



**Desenvolvimento de vetores baseados em
péptidos para direcionamento à mitocôndria
Versão final após defesa**

Suzana Correia Mendes Delgado Varela

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2^o ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Diana Rita Barata Costa
Co-orientadora: Prof^a. Doutora Ângela Maria Almeida De Sousa

dezembro de 2023

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Declaração de Integridade

Eu, Suzana Correia Mendes Delgado Varela, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10345 de/o Biotecnologia da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 20/12 /2023

Suzana Correia M.D. Varela

(Suzana Correia M.D. Varela)

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, em particular à minha mãe, por nunca ter desistido de mim.

“Peregrinu di pez diskalçu na kalçadas di vida...Deus”

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Agradecimentos

A realização e conclusão deste trabalho não seria possível sem o apoio incondicional de todos ao meu redor. Serei eternamente grata.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Diana Costa e à Professora Doutora Ângela Sousa pela oportunidade de participar nos seus grupos de investigação, por toda a paciência, orientação e todo o conhecimento transmitido ao longo deste trabalho.

Agradeço também aos alunos de doutoramento Tânia Albuquerque, Ana Raquel Neves, Rúben Faria, Diana Gomes e Miguel Ferreira pela partilha de conhecimento, disponibilidade e suporte durante as atividades laboratoriais, por toda a paciência e simpatia demonstrada. Foram fundamentais para a conclusão desta etapa académica.

Gostaria de agradecer à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde pela oportunidade de realizar este projeto de investigação e de ter reunido as condições necessárias para tal.

Às lindas amigas que estiveram sempre presentes na minha vida, Kátia, Sarise, Cíntia, Liana, Lumira, Elmano, Oldair, Nila, Tairine, Ana Biatriz, Silvânia e Elizandra, obrigada por serem mais do que amigos, por serem a minha família durante todos esses anos longe de casa. Pelos momentos de alegria, jantares, conselhos e ombro amigo sempre disponível quando a saudade aperta.

Ao meu querido companheiro de vida, Isaías, por ser o meu melhor amigo, pelo incentivo, dedicação, amor e suporte em todos os momentos, obrigada por tanto.

Quero também agradecer as pessoas mais importantes da minha vida, os meus familiares. Aos meus pais, Paula Vaz e Filipe Varela, pelo amor incondicional, pela confiança depositada em mim ao longo da minha trajetória académica e por todos os sacrifícios que fizeram por mim, nada disso seria possível sem vocês. Aos meus queridos irmãos, Anyisabel Monteiro, Paulita Monteiro e Edmilson Semedo, meus melhores amigos, obrigada pela cumplicidade, amizade e força, por todo o cuidado e por sempre apostarem em mim sem nunca medirem esforços, fizeram-se presentes em todos os momentos da minha vida mesmo distante, contribuíram para a pessoa que sou hoje. Aos meus amados sobrinhos, Lucas Semedo, Rafael Semedo e Yasmin Semedo, eterna gratidão por serem a

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

alegria da minha vida, por todo o amor recebido durante este período longe de casa, amovos!

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Resumo

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos presentes na maioria das células eucarióticas sendo responsáveis pela produção de 90% de ATP, moléculas indispensáveis para o funcionamento de órgãos e tecidos. A mitocôndria possui o seu próprio genoma circular de dupla hélice com um tamanho reduzido denominado de ADN mitocondrial (ADNmt), herdado unicamente da linhagem materna. O ADNmt contém 37 genes que codificam 13 proteínas, todas pertencentes ao mecanismo de fosforilação oxidativa. Quando comparado com o ADN nuclear, o genoma ADNmt está mais suscetível a altas taxas de mutações devido ao seu mecanismo de reparação ser menos eficiente, não possuir revestimento por histonas reparadoras e à sua proximidade com fontes de espécies reativas de oxigénio. Tais razões fazem prevalecer as mutações no ADNmt que culminam numa variedade de doenças, tais como: encefalomiopatia mitocondrial; acidose láctica e episódios similares a acidente vascular cerebral (MELAS); epilepsia mioclónica com fibras vermelhas irregulares (MERRF); diabetes; surdez com hereditariedade materna (MIDD) e síndrome de Leigh.

Com o recente aumento de doenças mitocondriais resultante do acréscimo de mutações no ADNmt, conjugado com a inexistência de terapias que atuem na cura ao invés de apenas moderarem os sintomas, surge a terapia génica focada na mitocôndria, Terapia Génica Mitocondrial (TGM). A TGM permite tratar o problema na sua origem, tendo como principais objetivos uma entrega eficiente de genes funcionais e a substituição de genes defeituosos.

Sendo assim, este trabalho de investigação visa desenvolver sistemas de entrega do gene pGFP com afinidade mitocondrial baseados em polímero e péptido capazes de encapsular eficientemente o plasmídeo, promover a sua internalização celular e direcionamento específico assim como a sua expressão na mitocôndria das células sem induzir uma resposta imune inflamatória.

Primeiramente sintetizamos o sistema de entrega baseado no polímero catiónico polietilenimina conjugado com cloreto de dequalínio (DQA) para encapsular o plasmídeo pGFP com afinidade mitocondrial. O conjugado PEI-DQA permitiu otimizar o direcionamento mitocondrial uma vez que DQA consegue atingir e fundir-se com a membrana mitocondrial. Seguidamente, o péptido catiónico TAT foi adicionado ao sistema já formulado dando origem a sistemas ternários com carga positiva. Todas as nanopartículas foram formuladas a vários rácios: razão entre as amins carregadas

positivamente do PEI em relação aos grupos fosfato carregados negativamente do plasmídeo. As nanopartículas formadas foram caracterizadas em termos de morfologia, tamanho, carga superficial e polidispersidade. A biocompatibilidade dos sistemas desenvolvidos foi testada em células cancerígenas, e a sua capacidade de internalização celular, a par com o seu direcionamento específico à mitocôndria, foram comprovados por ensaios de microscopia de fluorescência confocal.

Os resultados obtidos demonstram que os sistemas desenvolvidos, baseados num polímero e num péptido, propriedades físicas-químicas adequadas a estudos de transfeção celular. Adicionalmente, foi comprovada a sua capacidade de direcionamento à mitocôndria o que torna estes nano-sistemas promissores para aplicação em TGM.

Palavras-chave:

ADN plasmídico; direcionamento à mitocôndria; nanopartículas; péptido TAT; polietilenimina; proteína GFP.

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Abstract

Mitochondria are cytoplasmic organelles present in most eukaryotic cells and are responsible for the production of 90% ATP, molecules indispensable for the functioning of organs and tissues. It has its own circular double-helix genome with a reduced size called mtDNA, inherited solely from the maternal lineage. The mtDNA contains 37 genes encoding 13 proteins all belonging to oxidative phosphorylation. The mtDNA genome is more susceptible to high mutation rates compared to nuclear DNA because it is not coated by reparative histones, in addition to having a less efficient repair mechanism and its proximity to sources of oxygen species, giving rise to various diseases such as mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), myoclonic epilepsy with ragged-red fibers (MERRF), maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) and Leigh syndrome.

With the increase in the rate of mitochondrial diseases in recent years due to the increase of mutations in mtDNA and existing therapies do not offer a cure acting only in moderation of symptoms, comes the gene therapy aimed at the mitochondria, Mitochondrial Gene Therapy (TGM), which intends to treat the problem at its source. The main limitation of this therapy is the efficient delivery of defective genes.

Thus, this research work aims to develop delivery systems of the pGFP gene with mitochondrial affinity based on polymer and peptide capable of efficiently encapsulating the plasmid, promoting its cellular internalization and specific targeting as well as its expression in the mitochondria of cells without inducing an inflammatory immune response.

We first synthesized the delivery system based on the cationic polymer polyethylenamine conjugated with dequalinium chloride (DQA) to encapsulate pGFP with mitochondrial affinity. The PEI-DQA conjugate allowed to optimize the mitochondrial targeting since DQA can reach and fuse with the mitochondrial membrane. Subsequently, the cationic peptide TAT was added to the already formulated system giving rise to ternary systems with positive charge. All nanoparticles were formulated in various ratios of positively charged amines of PEI to negatively charged phosphate of plasmid.

Analyzing the results obtained, we can notice that the formulated systems, PEI DQA/pGFP and TAT/PEI-DQA/pGFP presented high encapsulation efficiency. Ternary systems mostly exhibited a spherical morphology and monodisperse of very small sizes,

less than 500 nm, and a surface charge close to 0 mV. When analyzing the images of confocal fluorescence microscopy, the mitochondrial uptake and targeting capacity of the systems formulated in the delivery of the pGFP plasmid is visible, although these depend on their surface cationic charge density.

All this indicates that ternary systems based on polymers and peptides have interesting physicochemical characteristics to act as carriers of genetic material and have demonstrated promising advances in mitochondrial targeting.

