre na amostra 2, onde o tamanho médio e Pdl alcançam valores fora dos pretendidos (212 ± 3 nm e $0,421 \pm 0,029$, respectivamente).

O aumento de tamanho de partícula poderá ser explicado pela ligação dos aniões, presentes no tampão PBS, à superfície das SLNs devido à carga positiva que estas apresentam. Ao serem estabelecidas interações eletrostáticas entre os aniões e as partículas, o tamanho destas será maior, assim como o Pdl.

3.9.3.1. Estabilidade em SBF

Para a estabilidade em SBF as amostras foram diluídas num rácio de 1:4 (amostra:SBF) e foram mantidas em tampão por um período de 24 horas. Após esse período foi realizada a caracterização em termos de tamanho médio de partícula e Pdl. Os resultados obtidos comparados com os obtidos antes da adição do SBF.

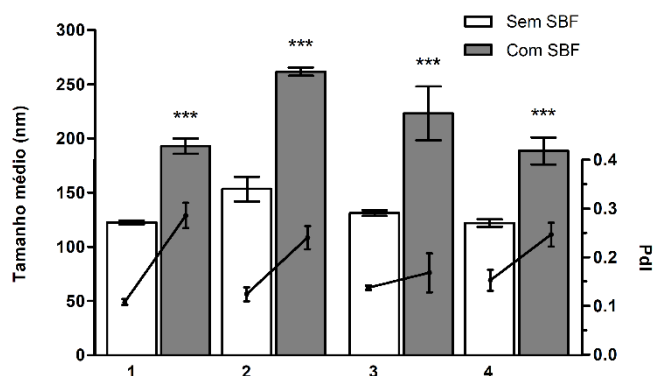


Fig. 24 Tamanho médio e Pdl de SLNs de (1) PE+CTAB 0,01%+PRT 0,05%, (2) PE+SA+PRT 0,05%, (3) GL+CTAB 0,01%+PRT 0,05% e (4) GL+SA+PRT 0,05% recém-preparadas e após 2 horas em suspensão em SBF (n=9, média; \pm DP).

Contrariamente ao que ocorreu no teste de estabilidade com PBS, neste ensaio o aumento dos tamanhos médios e bastante mais significativo. Na sua maioria as amostras atingem tamanhos médios acima de 200 nm ou valores muito próximos. Tal como anteriormente, o aumento de tamanhos pode ficar a dever-se à presença dos aniões em suspensão no tampão, desta vez em maior quantidade comparativamente ao tampão PBS. O aumento ocorrido no Pdl, apesar de ser bastante notório, consegue permanecer em valores aceitáveis para este tipo de formulações (<0,3).

3.10. Caracterização morfológica

De forma a analisar a morfologia e a possível formação de aglomerados / agregados, as SLNs foram submetidos à análise TEM.