Keywords

Plasmid DNA; mitochondrial targeting; nanoparticles; peptide TAT; polyethylenimine; GFP protein

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Índice

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introdução..... | 1 |
| 1.1 | Mitocôndria..... | 3 |
| 1.2 | Terapia génica mitocondrial..... | 16 |
| 1.2.1 | Vetores virais..... | 18 |
| 1.2.2 | Vetores não virais..... | 18 |
| 1.2.3 | Nanotecnologia..... | 20 |
| 2 | Objetivos..... | 29 |
| 3 | Materiais..... | 30 |
| 4 | Métodos..... | 30 |
| 4.1 | Preparação dos complexos..... | 30 |
| 4.2 | Determinação de Eficiência de encapsulação (EE)..... | 31 |
| 4.3 | Morfologia dos complexos..... | 31 |
| 4.4 | Tamanho e potencial zeta (ζ) dos complexos..... | 32 |
| 4.5 | Cultura celular..... | 32 |
| 4.6 | Citotoxicidade dos sistemas..... | 32 |
| 4.7 | Capacidade de transfeção dos sistemas..... | 33 |
| 5 | Resultados e Discussão..... | 35 |
| 5.1 | Formulação e caracterização dos sistemas de entrega..... | 35 |
| 5.2 | Eficiência de encapsulação do pGFP..... | 35 |
| 5.3 | Morfologia..... | 37 |
| 5.4 | Tamanho e potencial zeta dos complexos..... | 38 |

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

| | |
|---|----|
| 5.5 Citotoxicidade..... | 40 |
| 5.6 Eficiência de transfeção celular..... | 42 |
| 6 Conclusão..... | 49 |
| 7 Referências bibliográficas..... | 51 |

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Estrutura das mitocôndrias de células eucarióticas. Imagem adaptada de (17)...4
- Figura 2 - Esquema representativo dos complexos que constituem a OXPHOS na membrana interna mitocondrial responsáveis pelo transporte de elétrons e geração do gradiente de prótons para a síntese de ATP. Imagem adaptada de (20).5
- Figura 3 - Metabolismo mitocondrial ERO, formação do radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ pela redução O_2 nos Complexos I e III, e em seguida a sua transformação em H_2O_2 mais estável nas mitocôndrias através da atividade da enzima mitocondrial do manganês superóxido dismutase (MnSOD) e glutathione peroxidase (GPx) na matriz, e pelo Cobre-Zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) no espaço intermembranar. Imagem adaptada de (25). 6
- Figura 4 - Representação das duas vias apoptóticas, a via extrínseca ou mediada por recetores (à esquerda) e a via intrínseca ou mediada pelas mitocôndrias (à direita). O conjunto de estímulos ativadores da via intrínseca encontram-se na tabela cinzenta. Imagem adaptada de (29). 8
- Figura 5 - O mapa do ADN mitocondrial humano. OH e OL: Origens de replicação de fita pesada e leve, respetivamente; ND1-ND6: subunidades de NADH desidrogenase (ETC complexo I) subunidades 1 a 6; COX1-COX3: Subunidades das subunidades 1 a 3 do citocromo oxidase (complexo ETC IV); ATP6 e ATP8: Subunidades 6 e 8 da ATPase mitocondrial (complexo V); Cyt b: Citocromo b (complexo III); ETC: Cadeia de transporte de elétrons. Imagem adaptada de (86). 9
- Figura 6 - O genoma mitocondrial de mamíferos e modelos de replicação do ADNmt. (A) o genoma mitocondrial dos mamíferos codifica 13 polipeptídeos e os elementos de ARN necessários para sua tradução. Modelos de replicação do ADNmt em mamíferos. (B) deslocamento de cadeias; (C) Incorporação de ARN através da cadeia retardada; (D) modelo de cadeia acoplada. Imagem adaptada de (34).10
- Figura 7 - A dinâmica mitocondrial no processo de transmissão de ADNmt mutado da mãe para filho. Imagem adaptada de (40). 11

| | |
|---|----|
| Figura 8 - Principais sintomas clínicos das doenças mitocondriais causados pelos altos níveis de ADNmt mutado. Imagem adaptada de (43). | 12 |
| Figura 9 - Esquema representativo de diagnóstico para suspeitas de doenças mitocondriais em que um conjunto de exames clínicos, bioquímicos, histoquímicos e genéticos são realizados. (CK) Creatinaquinase; (LCF) Líquido cefalorraquidiano; (RMN) Ressonância magnética nuclear; (EEG/EMG) Eletroencefalografia/Eletromiografia; (SDH) Succinato desidrogenase; (COX) Citocromo c oxidase. Imagem adaptada de (50). | 15 |
| Figura 10 - Espectros de excitação (394 nm) (a) e espectros de emissão (509 nm) da GFP. Imagem adaptada de (66). | 21 |
| Figura 11 - Estratégia utilizada para construir o mpGFP. Um alinhamento da sequência de nucleotídeos de mpGFP e sua tradução. Imagem adaptada de (67). | 22 |
| Figura 12 - Estruturas da PEI ramificadas (A) e lineares (B). Imagem adaptada de (70).. | 23 |
| Figura 13 – Representação esquemática do efeito esponja de prótons da PEI. Imagem adaptada de (75). | 24 |
| Figura 14 - Estrutura química da sequência de 11 aminoácidos de TAT de VIH-1. Imagem adaptada de (81). | 26 |
| Figura 15 - Representação esquemática do mecanismo proposto para a internalização de um CPP via penetração direta- Modelo das micelas invertidas. Imagem adaptada de (79). | 27 |
| Figura 16 – Internalização de um CPP por via endocitóticas. Imagem adaptada de (79).. | 28 |
| Figura 17 – Eficiência de encapsulação do pGFP pelos sistemas PEI-DQA/pGFP (10 kDa e 25 kDa) formulados a rácios N/P 20 e 50, e os sistemas TAT ₄ /PEI-DQA/pGFP formulados a rácios N/P 50 e 100, investigada por eletroforese em gel de agarose. (A) - amostra controle de pGFP. | 36 |
| Figura 18 - Microscopia eletrónica de varrimento para os sistemas TAT ₄ /PEI-DQA/pGFP com PEI de 10 kDa formulado a rácios N/P 20 (A), rácio N/P 50 (B) e rácio N/P 100 (C), e PEI de 25 kDa formulado a rácios de N/P 20 (D), rácio N/P 50 (E) e rácio N/P 100 (F).. | 37 |
| Figura 19 - Viabilidade celular das células HeLa após 24h e 48h de transfeção mediada pelos sistemas TAT ₄ /PEI-DQA/pGFP (PEI de 10 kDa e 25 kDa) formuladas a rácios N/P | |

20, 50 e 100, respetivamente. A percentagem de viabilidade celular é expressa em relação às células controlo. Os valores foram calculados tendo em conta os dados obtidos de quatro medições independentes (média \pm DP, n = 4) e analisados pelo teste “one-way” ANOVA”.....40

Figura 20 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 10 kDa) N /P 50 investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D)..... 42

Figura 21 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 10 kDa) N /P 100 investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D)..... 43

Figura 22 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização com a mitocôndria do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 25 kDa) N /P 50 investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D)..... 45

Figura 23 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização com a mitocôndria do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 25 kDa) N /P 100 nas células HeLa, investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D).....46

Figura 24 - Intensidade de fluorescência relativa do plasmídeo pGFP marcado com FITC dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI de 10 kDa e 25 kDa) formuladas a rácios N/P 50 e 100. A análise estatística foi elaborada recorrendo ao teste de “one-way ANOVA” de dados com n =4. A significância estatística representada pelos asteriscos “**” e “*” tem um valor de p = 0,0038 e p < 0,05 respetivamente. 48

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Doenças mitocondriais e as suas principais manifestações clínicas. Adaptado de (36, 29). | 14 |
| Tabela 2. A origem e sequência do aminoácido do TAT descritos na literatura e a sua respetiva categoria. Adaptada de (84). | 26 |
| Tabela 3. Valores de potencial Zeta, Tamanho médio e Índice de polidispersidade (PDI) dos sistemas PEI-DQA/pGFP e TAT4/PEI-DQA/pGFP N /P, formulados com PEI de 10 e 25 kDa para rácios de 20, 50 e 100. | 38 |

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ADP: Adenosina difosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ATPases: Adenosinatrifosfatases

AVC: acidente vascular cerebral

CK: Creatinaquinase

COX: Citocromo c oxidase

CPEO: Oftalmoplegia crónica progressiva externa

CPPs: Peptídeos de penetração celular

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol

DIABLO: Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOw pI

D-loop: displacement loop

DMEM/F-12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DQA: Cloreto de dequalínio

DQAsomes: vesículas lipossomais à base de dequalínio

ECT: Cadeia transportadora de eletrões

EEG: Eletroencefalografia

EMG: Eletromiografia

ERO: Espécies reativas de oxigênio

GFP: Proteína verde fluorescente

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HeLa: Células cancerígenas do colo uterino

IAPs: proteínas inibidoras de apoptose

IMM: membrana mitocondrial interna

kpb: Quilo pares de bases

LCF: Líquido cefalorraquidiano

LHON: Neuropatia ótica hereditária de Leber

MCU: Canal uniportador mitocondrial

MELAS: Acidose láctica e episódios semelhantes a AVC

MERRF: Epilepsia do mioclonia e fibras vermelhas irregulares

MIDD: Diabetes, surdez com hereditariedade materna

MitoTracker: MitoTracker Orange CMTMRos

MMP: Permeabilização da membrana mitocondrial

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

OXPPOS: Fosforilação oxidativa

pADN: ADN plasmídico

PBS: Tampão fosfato-salino

PEI: Polietilenimina

rARNs: ARNs ribossômicos

RMN: Ressonância magnética nuclear

SDH: Succianato desidrogenase

SEM: Microscopia Eletrônica de Varrimento

SKS: Síndrome de Kearns-Sayre

Smac: Second mitochondria-derived activator of caspase

TAE: Tris-Acetato-EDTA

tARNs: ARNs transportadores

TGM: Terapia génica mitocondrial

Tris-EDTA: Tris-Acetato-EDTA

UV: Ultravioleta

VIH-1: Vírus da Imunodeficiência Humana

Vis: Visível

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

1 Introdução

O genoma humano consiste num grande genoma nuclear e um genoma de tamanho muito reduzido localizado na mitocôndria denominado Ácido Desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (ADNmt) (Y. Wang et al., 2021).

O ADNmt é um cromossoma circular com aproximadamente 17.000 pares de bases (pb) que codificam 37 genes, destes, 13 codificam polipéptidos, sendo todos eles membros integrais da cadeia respiratória mitocondrial, essencial ao metabolismo aeróbico (fosforilação oxidativa). Os outros 24 codificam 22 ARNs transportadores e dois ARNs ribossômicos utilizados na síntese proteica mitocondrial (Faria et al., 2021; Salvado et al., 2015).

A função crucial do ADNmt é a produção de ATP via fosforilação oxidativa de modo a fornecer altas taxas energéticas aos tecidos que mais necessitam dessa energia (Salvado et al., 2015).

Mutações no ADNmt comprometem a produção de ATP levando ao surgimento de inúmeras patologias incluindo doenças neurodegenerativas e cancro. As doenças mitocondriais podem afetar qualquer sistema orgânico e em qualquer idade sendo um dos grupos de doenças genéticas mais comuns (Cardoso et al., 2015; Faria et al., 2022).

Atualmente, não existem terapias efetivas para tratar a causa destas doenças, as terapias convencionais focam-se no alívio e redução do conjunto de sintomas dos pacientes.

A terapia génica surge como uma valiosa e promissora ferramenta para tratar distúrbios relacionados com mutações no ADNmt. Sendo assim, a terapia génica mitocondrial (TGM) tem como objetivo a entrega de material genético à mitocôndria, para suprimir, alterar ou complementar o efeito de genes defeituosos. O desenvolvimento de vetores de entrega de gene mitocondrial específico e direcionado à mitocôndria é um passo essencial. Estes vetores além de permitirem o encapsulamento do ADNmt devem também proteger e transportar, enquanto fornecem especificidade de direcionamento à mitocôndria de modo a garantir a libertação eficiente do material génico neste organelo celular, permitindo a expressão dos genes mitocondriais (Faria et al., 2022).

Deste modo, podem considerar-se dois tipos de vetores de entrega, os vetores virais e os vetores não virais ou sintéticos. Os vetores virais, como retrovírus e adenovírus, foram utilizados durante um longo período devido à sua elevada capacidade de transfetar células. No entanto, possuem várias desvantagens como, toxicidade relacionada ao sistema imunológico com administração repetida, possível competência de replicação, não direcionamento ou tamanho de inserção limitado, reduzindo assim a sua aplicação (Neves et al., 2021).

Já os sistemas de entrega não virais (sintéticos) baseados em péptidos de penetração celular (CPPs), micelas, polímeros e lípidos têm sido bastante usados em estudos de liberação de genes. Estes péptidos são simples e produzidos sob medida, podem incorporar uma grande quantidade de conteúdo genético, possuem alta densidade de carga, são biocompatíveis, não tóxicos e não induzem resposta imune (Faria et al., 2019, 2022).

Sistemas ternários não virais, por exemplo, constituídos por polímeros e/ou péptidos, provaram ser uma estratégia valiosa para aumentar a eficiência de encapsulamento de material genético, contribuindo assim para a entrega e expressão eficiente de genes. Os CPPs são péptidos de grande interesse na terapia génica devido às suas propriedades benéficas. Possuem um tamanho reduzido (entre 15 e 30 aminoácidos) e podem ser divididos em péptidos ricos em arginina e anfipáticos. Os péptidos anfipáticos possibilitam a formulação de sistemas de entrega capazes de encapsular o ADN e facilitar a sua translocação na membrana e posterior entrada nas células (Albuquerque et al., 2020; Deshayes et al., 2020).

O TAT (a proteína ativadora da transcrição no HIV-1) é um péptido catiónico de 11 aminoácidos com 6 resíduos de arginina e 2 resíduos de lisina. Tem sido muito usado na TGM, pois possui afinidade à mitocôndria e uma alta carga catiónica o que permite especificidade no direcionamento, aumento da capacidade de condensação do material genético, redução do tamanho do sistema de entrega, facilitação da internalização celular e assegura biocompatibilidade (Dong et al., 2016; Faria et al., 2022).

A polietilenimina (PEI) é um polímero catiónico com uma alta densidade de carga positiva, o que permite estabelecer fortes interações eletrostáticas entre os seus grupos aminas e grupos fosfatos do ADN resultando num complexo de ADN encapsulado à escala nanométrica. O PEI possui também alta atividade endossomolítica, um ponto crítico para o sucesso da entrega de genes mitocondriais (Albuquerque et al., 2020; Dong et al., 2016). Num trabalho de investigação, foi adicionado ao polímero de PEI, o cloreto de dequalínio (DQA), resultando no composto PEI-DQA com o intuito de otimizar o direcionamento mitocondrial, levando a grandes avanços na entrega de genes ou drogas às mitocôndrias (Faria et al., 2022; Mallick et al., 2019).

Neste trabalho pretendemos desenvolver sistemas baseados em PEI-DQA e TAT para entrega eficiente do plasmídeo com o gene da proteína verde-fluorescente (mpGFP) sintetizado para ser expresso nas mitocôndrias. O gene da GFP possui um cromóforo

sendo que este quando recebe luz UV, emite a luz verde-fluorescente permitindo a monitorização da sua expressão nas mitocôndrias por microscopia de fluorescência (Martins Pereira, 2014). Este sistema foi projetado para ser responsivo a estímulos ajustáveis e direcionados, enquanto promove a libertação controlada e sustentada.

Mitocôndria

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos presentes nas células eucarióticas, sendo responsáveis pela produção de 90% da adenosina trifosfato (ATP) necessária para o metabolismo celular. Além disso, participam na regulação da homeostase iónica, no crescimento celular, nas reações redox e na sinalização celular (13,14). Portanto, desempenham um papel fundamental nos mecanismos de sobrevivência e morte celular (13,14). Devido ao seu papel central na vida e morte celular, as mitocôndrias também estão envolvidas na patogénese e progressão de inúmeras doenças humanas, como por exemplo, cancro, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, diabetes, traumatismo cranioencefálico e inflamação (Taylor & Turnbull, 2005).

1.1.1 Estrutura da mitocôndria

As mitocôndrias podem apresentar duas formas, arredondadas ou alongadas, com comprimento entre 1,0 μm e 10 μm , e largura entre 0,5 μm e 1,0 μm .

Cada mitocôndria possui duas membranas com diferentes propriedades e funções biológicas, a membrana interna e a membrana externa, separadas por um espaço intermembranar (figura 1). A membrana externa possui um contorno liso, é composta por lípidos (fosfolípidos e colesterol), apresenta algumas enzimas e proteínas transmembranares que permitem a passagem de moléculas para o espaço intermembranar. Já a membrana interna é composta por 75% de proteínas, detém várias dobras chamadas cristas que se projetam para o interior da mitocôndria. As cristas apresentam alguns componentes como enzimas, que participam da fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de eletrões. Na matriz mitocondrial, localizada no espaço delimitado pela membrana interna, encontram-se os ribossomas, as enzimas do ciclo de Krebs (ou ciclo do ácido cítrico), ARN e o seu material genético (Brito, 2016).

As mitocôndrias também são reconhecidas por desempenharem várias outras funções celulares essenciais como estarem envolvidas na sinalização celular, na homeostase iônica e no metabolismo de aminoácidos, lípidos, colesterol, esteroides e nucleotídeos, na regulação do ciclo celular, crescimento celular e apoptose (Bouzon et al., 2010; Faria et al., 2021). Esse organelo possui um papel crucial na conversão de alimentos em energia química pelo uso da cadeia respiratória mitocondrial (Mckinney & Oliveira, 2013).

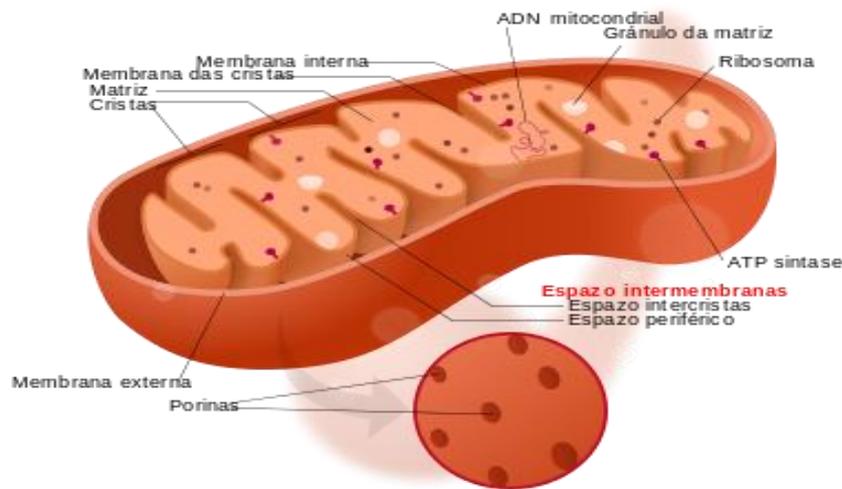


Figura 1 - Estrutura das mitocôndrias de células eumarióticas. Imagem adaptada de (Kelvisong, 2013).

1.1.2 Funções mitocondriais

1.1.3 Produção de ATP

A fosforilação oxidativa (OXPHOS) é um processo quimiosmótico que na presença de oxigênio gera o ATP como produto final da respiração celular.

Este processo é gerado por um gradiente eletroquímico de prótons formado pelo trabalho conjunto dos complexos enzimáticos pertencentes à cadeia transportadora de elétrons (ECT) localizados na membrana interna mitocondrial (figura 2). As transferências de elétrons estão na base de reações de oxirredução que culminam na liberação de energia para a biossíntese de ATP (Bergman & Ben-Shachar, 2016; Chaban et al., 2014).

Os complexos enzimáticos do sistema OXPHOS são: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase). Sendo que os complexos I-IV fazem parte da ECT e a formação de ATP acontece no complexo V pela F₀F₁ ATP sintase por meio de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi). Além do complexo V produzir ATP, este também permite a formação de moléculas de água por meio do oxigênio molecular (Chaban et al., 2014).