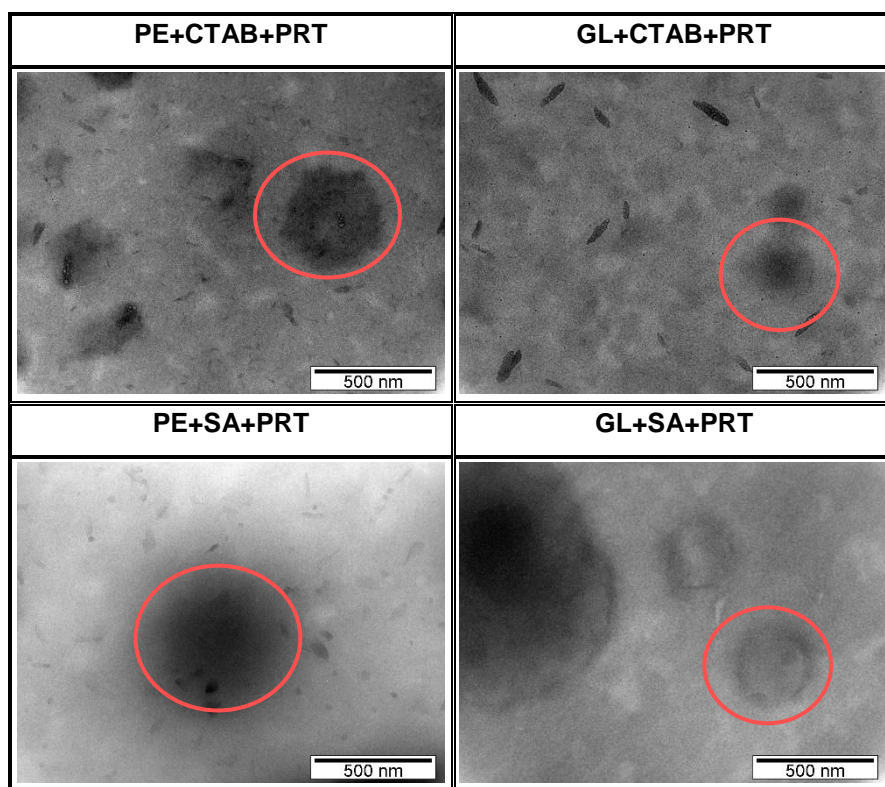


Fig. 25 Caracterização morfológica por TEM das SLNs optimizadas

As imagens obtidas para as diferentes amostras revelam SLNs de forma esférica de limites não definidos. O núcleo sólido das nanopartículas, constituído pelo lípido principal é notório pela maior intensidade de cor. Contrariamente, os contornos estão suavizados. Este facto é explicado pelo facto que o núcleo sólido ser estabilizado pela solução de tensoativo, fazendo assim com que o limite das SLNs não seja bem definido.

Em termos dos tamanhos observados, estes encontram-se de acordo com o obtido nas medições efetuadas pelo equipamento, ou seja, tamanhos inferiores a 200nm.

Constata-se também que nas amostras constituídas por CTAB, as imagens de TEM apresentam pequenas agulhas, que em nada se relacionam com as nanopartículas. Estas agulhas poderão ser um indicador da precipitação ou má homogeneização da solução de CTAB utilizada como tensioativo modulador de carga.

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas futuras

No panorama científico atual, a entrega de genes associada à terapia genética surge cada vez mais como uma das áreas na qual a investigação científica tem investido cada vez mais.

O desenvolvimento de sistemas de entrega, seguros e eficazes é um dos pontos-chave a ser investigado. Na produção destes sistemas têm sido empregues biomateriais com a capacidade de melhorarem a farmacodinâmica e conduzirem ao aumento do índice terapêutico destes sistemas. Além da eficácia, devem ser considerados os potenciais riscos associados à introdução desses materiais tanto para a saúde humana como para o meio ambiente, havendo assim a necessidade de reduzir potenciais efeitos prejudiciais dos agentes terapêuticos utilizados.

Devido às distintas propriedades que exibem, as SLNs têm vindo cada vez mais a ser usadas como sistemas de administração de genes, contornando assim as dificuldades apresentadas por sistemas existentes.

O objetivo principal deste trabalho consistiu na produção, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de novos sistemas de entrega de genes, com base em nanopartículas sólidas lipídicas.

No que diz respeito à produção das SLNs, o método de homogeneização a quente de alta velocidade revelou ser um método adequado para a obtenção de partículas com uma distribuição média de tamanhos inferior a 200 nm e com Pdl inferior a 0,3, características adequadas para uma aplicação por via parentérica. Com um tempo de homogeneização adequado e utilizando materiais com comprovada segurança em ambiente biológico foi possível produzir SLNs de PE e GL, estabilizadas por ação do tensioativo F68, sendo obtidos tamanhos médios de partícula dentro da gama esperada.

A modulação da carga superficial dessas partículas foi possível graças a ação de SA e CTAB, através dos quais se obtiveram partículas com um potencial zeta superior a +30mV, ficando assim garantida uma maior estabilidade das suspensões coloidais produzidas e carga superficial adequada a uma condensação eficiente com pDNA. Essa mesma estabilidade foi comprovada pelos ensaios realizados ao longo de 3 meses. Pelos dados recolhidos verifica-se que a maior estabilidade é alcançada para as partículas de PE em ambas as condições avaliadas, tanto em termos de manutenção de tamanho de partícula como de potencial zeta. Nos ensaios de 37°C independentemente da amostra testada, são mantidas as características físico-químicas.