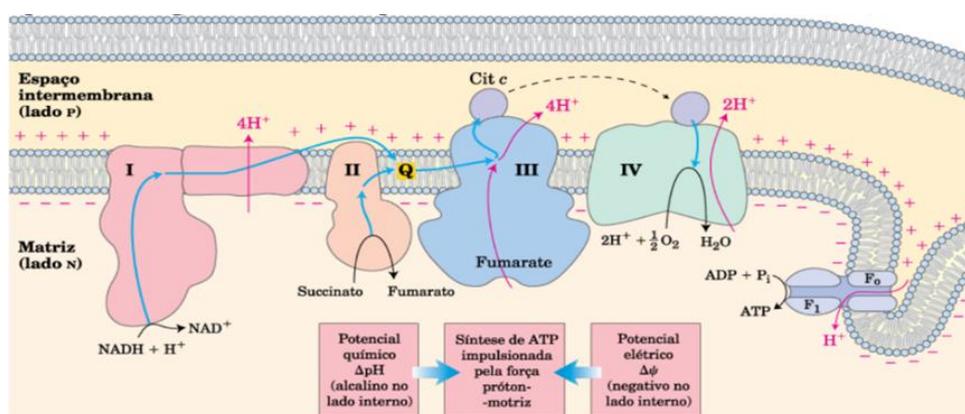
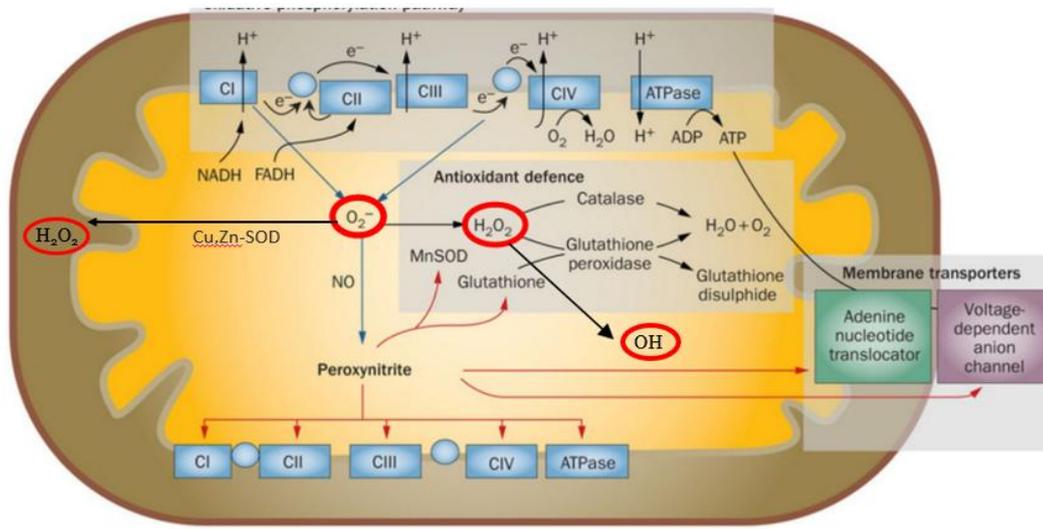


Figura 2 - Esquema representativo dos complexos enzimáticos que constituem a OXPHOS na membrana interna mitocondrial responsáveis pelo transporte de elétrons e geração do gradiente de prótons para a síntese de ATP: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase). Imagem adaptada de (Silva da Franca, 2019).

1.1.4 Regulação de espécies reativas de oxigênio

Espécies Reativas de oxigênio (ERO) são moléculas instáveis e extremamente reativas, produzidas em quantidades relevantes na matriz mitocondrial (Figura 3). As ERO são geradas em grande quantidade durante o stress oxidativo, condição em que são afetadas moléculas como proteínas, carboidratos, lípidos e ácidos nucleicos (A. J. Kowaltowski et al., 2009; Silva & Gonçalves, 2010).

O oxigênio é essencial para a oxidação de compostos orgânicos e produção de energia para o metabolismo celular. A maioria do O_2 consumido é reduzido em água pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial no complexo IV (uma redução de quatro elétrons) e o restante do O_2 (2 a 5%) é reduzido a radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Para além do radical superóxido, outras variedades de espécies reativas de oxigênio são produzidas como: o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH) (A. J. Kowaltowski et al., 2009)(Quinlan et al., 2013). A elevada quantidade de radicais livres gerados na matriz mitocondrial tem sido apontada como um dos principais causadores de mutações



relacionadas ao ADNmt (Cardoso et al., 2015; Wallace, 2005).

Figura 3 - Metabolismo mitocondrial ERO, formação do radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ pela redução O_2 nos Complexos I e III, e em seguida a sua transformação em H_2O_2 mais estável nas mitocôndrias através da atividade da enzima mitocondrial do manganês superóxido dismutase (MnSOD) e glutathione peroxidase (GPx) na matriz, e pelo Cobre-Zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) no espaço intermembranar. Imagem adaptada de (Bennett et al., 2014).

1.1.5 Regulação do cálcio na mitocôndria

A regulação das concentrações citoplasmáticas de cálcio (Ca^{2+}) é realizada pelas mitocôndrias utilizando sistemas de transporte específicos. O Ca^{2+} para além de atuar na formação de ossos e dentes, regula as funções celulares como, produção de ATP e processos energéticos, sendo um importante sinalizador celular em processos como

contração muscular, diferenciação celular e inflamação (A. Kowaltowski et al., 2019). A mitocôndria utiliza um canal uniportador mitocondrial (MCU) para a captação do Ca^{2+} para a matriz mitocondrial sendo estimulado pelo potencial da membrana mitocondrial interna (IMM) levando assim ao aumento da concentração de Ca^{2+} na matriz. No entanto, o excesso de Ca^{2+} na matriz mitocondrial pode levar à ruptura dessa membrana que além de comprometer a função mitocondrial ativa processos catabólicos irreversíveis colocando em risco a integridade da célula (Martin, 2012; Orrenius S & Nicotera P., 1993).

1.1.6 Regulação da Apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular programada ou “suicídio” causando o mínimo de danos possíveis aos tecidos. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos. Caracteriza-se pelo encolhimento da célula, formação de bolhas na membrana plasmática, condensação e fragmentação do ADN. A apoptose é desencadeada por duas vias, a via extrínseca ou mediada por recetores e a via intrínseca ou mediada por mitocôndrias, como representado na Figura 4 (Indran et al., 2011; Vasconcelos, 2000).

A via mediada por mitocôndrias é ativada por múltiplos estímulos como, radiação, formação de radicais livres ou infecções virais, entre outros. Todos esses estímulos induzem a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) o que desencadeia uma crise bioenergética devido à perda de ATP e subsequentemente resultam na libertação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas no citosol (Indran et al., 2011)

Uma dessas proteínas libertadas é o citocromo c que promove a ativação da procaspase-9 (caspase iniciadora) através do complexo ativo citocromo c /Apaf-1/caspase 9. Este complexo leva à formação do apoptossoma e em seguida a ativação das caspases de execução (caspases 3 e 7), resultando na fragmentação nuclear (Hengartner, 2000; Martinou & Youle, 2011).

A segunda proteína libertada pela MMP são os Smac/DIABLO, cuja função é unicamente se ligarem aos IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) levando à desativação destes, evitando assim que os IAPs suspendam o processo apoptótico, permitindo a progressão da apoptose (Indran et al., 2011).

Desenvolvimento de vetores baseados em peptídeos para direcionamento à mitocôndria.

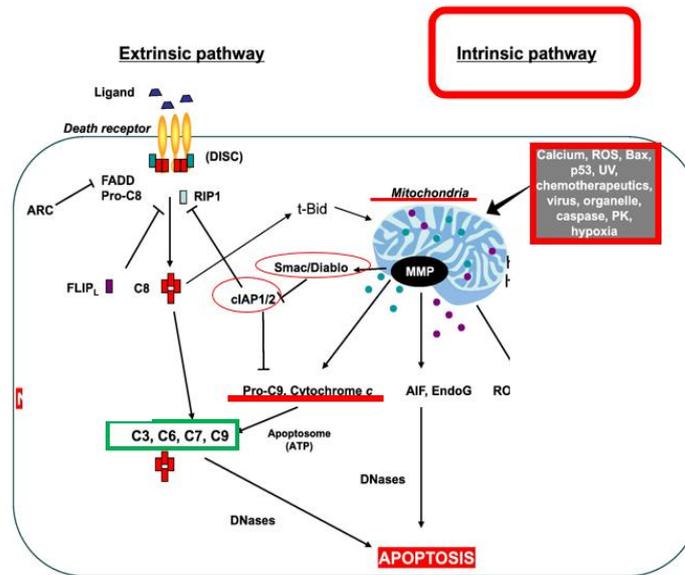


Figura 4 - Representação das duas vias apoptóticas, a via extrínseca ou mediada por recetores (à esquerda) e a via intrínseca ou mediada pelas mitocôndrias (à direita). O conjunto de estímulos ativadores da via intrínseca encontram-se na tabela cinzenta, estes induzem a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP) e, posteriormente, a liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas (citocromo c e Smac/DIABLO) no citosol. O citocromo c ativa a procaspase-9 (caspase iniciadora) através do complexo ativo citocromo c /Apaf-1/caspase 9 levando a formação do apoptossoma. Isso permite a ativação das caspases de execução (caspases 3 e 7), culminando em apoptose. O Smac/DIABLO liga-se aos IAPs (proteínas inibidoras da apoptose) permitindo a sua desativação e progressão da apoptose. Imagem adaptada de (Indran et al., 2011).