Ensaio celulares revelaram que todas as amostras testadas não comprometeram a integridade membranar com nenhum dos tempos de exposição testados. Apesar da diminuição da viabilidade celular para os ensaios de avaliação do estado metabólico para um tempo de exposição de 24h, a viabilidade celular é recuperada pela diminuição da concentração de partículas testadas, ficando assim comprovada a baixa citotoxicidade das formulações produzidas.

Pela adição de PRT, é garantida a produção de complexos SLN:pGFP ficando comprovada elevada capacidade de condensação das partículas compostas pelo péptido.

Para as partículas produzidas foi também demonstrada uma elevada capacidade de internalização apenas dependente da concentração de partículas. Associada à elevada percentagem de internalização foi também provada a efetiva entrada das partículas no núcleo celular pela elevada percentagem de expressão da GFP nos ensaios de transfecção. Foi também possível uma confirmação visual dos ensaios por microscopia de fluorescência.

Pela caracterização morfológica das amostras verificou-se a não existência de aglomerados ou agregados de partículas, sendo comprovada a homogeneidade das suspensões, assim como uma produção adequada dos sistemas nanoparticulados pretendidos, visível pela estrutura esférica observada.

Analisando todos os ensaios realizados e os dados recolhidos, pode-se concluir que as SLNs produzidas com o lípido PE e moduladas por CTAB e PRT revelaram o maior potencial para uma aplicação clínica, quando comparadas com as restantes formulações testadas. Além da elevada estabilidade que apresentam tanto a 4°C como à temperatura ambiente, a sua introdução no corpo humano não é afetada pela temperatura corporal, uma vez que estas se mantêm estáveis até 2h a 37°C. As partículas apresentam uma baixa citotoxicidade e uma elevada capacidade de condensação para a eventual formação de complexos terapêuticos. São também as partículas que apresentam maior capacidade de transfecção.

Em conclusão, este trabalho sugere que as partículas desenvolvidas neste trabalho têm elevada capacidade para serem utilizadas como sistemas de entrega de genes, com potencialidade de aplicação na terapia genética de forma segura e eficiente, isto é, garantindo a segurança do paciente e o alcance de um elevado índice terapêutico.

Alguns aspetos no decurso deste trabalho poderiam ser melhorados em trabalhos futuros. Por exemplo para as formulações que apresentaram uma baixa percentagem de condensação de plasmídeo novas estratégias poderiam ser testadas a fim de garantir, um menor impedimento estereoquímico, que possibilitasse a formação dos complexos de forma mais facilitada. Como alternativa ao uso de protamina poderia recorrer-se a oligo-quitosanos ou dextrano, ambos com a capacidade de melhorar a transfecção celular [83], [84].

Em estudos futuros, seria também importante, a execução de mais ensaios de citotoxicidade com diferentes linhas celulares. Tendo em vista a possível aplicação por via parentérica das SLNs, estudos de hemocompatibilidade como ensaios de ativação plaquetária ou de produção de trombina são pertinentes para avaliação da biocompatibilidade destes sistemas coloidais.