1.1.7 ADN mitocondrial

O ADNmt é um cromossoma circular com aproximadamente 16 kpb que codificam 37 genes. Destes genes, 13 codificam proteínas que são subunidades estruturais de complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial, essencial ao metabolismo aeróbico, e os outros 24 codificam 22 ARNs transportadoras e dois ARNs ribossômicos utilizados na síntese proteica mitocondrial (Figura 5)(Faria et al., 2021).

Destas 13 proteínas codificadas pelo ADNmt, 7 pertencem ao complexo I (NADH desidrogenase), 1 ao complexo III (citocromo c redutase), 3 ao complexo IV (citocromo c oxidase) e 2 ao complexo V (ATP sintase) (Chaban et al., 2014).

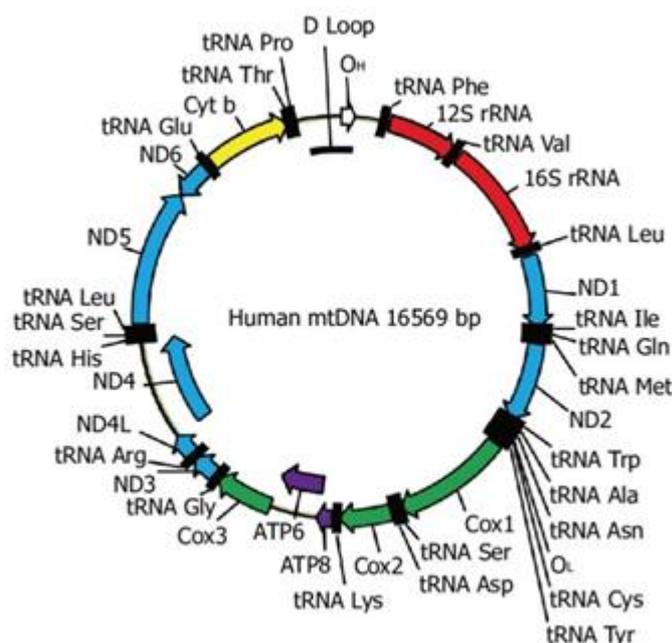


Figura 5 - O mapa do ADN mitocondrial humano. OH e OL: Origens de replicação de fita pesada e leve, respectivamente; “D-loop”: Região não codificante; ND1-ND6: subunidades de NADH desidrogenase (ETC complexo I) subunidades 1 a 6; COX1-COX3: Subunidades 1 a 3 do citocromo oxidase (complexo ETC IV); ATP6 e ATP8: Subunidades 6 e 8 da ATPase mitocondrial (complexo V); Cyt b: Citocromo b (complexo III); ETC: Cadeia de transporte de elétrões. Os 22 ARNs transportadores e 2 ARNs ribossômicos (12S rRNA e 16S rRNA). Imagem adaptada de (Shokolenko, 2014).

O ADNmt possui duas fitas designadas de fita pesada (“heavy”, fita H rica em guaninas) e fita leve (“light”, fita L rica em citosinas) (Anderson et al., 1981). Detém também de uma região não codificante designada de “D-loop” (“displacement loop”), onde se encontram os promotores necessários para a transcrição das duas fitas, além de sequências regulatórias, necessárias para a replicação e transcrição do ADNmt.

O mecanismo de replicação do ADNmt e toda a sua maquinaria pode ser descrita através de três modelos (Figura 6), ambos contínuos e ocorrem em simultâneo:

- No primeiro modelo de replicação, denominado Deslocamento de cadeias (Figura 6 B), a replicação da fita pesada inicia-se dentro da região de controlo não codificante (“D-loop”), num local específico chamado O_H . Logo que a fita pesada atinge dois terços do genoma, o local da origem da replicação da fita leve (O_L) é exposto permitindo que a sua síntese inicie na direção oposta. Este modelo apresenta uma replicação unidirecional, contínua e assimétrica (Bowmaker et al., 2003; McKinney & Oliveira, 2013).

- O segundo modelo de replicação - incorporação de ARN através da cadeia retardada (Figura 6 C) ocorre através da replicação unidirecional da fita acoplada na principal região não codificante, “D-loop”, onde em simultâneo os intermediários de ARN estão a ser maturados em ADN. Tanto o início da replicação, como o término acontecem no local de origem da fita pesada, O_H .

- No terceiro modelo descrito como o modelo de cadeia acoplada (Figura 6 D), a replicação é bidirecional e inicia-se numa ampla zona de iniciação em uma região contendo os genes citocromo b, NAD5 e NAD6. A replicação prossegue em ambas as direções até finalmente parar na região D-loop (Kasiviswanathan et al., 2012; Yasukawa et al., 2006; Yasuzaki et al., 2010).

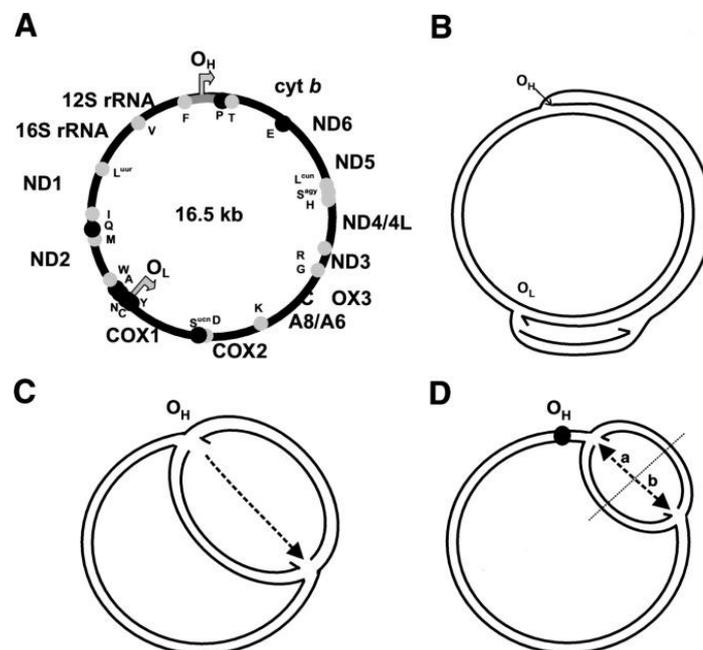


Figura 6 - O genoma mitocondrial de mamíferos e modelos de replicação do ADNmt. (A) o genoma mitocondrial dos mamíferos codifica 13 polipeptídeos e os elementos de ARN necessários para sua tradução. Modelos de replicação do ADNmt em mamíferos. (B) deslocamento de cadeias; (C) Incorporação de ARN através da cadeia retardada; (D) modelo de cadeia acoplada; O_H e O_L : Locais de origem das fitas pesadas e leves, respetivamente; NAD1-NAD6: Subunidades 1 a 6 da NADH desidrogenase; COX1-COX3: Subunidades 1 a 3 do citocromo oxidase; Cyt b: Citocromo b; 2 ARNs ribossómicos (12S rRNA e 16S rRNA); a↔b: região contendo citocromo c, NAD5 e NAD6). Imagem adaptada de (Bowmaker et al., 2003).

1.1.8 Herança mitocondrial

No caso dos mamíferos, o DNA mitocondrial (ADNmt) é herdado exclusivamente da linhagem materna, o que significa que todos os descendentes de uma única fêmea são clonais para o ADNmt (Fraga & Lazzari, 2021; Poulton et al., 1998).

Estima-se que a maioria das mitocôndrias possui ADN idênticos denominados homoplasmia, e a outra pequena fração contém uma mistura de ADN mutado e não mutado dentro do mesmo organismo identificados como mutações heteroplásmicas. Para que qualquer doença mitocondrial se torne aparente uma certa percentagem de mutações heteroplásmicas deve ser atingida (Chan, 2006; Wonnapijit et al., 2008).

São definidos dois processos que contribuem para a variação intrafamiliar do genótipo e do fenótipo nas doenças do ADNmt:

- O primeiro processo (figura 7 A) acontece na fase de desenvolvimento embrionário inicial entre a formação do zigoto e a maturação do oócito onde há uma redução e amplificação do ADNmt resultando numa alta variabilidade do ADNmt mutado que será consequentemente transmitido à geração seguinte.

- O segundo processo (figura 7 B) descreve a replicação e segregação do ADNmt mutado diferencialmente durante a histogênese e a maturação do órgão, gerando mais diversidade (PF Chinnery, & DM Turnbull, 1997).

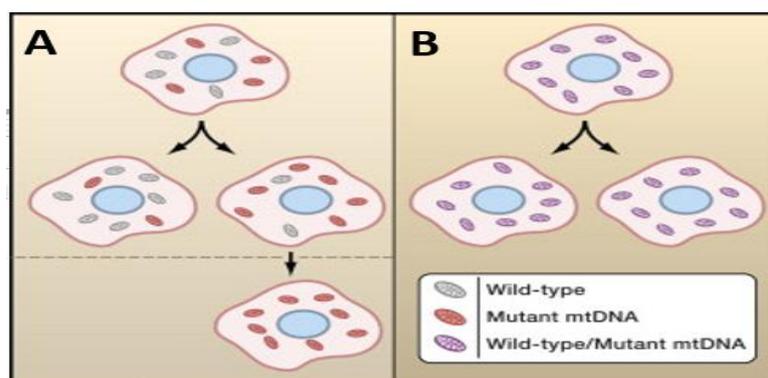


Figura 7 - A dinâmica mitocondrial no processo de transmissão de ADNmt mutado da mãe para filho definido por dois processos. (A) Visão tradicional da herança do ADNmt; (B) Visão incorporando dinâmica mitocondrial; “Wild-type (gray)”: ADNmt não mutado (cinzento); “Mutant mtDNA (red)”: ADNmt mutado

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

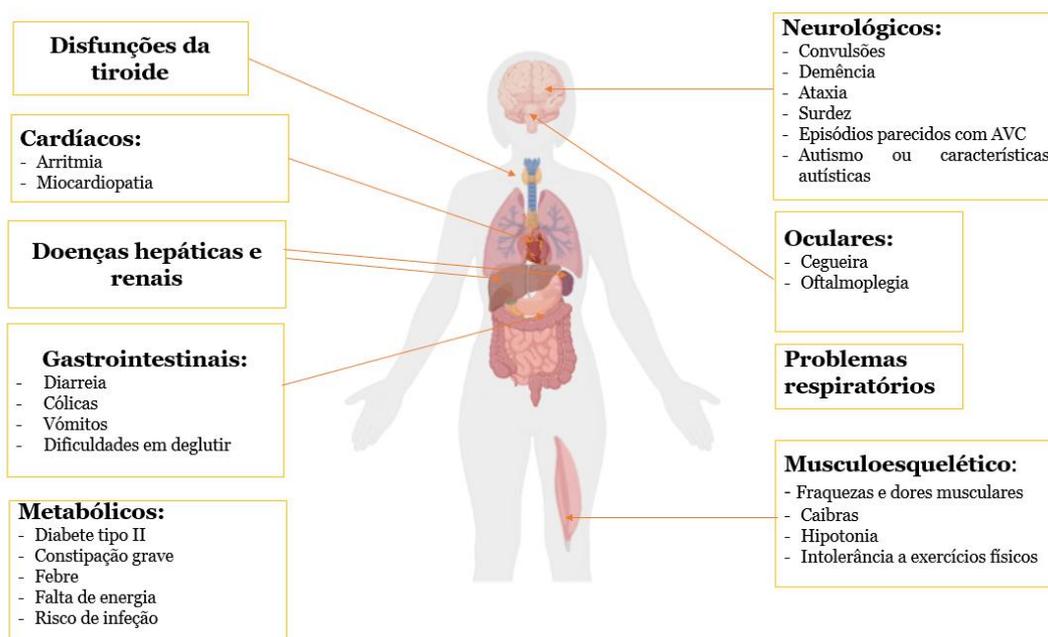
(vermelho); “Wild-type / Mutant mtDNA (purple)”: ADNmt não mutado / ADNmt mutado (roxo). Imagem adaptada de (Chan, 2006).

1.1.9 Mutações e doenças Mitocondriais

A doença mitocondrial é um dos grupos mais comuns de doenças genéticas com uma prevalência mínima superior a 1 em 5.000 em adultos. As doenças associadas ao ADNmt são herdadas exclusivamente da mãe (Fraga & Lazzari, 2021; Russell et al., 2020).

As altas taxas de mutações relacionadas ao ADNmt deve-se ao fato destas não serem revestidas por histonas protetoras, estarem próximas à cadeia respiratória, a fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO), e por possuírem mecanismos de reparação menos eficazes. Como resultado, ocorrem danos em células e tecidos que dependem níveis mais elevados de energia como o cérebro, coração, fígado e tecido muscular causando o aparecimento de diversas patologias incluindo síndromes metabólicas, neurodegenerativas, cancro e doenças autoimunes (Faria et al., 2021; Fraga & Lazzari, 2021; Michael & Van Houten, 1997).

Em geral, as manifestações clínicas mitocondriais mais comuns podem ser divididas em dois grupos, manifestações neurológicas centrais (incluindo encefalopatia, episódios semelhantes a AVC, convulsões, demência e ataxia) e manifestações neurológicas periféricas (incluindo miopatia, oftalmoplegia e neuropatia periférica) (Pfeffer et al., 2012). Na figura 8 estão representados algumas dessas manifestações e os órgãos/tecidos



1. Figura 8 - Principais sintomas clínicos das doenças mitocondriais causados pelos altos níveis de ADNmt mutado. Imagem adaptada de (Russell et al., 2020).

correspondentes.

As doenças mitocondriais associadas ao ADNmt são herdadas da linhagem materna, como já referido anteriormente, logo o processo de herança do ADNmt mutado acontece durante a divisão celular quando no início da oogénese ocorre uma redução brusca do número total de ADNmt. Este efeito provoca uma desproporção entre o ADN mutado e o não mutado, sendo que o ADNmt mutado se encontra em maior número o que facilita a sua segregação e transmissão para os futuros descendentes (Chan, 2006).

Essa mutação pode estar presente em todas as cópias de ADNmt, descrito como homoplasmia, ou em apenas uma fração nomeada heteroplasmia. Além disso, existe um limiar crítico de ADNmt presente que indica se a doença mitocondrial irá expressar o seu fenótipo ou não (Chan, 2006). Este limiar para expressão do fenótipo varia conforme a patologia, todavia, se a ADNmt mutado atingir um nível de heteroplasmia maior que 70% a mutação patogénica irá ser expressa (Russell et al., 2020).

Uma vez que as mutações no ADNmt levam a defeitos na cadeia respiratória, afetando os genes que codificam as suas próprias subunidades (complexos I e II), genes indispensáveis na montagem da cadeia respiratória (complexos III e IV) e os que participam na maquinaria de transcrição e tradução, espera-se que algumas doenças originadas (apresentadas na tabela 1) possuam sintomas semelhantes.

Alguns dos indivíduos portadores de doenças mitocondriais apresentam distúrbios multissistêmicos, ou seja, envolvendo na maioria das vezes o sistema nervoso central e o músculo esquelético, enquanto outros apresentam distúrbios que afetam apenas um único sistema (Chan, 2006; Pfeffer et al., 2012).

As doenças mitocondriais geradas a partir de deleções provocadas ao longo do tempo do ADNmt, são chamadas de mutações somáticas. A oftalmoplegia crónica progressiva externa (CPEO), a síndrome de Kearns-Sayre (SKS) e a síndrome de Pearson são todas doenças provocadas devido a mutações somáticas no ADNmt. Por outro lado, encontram-se as mutações pontuais que são as mutações do ADNmt herdadas da linha materna, normalmente ocorrem em grande escala nas proteínas dos genes ARNmt transportador e na sua maioria são heteroplásmicas (Fontana & Gahlon, 2020; Pfeffer et al., 2012; Tuppen et al., 2010).

As principais doenças mitocondriais primárias associadas a mutações pontuais são: encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a acidente vascular cerebral (MELAS); epilepsia mioclónica com fibras vermelhas irregulares (MERRF);

diabete, surdez com hereditariedade materna (MIDD); síndrome de Leigh; neuropatia ótica hereditária de Leber (LHON) (tabela 1) (Pfeffer et al., 2012; Tucker et al., 2010).

Tabela 1 - Doenças mitocondriais e as suas principais manifestações clínicas. Adaptado de **(Fraga & Lazzari, 2021; Pfeffer et al., 2012)**.

| Doenças mitocondriais | Sintomas | Gene mitocondrial | Características (idade) |
|--|--|--|-------------------------------------|
| Encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios similares a acidente vascular cerebral (MELAS) | encefalomiopatia mitocondrial; acidose láctica; episódios semelhantes a AVC; dores de cabeça recorrentes; vômitos recorrentes, deficiência auditiva; neuropatia periférica; dificuldade de aprendizado; baixa estatura | Leucina ND5 | Adolescente, Idade adulta, Infância |
| Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas irregulares (MERRF) | convulsões mioclônica; ataxia; fraqueza muscular; demência; perda auditiva baixa estatura; atrofia óptica neuropatia periférica diabetes mellitus | Lisina | Infância, Idade adulta |
| Diabetes e surdez com hereditariedade materna (MIDD) | diabetes tipo I e II; distrofia macular; surdez neurosensorial, bilateral e progressiva; distúrbios gastrointestinais; nefropatia; miocardiopatia | Leucina Ácido glutâmico e Lisina | Início da fase adulta |
| Síndrome de Leigh | Ataxia cerebelar; hipotonia; Espasticidade muscular; distúrbios de movimento; atrofia muscular; neuropatia periférica; Hiperlactacidemia no sangue, líquido cefalorraquidiano ou urina; Paralisia do olho vertical | ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6 COX III ATP6 | Recém-nascido Adultos |
| Neuropatia ótica hereditária de Leber (LHON) | Distonia; Insuficiência visual bilateral indolor subaguda; tremor postural ataxia cerebelar; distúrbios motores; | ND1, ND4 e ND6 (complexo I) | Adolescente, idade adulta |

1.1.10 Diagnóstico e tratamento

Para o diagnóstico de doenças associadas ao ADNmt são realizados em conjunto, estudos clínicos, bioquímicos, histoquímicos e genéticos (Michikawa et al., 1997; Tuppen et al., 2010). Os estudos clínicos são para identificar as principais manifestações clínicas e associá-los à patologia em questão bem como acompanhar a sua evolução e avaliar também o histórico familiar através do mapa de hereditariedade mitocondrial. No entanto, como a maioria dos indivíduos portadores de doenças mitocondriais não apresentam um fenótipo nitidamente definido outras análises são indispensáveis (PF Chinnery & DM Turnbull, 1997). A figura 9 ilustra a sequência completa do processo de diagnóstico da doença mitocondrial, abrangendo desde as primeiras suspeitas até a confirmação do diagnóstico:

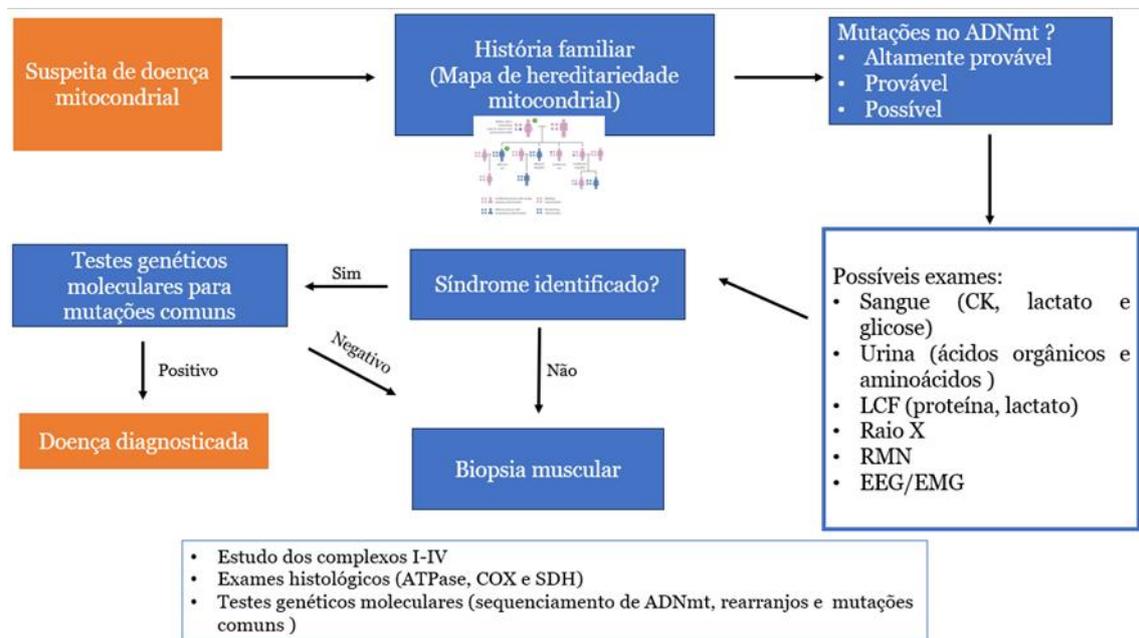


Figura 9 - Esquema representativo de diagnóstico para suspeitas de doenças mitocondriais em que um conjunto de exames clínicos, bioquímicos, histoquímicos e genéticos são realizados. (CK) Creatinaquinase; (LCF) Líquido cefalorraquidiano; (RMN) Ressonância magnética nuclear; (EEG/EMG) Eletroencefalografia/Eletromiografia; (SDH) Succinato desidrogenase; (COX) Citocromo c oxidase. Imagem adaptada de (PF Chinnery & DM Turnbull, 1997).

Após o diagnóstico da doença, o próximo passo é a identificação de um método de tratamento adequado. Os tratamentos existentes na atualidade para doenças associadas a mutações no ADNmt atuam apenas no alívio de certos sintomas prevenindo complicações,

não oferecendo uma cura (Tucker et al., 2010; Tuppen et al., 2010). Estes tratamentos estão categorizados em três grupos:

- O grupo de administração de ativos farmacológicos e nutricionais, no qual estão inclusas vitaminas, cofatores, agentes metabólitos e recetores de eletrões, que visam aumentar a atividade da cadeia respiratória, conseqüentemente, aumentando a síntese de ATP.

- O grupo de modificação da composição de macronutrientes na dieta

- O grupo da prática de exercícios físicos que busca estimular a regeneração muscular, melhorar a qualidade de vida e a capacidade física. Das pesquisas realizadas em pacientes com alto nível de mutações heteroplásmicas do ADNmt nos músculos constatou-se que a prática de exercícios físicos implica um aumento nos níveis de ATP, bem como um aumento da esperança de vida e um atraso no início da doença. Atualmente, os estudos continuam para determinar se o condicionamento físico a longo prazo leva a diminuição de carga mutacional do ADNmt (Fontana & Gahlon, 2020; PF Chinnery & DM Turnbull, 1997; Tuppen et al., 2010).

Terapia génica mitocondrial

Nos últimos anos, os índices de doenças mitocondriais aumentaram significativamente, e os tratamentos convencionais disponíveis são limitados, focando principalmente no alívio e redução dos sintomas. Vários estudos têm sido conduzidos na área da terapia génica visto que ela atua na origem do problema (Aravinha Siva et al., 2019; Faria et al., 2021).

A terapia génica emerge como uma abordagem promissora e tem como finalidade a inserção nas mitocôndrias de um gene mitocondrial funcional para restabelecer a normal função mitocondrial. Para tal, a terapia génica busca desenvolver sistemas de entrega de genes capazes de encapsular o material genético e facilitar a sua internalização celular. É crucial que esses vetores sejam biocompatíveis e possuam especificidade no direcionamento à mitocôndria. Dessa forma, o gene entregue será capaz de agir na supressão ou substituição de genes defeituosos (Faria et al., 2021, 2022; Roy et al., 2008).

Existem dois tipos principais de terapia génica:

- Terapia Génica Somática: aplicada em células somáticas para eliminar o gene defeituoso relacionado a uma determinada condição patológica, sem a inserção do gene na herança genética.

- Terapia Génica Germinativa: consiste na introdução do gene funcional em células germinativas (zigoto), permitindo a expressão do gene correto. No entanto, esta terapia é proibida por questões éticas, uma vez que existe pouca clareza das consequências nas gerações futuras (Ibraheem et al., 2014).

Para que a terapia génica seja bem-sucedida é fundamental um sistema de entrega eficiente que seja capaz de proteger o material genético, transportá-lo para compartimento celular específico e promover a sua expressão. Estes sistemas de entrega são baseados em vetores, que atualmente se enquadram em duas categorias (Roy et al., 2008):

- Os vetores virais, que são sistemas de entrega de genes com elevada taxa de transfeção celular.

- Os vetores sintéticos baseados em péptidos de penetração celular (CPPs), lípidos, micelas e polímeros.

Os vetores virais apresentam algumas desvantagens significativas que limitam a sua aplicação, como potenciais efeitos oncogénicos, possibilidade de recombinação celular, dificuldade de produção em larga escala e uma dada antigenicidade, o que leva ao uso crescente de vetores não virais ou sintéticos. Estes por sua vez, apesar de possuírem baixa taxa de transfeção quando comparados com os vetores virais, têm sido amplamente utilizados para o estudo de libertação de genes devido à sua elevada densidade de carga, biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e antigenicidade, inexistência de risco de recombinação e facilidade de produção rápida e personalizada (Faria et al., 2022; Neves et al., 2020).

Considerando que a maioria dos distúrbios mitocondriais estão associados a mutações no ADNmt, é imprescindível uma terapia génica que possibilite a entrega direta do material genético às mitocôndrias, a fim de corrigir os genes mitocondriais mutados e garantir a sua expressão. Essa terapia é conhecida como Terapia Génica Mitocondrial (TGM) (Aravinha Siva et al., 2019; Cardoso et al., 2015).

A TGM tem como objetivo corrigir o ADNmt defeituoso permitindo a sua expressão génica. Isso resulta na restauração da cadeia respiratória e conseqüentemente num o aumento da função enzimática e da síntese de ATP. No entanto, a evolução da estrutura membranar mitocondrial constitui uma barreira à entrada de materiais exógenos,

tornando-se essencial a construção de vetores capazes de controlar o potencial da membrana mitocondrial, acumulados seletivamente no seu interior (Faria et al., 2022; Fraga & Lazzari, 2021; Mallick et al., 2019).

1.2.1 Vetores virais

A terapia génica viral baseia-se no uso de vetores produzidos a partir de vírus recombinantes e inativos como transportadores de genes para regiões celulares específicas, permitindo a sua expressão através da inserção no genoma do hospedeiro. A principal razão do uso desse tipo de vetor é a elevada capacidade que um vírus possui de alcançar e internalizar-se em células-alvo (Neves et al., 2020). A engenharia genética permite modificar o vírus, eliminando os genes essenciais à patogenicidade e à replicação, o que facilita a substituição por genes terapêuticos. Desta forma, o vírus torna-se apenas um transportador de material genético (Oliveira et al., 2018; Roy et al., 2008).

Os vetores virais comumente usados na entrega de genes são retrovírus, adenovírus e lentivírus. Dentre esses vetores, os adenovírus são amplamente aplicados em investigação, uma vez que não integram ao genoma da célula hospedeira (Faria et al., 2022; Oliveira et al., 2018).

A integração do material genético viral no genoma da célula hospedeira tipicamente resulta em mutações dos genes responsáveis pelo controlo da divisão celular, o que pode culminar no desenvolvimento do cancro caso os genes supressores tumorais sejam silenciados. Além disso, a integração é irreversível e permanente, o que limita a eficácia da terapia (Kresina, 2004).

Embora os vetores virais sejam excelentes transportadores de genes apresentam algumas limitações, como dificuldade de produção, risco de desencadear respostas imunológicas e restrição quanto ao tamanho do material genético. Portanto, o seu uso vetores depende muito do objetivo que se pretende alcançar (Oliveira et al., 2018; Roy et al., 2008).

1.2.2 Vetores não virais

Os transportadores de genes não virais surgem como alternativa aos vetores virais devido às limitações apresentadas. Esses transportadores são projetados para serem

simples de sintetizar, de custo reduzido e com maior segurança dado a ausência de resposta imunitária e elevada biocompatibilidade. Além disso, permitem a introdução de vários genes independentemente do tamanho Pereira.; Roy et al., 2008).

Os vetores não virais são partículas biológicas sinteticamente produzidas, capazes de encapsular o plasmídeo e transportá-lo até às célula-alvo, onde o gene é expresso. Esses vetores não só conseguem transportar o ADN como também fragmentos de ARN (Chira et al., 2015).