Capítulo 5 - Referências

- [1] Y. Wang and L. Huang, "Composite nanoparticles for gene delivery," vol. 88, pp. 111–137, 2014.
- [2] A. Pathak, S. P. Vyas, and K. C. Gupta, "Nano-vectors for efficient liver specific gene transfer," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 1, pp. 31–49, 2008.
- [3] M. L. Bondi' *et al.*, "Novel cationic solid-lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery," *J. Drug Target.*, vol. 15, no. 4, pp. 295–301, 2007.
- [4] G. E. Naoum *et al.*, "Role of nanotechnology and gene delivery systems in TRAIL-based therapies," *Ecancermedicalscience*, vol. 10, pp. 1–17, 2016.
- [5] H.-Y. Lee, K. A. Mohammed, and N. Nasreen, "Nanoparticle-based targeted gene therapy for lung cancer," *Am. J. Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 1118–1134, 2016.
- [6] C. H. Liu and S. Y. Yu, "Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 79, no. 2, pp. 509–515, 2010.
- [7] J. Adijanto and M. I. Naash, "Nanoparticle-based Technologies for Retinal Gene Therapy," *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 95, no. 0 0, pp. 353–367, 2015.
- [8] P. Severino *et al.*, "Development and characterization of a cationic lipid nanocarrier as non-viral vector for gene therapy," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 66, pp. 78–82, 2015.
- [9] M. Alipour, S. Hosseinkhani, R. Sheikhnejad, and R. Cheraghi, "Nano-biomimetic carriers are implicated in mechanistic evaluation of intracellular gene delivery," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. September 2016, p. 41507, 2017.
- [10] R. J. M. G. E. Brandwijk, A. W. Griffioen, and V. L. J. L. Thijssen, "Targeted gene-delivery strategies for angiostatic cancer treatment," *Trends Mol. Med.*, vol. 13, no. 5, pp. 200–209, 2007.
- [11] S.-D. Li and L. Huang, "Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery," *Gene Ther.*, vol. 13, no. 18, pp. 1313–1319, 2006.
- [12] S. N. He *et al.*, "Ternary nanoparticles composed of cationic solid lipid nanoparticles, protamine, and DNA for gene delivery.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 2859–2869, 2013.
- [13] Y. Wang, A. Rajala, and R. Rajala, "Lipid Nanoparticles for Ocular Gene Delivery," *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, no. 2, pp. 379–394, 2015.
- [14] L. Parlea *et al.*, "Cellular Delivery of RNA Nanoparticles," *ACS Comb. Sci.*, vol. 18, no. 9, pp. 527–547, 2016.
- [15] R. Schuh, G. Baldo, and H. Teixeira, "Nanotechnology applied to treatment of mucopolysaccharidoses," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 5247, no. June, pp. 1–10, 2016.
- [16] L. Fang *et al.*, *Micro- and nano-carrier systems: The non-invasive and painless local administration strategies for disease therapy in mucosal tissues*, vol. 13, no. 1. Elsevier B.V., 2017.
- [17] S. Xiang *et al.*, "Uptake mechanisms of non-viral gene delivery," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 3, pp. 371–378, 2012.
- [18] T. Kanazawa, Y. Takashima, M. Murakoshi, Y. Nakai, and H. Okada, "Enhancement of

- gene transfection into human dendritic cells using cationic PLGA nanospheres with a synthesized nuclear localization signal," *Int. J. Pharm.*, vol. 379, no. 1–2, pp. 187–195, 2009.
- [19] I. S. Zuhorn, J. B. F. N. Engberts, and D. Hoekstra, "Gene delivery by cationic lipid vectors: Overcoming cellular barriers," *Eur. Biophys. J.*, vol. 36, no. 4–5, pp. 349–362, 2007.
- [20] H. C. Verdera, J. J. Gitz-Francois, R. M. Schiffelers, and P. Vader, "Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis," *J. Control. Release*, 2017.
- [21] C. M. Wiethoff and C. R. Middaugh, "Barriers to Nonviral Gene Delivery," *J. Pharm. Sci.*, vol. 92, no. 2, pp. 203–217, 2003.
- [22] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, "Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 941–951, 2015.
- [23] A. Radaic, E. De Paula, and M. B. De Jesus, "Factorial Design and Development of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Gene Delivery," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 14, no. April, pp. 1–8, 2014.
- [24] A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, M. A. Solinís, A. R. Gascón, and J. L. Pedraz, "Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: Transfection and intracellular trafficking in RPE cells," *Int. J. Pharm.*, vol. 360, no. 1–2, pp. 177–183, 2008.
- [25] A. E. Nel *et al.*, "Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface," *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, 2009.
- [26] R. P. Singh and P. Ramarao, "Accumulated polymer degradation products as effector molecules in cytotoxicity of polymeric nanoparticles," *Toxicol. Sci.*, vol. 136, no. 1, pp. 131–143, 2013.
- [27] S. Bhattacharjee and D. J. Brayden, "Development of nanotoxicology: implications for drug delivery and medical devices," *Nanomedicine*, vol. 10, no. 14, pp. 2289–2305, 2015.
- [28] A. del Pozo-Rodríguez, D. Delgado, A. R. Gascón, and M. Á. Solinís, "Lipid Nanoparticles as Drug/Gene Delivery Systems to the Retina," *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 29, no. 2, pp. 173–188, 2013.
- [29] D. Kasala, A.-R. Yoon, J. Hong, S. W. Kim, and C.-O. Yun, "Evolving lessons on nanomaterial-coated viral vectors for local and systemic gene therapy," *Nanomedicine*, vol. 11, no. 13, pp. 1689–1713, 2016.
- [30] L. Wasungu and D. Hoekstra, "Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes," *J. Control. Release*, vol. 116, no. 2 SPEC. ISS., pp. 255–264, 2006.
- [31] Y. Shen *et al.*, "Interaction of DNA/nuclear protein/polycation and the terplexes for gene delivery," *Nanotechnology*, vol. 21, no. 4, p. 45102, 2010.
- [32] E. Vighi, B. Ruozi, M. Montanari, R. Battini, and E. Leo, "pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 389, no. 1–2, pp. 254–261, 2010.

- [33] R. B. Gupta and U. B. Kompella, *Nanoparticle Technology for Drug Delivery*. 2006.
- [34] J. Kulbacka *et al.*, "The Effect of Millisecond Pulsed Electric Fields (msPEF) on Intracellular Drug Transport with Negatively Charged Large Nanocarriers Made of Solid Lipid Nanoparticles (SLN): In Vitro Study," *J. Membr. Biol.*, vol. 249, no. 5, pp. 645–661, 2016.
- [35] A. Seyfoddin, J. Shaw, and R. Al-Kassas, "Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery," *Drug Deliv.*, vol. 17, no. 7, pp. 467–489, 2010.
- [36] T. L. Hwang, C. T. Sung, I. A. Aljuffali, Y. T. Chang, and J. Y. Fang, "Cationic surfactants in the form of nanoparticles and micelles elicit different human neutrophil responses: A toxicological study," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 114, pp. 334–341, 2014.
- [37] S. Praveen, D. V. Gowda, A. Srivastava, and R. A. M. Osmani, "Formulation and evaluation of nanostructured lipid carrier (NLC) for glimepiride," *Der Pharm. Lett.*, vol. 8, no. 6, pp. 304–309, 2016.
- [38] P. Ji *et al.*, "Naringenin-loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, controlled delivery, cellular uptake, and pulmonary pharmacokinetics," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 10, pp. 911–925, 2016.
- [39] P. Ganesan and D. Narayanasamy, "Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery," *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 6, no. May, pp. 37–56, 2017.
- [40] A. A. Date, M. D. Joshi, and V. B. Patravale, "Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 6, pp. 505–521, 2007.
- [41] A. Siddiqui, A. Alayoubi, Y. El-Malah, and S. Nazzal, "Modeling the effect of sonication parameters on size and dispersion temperature of solid lipid nanoparticles (SLNs) by response surface methodology (RSM)," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 19, no. 3, pp. 342–346, 2014.
- [42] J. P. Barbosa, A. R. Neves, A. M. Silva, M. A. Barbosa, M. Salette Reis, and S. G. Santos, "Nanostructured lipid carriers loaded with resveratrol modulate human dendritic cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 3501–3516, 2016.
- [43] A. A. Attama and C. E. Umeyor, "The use of solid lipid nanoparticles for sustained drug release," *Ther. Deliv.*, vol. 6, no. 6, pp. 669–684, 2015.
- [44] Z. Wencui, Z. Qi, W. Ying, and W. Di, "Preparation of solid lipid nanoparticles loaded with garlic oil and evaluation of their in vitro and in vivo characteristics," *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, vol. 19, pp. 3742–3750, 2005.
- [45] S. V. K. Rompicharla *et al.*, "Formulation optimization, characterization, and evaluation of in vitro cytotoxic potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles for improved anticancer activity," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 208, no. July, pp. 10–18, 2017.
- [46] R. Shegokar, K. K. Singh, and R. H. Müller, "Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles - From lab to industrial scale," *Int. J. Pharm.*, vol. 416, no. 2, pp. 461–470,

- 2011.
- [47] H. Patil, V. Kulkarni, S. Majumdar, and M. A. Repka, "Continuous manufacturing of solid lipid nanoparticles by hot melt extrusion," *Int. J. Pharm.*, vol. 471, no. 1–2, pp. 153–156, 2014.
- [48] K. Mäder and W. Mehnert, "Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 2–3, pp. 165–96, 2001.
- [49] Y. Luo, Z. Teng, Y. Li, and Q. Wang, "Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake," *Carbohydr. Polym.*, vol. 122, pp. 221–229, 2015.
- [50] K. Bhise, S. K. Kashaw, S. Sau, and A. K. Iyer, "Nanostructured lipid carriers employing polyphenols as promising anticancer agents: Quality by design (QbD) approach," *Int. J. Pharm.*, vol. 526, no. 1–2, pp. 506–515, 2017.
- [51] J. Emami, H. Mohiti, H. Hamishehkar, and J. Varshosaz, "Formulation and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for pulmonary delivery of budesonide using Taguchi and Box-Behnken design," *Res. Pharm. Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 17–33, 2015.
- [52] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, and Z. Li, "Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery," *J. Control. Release*, vol. 100, no. 2, pp. 165–180, 2004.
- [53] L. M. Verissimo, L. F. A. Lima, L. C. M. Egito, A. G. de Oliveira, and E. S. T. do Egito, "Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy.," *J. Drug Target.*, vol. 18, no. 5, pp. 333–342, 2010.
- [54] K. Bhupinder and N. Amj, "Impact of Pluronic F-68 vs Tween 80 on fabrication and evaluation of acyclovir SLNs for skin delivery," *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–15, 2016.
- [55] C. Dal Pizzol *et al.*, "Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 11, no. 8, pp. 8581–8596, 2014.
- [56] D. Pooja, L. Tunki, H. Kulhari, B. B. Reddy, and R. Sistla, "Optimization of solid lipid nanoparticles prepared by a single emulsification-solvent evaporation method," *Data Br.*, vol. 6, pp. 15–19, 2016.
- [57] O. Y. A. Dina M. Gaber, Noha Nafee, "Myricetin solid lipid nanoparticles : Stability assurance from system preparation to site of action," *Eur. J. Pharm. Sci.*, no. August, pp. 9–12, 2017.
- [58] D. Chang *et al.*, "Investigation of interfacial properties of pure and mixed poloxamers for surfactant-mediated shear protection of mammalian cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 156, pp. 358–365, 2017.
- [59] A. Sengupta, N. Dwivedi, S. C. Kelly, L. Tucci, N. N. Thadhani, and M. R. Prausnitz, "Poloxamer surfactant preserves cell viability during photoacoustic delivery of molecules into cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 112, no. 2, pp. 405–415, 2015.
- [60] J. F. Figueiro *et al.*, "Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery:

- Development, characterization and cytotoxicity," *Int. J. Pharm.*, vol. 461, no. 1–2, pp. 64–73, 2014.
- [61] Z. Jiang *et al.*, "Comparison of two kinds of nanomedicine for targeted gene therapy: Premodified or postmodified gene delivery systems," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 2019–2031, 2012.
- [62] H. Faneca, S. Simões, and M. C. Pedroso de Lima, "Association of albumin or protamine to lipoplexes: Enhancement of transfection and resistance to serum," *J. Gene Med.*, vol. 6, no. 6, pp. 681–692, 2004.
- [63] D. P. Gaspar, V. Faria, L. M. D. Gonçalves, P. Taboada, C. Remuñán-López, and A. J. Almeida, "Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies," *Int. J. Pharm.*, vol. 497, no. 1–2, pp. 199–209, 2016.
- [64] A. Cadete, L. Figueiredo, R. Lopes, C. C. R. Calado, A. J. Almeida, and L. M. D. Goncalves, "Development and characterization of a new plasmid delivery system based on chitosan-sodium deoxycholate nanoparticles," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 45, no. 4, pp. 451–458, 2012.
- [65] H. Dong *et al.*, "Promising galactose-decorated biodegradable poloxamer 188-PLGA diblock copolymer nanoparticles of resibufogenin for enhancing liver cancer therapy," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 1302–1316, 2017.
- [66] M. Risselada *et al.*, "Pharmacokinetics and toxicity of subcutaneous administration of carboplatin in poloxamer 407 in a rodent model pilot study.," *PLoS One*, vol. 12, no. 10, p. e0186018, 2017.
- [67] G. Mancini *et al.*, "Lecithin and parabens play a crucial role in tripalmitin-based lipid nanoparticle stabilization throughout moist heat sterilization and freeze-drying," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 117, no. 12, pp. 1947–1959, 2015.
- [68] M. Durán-Lobato, L. Martín-Banderas, L. M. D. Gonçalves, M. Fernández-Arévalo, and A. J. Almeida, "Comparative study of chitosan- and PEG-coated lipid and PLGA nanoparticles as oral delivery systems for cannabinoids," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 17, no. 2, 2015.
- [69] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [70] M. M. Amiji, *Nanotechnology in cancer therapy*. 2007.
- [71] C. Nastruzzi, *Lipospheres in Drug Targets and Delivery*. 2004.
- [72] A. L. Silva, H. R. Marcelino, L. M. Veríssimo, I. B. Araujo, L. F. Agnez-Lima, and E. S. T. do Egito, "Stearylamine-Containing Cationic Nanoemulsion as a Promising Carrier for Gene Delivery," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 1339–1345, 2016.
- [73] J. Isaac and Pamela L. Scheinman, "Benzalkonium Chloride: An Irritant and Sensitizer," *Dermatitis*, pp. 1–3, 2017.
- [74] T. L. Hwang, I. A. Aljuffali, C. F. Lin, Y. T. Chang, and J. Y. Fang, "Cationic additives in nanosystems activate cytotoxicity and inflammatory response of human neutrophils:

- Lipid nanoparticles versus polymeric nanoparticles," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 371–385, 2015.
- [75] D. Yordanova, E. Ritter, I. Smirnova, and S. Jakobtorweihen, "Micellization and partition equilibria in mixed nonionic/ionic micellar systems: Predictions with molecular models," *Langmuir*, p. acs.langmuir.7b02813, 2017.
- [76] J. Liu, S. Guo, Z. Li, L. Liu, and J. Gu, "Synthesis and characterization of stearyl protamine and investigation of their complexes with DNA for gene delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 73, no. 1, pp. 36–41, 2009.
- [77] R. Lehner, K. Liu, X. Wang, M. Wolf, and P. Hunziker, "A comparison of plasmid DNA delivery efficiency and cytotoxicity of two cationic diblock polyoxazoline copolymers," *Nanotechnology*, vol. 28, pp. 0–12, 2017.
- [78] A. F. L. Schneider and C. P. R. Hackenberger, "Fluorescent labelling in living cells," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 48, pp. 61–68, 2017.
- [79] U. T. Seyfert, V. Biehl, and J. Schenk, "In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4," *Biomol. Eng.*, vol. 19, no. 2–6, pp. 91–96, 2002.
- [80] L. Ye *et al.*, "Zwitterionic-Modified Starch-Based Stealth Micelles for Prolonging Circulation Time and Reducing Macrophage Response," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 7, pp. 4385–4398, 2016.
- [81] M. D. Howard, X. Lu, M. Jay, and T. D. Dziubla, "Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid–lipid nanoparticles," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 38, no. 10, pp. 1270–1279, 2012.
- [82] T. Kokubo, "Bioactive glass ceramics: properties and applications," *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155–163, 1991.
- [83] D. Delgado *et al.*, "Dextran-protamine-solid lipid nanoparticles as a non-viral vector for gene therapy: In vitro characterization and in vivo transfection after intravenous administration to mice," *Int. J. Pharm.*, vol. 425, no. 1–2, pp. 35–43, 2012.
- [84] D. Delgado, A. Del Pozo-Rodríguez, M. Angeles Solinís, A. Bartkowiak, and A. Rodríguez-Gascón, "New gene delivery system based on oligochitosan and solid lipid nanoparticles: 'In vitro' and 'in vivo' evaluation," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 50, no. 3–4, pp. 484–491, 2013.