Os sistemas de entrega não virais mais simples, realizam a entrega do plasmídeo acoplado ao gene terapêutico ou do ADN “nu” por injeção direta nas células-alvo através das membranas celulares. Contudo, essa abordagem tem-se mostrado ineficiente, uma vez que, a membrana plasmática limita a passagem direta de macromoléculas grandes e aniônicas (como o ADN plasmídico), e o ADN no ambiente extracelular não consegue manter a sua integridade, sendo facilmente degradado por nucleases. Então foram estudadas duas abordagens com o intuito de facilitar a entrada dos vetores não virais nas células através da membrana citoplasmática, nomeadamente a aplicação de métodos físicos e métodos químicos (Chira et al., 2015; Giacca, 2010).

Os métodos físicos utilizam a força física para abrir poros na membrana, permitindo a entrada de genes no interior das células. Esses métodos são simples, não requerem o uso de transportadores e não delimitam o tamanho de ADN a ser transportado. Embora apresentem todas essas vantagens algumas das técnicas utilizadas podem causar alterações morfológicas nas membranas, o que inviabiliza o seu uso para o transporte de genes.

Os métodos químicos, por outro lado, envolvem alterações no plasmídeo para facilitar a sua interação com a membrana. Essas alterações geralmente incluem a conjugação com moléculas sintéticas, que por norma devem ser catiónicas, permitindo uma interação eletrostática com o ADN carregado negativamente (Chira et al., 2015; Martins Pereira, 2014). Esses sistemas de entrega sintéticos são baseados em péptidos de penetração celular (CPPs), micelas, polímeros e lípidos (Faria et al., 2022). A interação eletrostática entre o material genético e os vetores sintéticos resulta na formação de complexos fortemente catiónicos, altamente estáveis e capazes de manter as suas propriedades físico-químicas por um longo período. Além disso, favorece a interação com os proteoglicanos presentes na superfície das células-alvo, facilitando a internalização por endocitose (Neves et al., 2020; Oliveira et al., 2018).

Apesar das vantagens enumeradas dos vetores não virais quando comparados com os virais, estes possuem uma menor capacidade de transfeção, o que limita a eficiência de entrega do gene terapêutico à célula-alvo e conseqüentemente a sua expressão. Sendo que, um dos requisitos da terapia gênica é o direcionamento específico do material genético e a sua expressão, ligandos têm sido usados de modo a aumentar a especificidade dos vetores não virais e aprimorar a sua eficácia (Chira et al., 2015)

1.2.3 Nanotecnologia

A entrega precisa e direcionada de genes terapêuticos tem sido um dos principais desafios da área biotecnológica, e vários métodos de direcionamento foram investigados para desenvolver sistemas de entrega seguros e eficazes (Parveen et al., 2012). Posto isto, a nanotecnologia surge como uma solução promissora, permitindo a formulação de sistemas à escala nanométrica (escala que ocorrem os processos biológicos) biocompatíveis, identificados como nanotransportadores para a entrega de genes no local de ação (Parveen et al., 2012) (Torchilin, 2000). Esses nanotransportadores permitem melhorar a biodisponibilidade do agente bioativo, aumentar o seu tempo de meia-vida e protegê-lo da degradação enzimática, proporcionando assim um perfil de segurança relativamente maior (Sahoo et al., 2007). A entrega do ADN plasmídico às mitocôndrias por meio das nanopartículas permite corrigir as mutações do ADNmt causadoras de diversas patologias mitocondriais. A entrega do gene terapêutico na matriz mitocondrial e a correção de algumas cópias de ADNmt mutados pode ser suficiente para o sucesso da TGM (Cardoso et al., 2015; Yasuzaki et al., 2010). As principais nanopartículas usadas para a transfeção mitocondrial são as baseadas em polímeros, lipossomas, DQAsomes e CPPs (Z. Wang et al., 2017).

1.2.3.1 Proteína verde fluorescente (GFP)

A proteína verde fluorescente (GFP) pode ser usada como biomarcador, foi isolada da água-viva *Aequorea Victoria* e descoberta pelo pesquisador Osamu Shimomura em 1962. Devido à capacidade dessa proteína de emitir uma luz verde fluorescente quando exposta à luz UV, o seu gene tem sido muito utilizado na identificação de células tumorais por

meio da sua introdução em células vivas através das técnicas de engenharia genética e ADN recombinante (Camargo Barros et al., 2016).

O gene da GFP é composto em 238 aminoácidos, e nas posições 65, 66 e 67 ocorre a formação de um cromóforo responsável por absorver luz e emitir a luz verde fluorescente. Essa proteína apresenta um pico de excitação em 394 nm, e um único pico de emissão a 509 nm (figura 10) (Xiao, 2009).

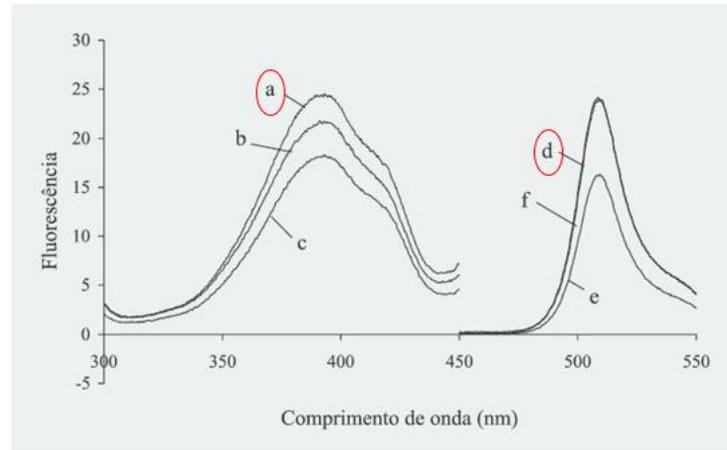


Figura 10 - Espectros de excitação (394 nm) da GFP padrão (a) extraída (b), purificada (c); e espectros de emissão (509 nm) da GFP padrão (d), extraída (e) e purificada (f). Imagem adaptada de (Chiarini et al., 2003).

A capacidade da proteína GFP de emitir fluorescência permitiu a utilização do seu gene na TGM para o desenvolvimento de um novo sistema de transfeção mitocondrial projetado para ser especificamente expresso nas mitocôndrias (mpGFP). Esta especificidade de direcionamento do mpGFP é alcançada pela incorporação de um código genético exclusivo das mitocôndrias (conforme ilustrado na figura 11). Por exemplo, os codões (UGA e TGA) que normalmente são reconhecidos pelas ribossomas presentes no citosol como codões *stop*, se lidos pelos ribossomas mitocondriais codificam um triptofano. Assim, a recodificação da sequência GFP com esses codões mitocondriais garante a expressão do gene na matriz interna da mitocôndria (Inagaki et al., 1998; Lyrawati et al., 2011).

O gene GFP foi escolhido exclusivamente como “*reported gene*” devido a facilidade em monitorar a sua expressão no interior da mitocôndria por meio da microscopia de

fluorescência. Além disso, é uma proteína estável, capaz de suportar temperaturas até 65°C, e é resistente à degradação enzimática (Lyrawati et al., 2011; Xiao, 2009).

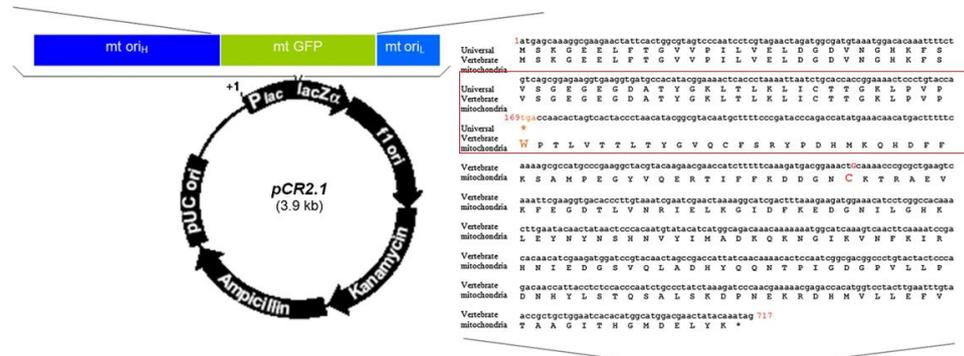


Figura 11 - Estratégia utilizada para construir o mpGFP. Um alinhamento da sequência de nucleotídeos de mpGFP e sua tradução. A incorporação do código genético das mitocôndrias permite a especificidade de direcionamento do mpGFP uma vez que o códon mitocondrial TGA se lido pelas mitocôndrias codificam um triptofano, W. Imagem adaptada de (Lyrawati et al., 2011).

1.2.3.2 Polietilenamina (PEI)

O uso de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis como transportadores de material biológico revelou ser uma estratégia adequada para a terapia gênica (Z. Wang et al., 2017).

Em 1995, Jean-Paul Behr identificou o polímero polietilenamina como sendo um excelente transportador de material genético devido a sua capacidade de formar complexos estáveis com materiais genéticos bem como, uma atividade endossomolítica impressionante e conseqüentemente uma transfeção eficiente (Abdallah B et al., 1996; Fortune, 2010).

A estrutura e o tamanho do PEI são definidos pela adição de grupos funcionais e pela polimerização dos monómeros. Dependendo da estrutura, o PEI pode ser linear (Figura 12A) ou ramificado (Figura 12B). Em termos de eficiência de entrega de ácido nucleico, o PEI ramificado demonstrou ser superior, pois exhibe aminas primárias, secundárias e terciárias em sua estrutura que, quando protonadas pH neutro, conferem uma elevada densidade de carga catiônica (Lungwitz et al., 2005).

Relativamente ao peso molecular, o PEI de elevado peso molecular (25 kDa) foi considerado o padrão devido a sua elevada eficiência e estabilidade. Porém, possui alta citotoxicidade e biodegradação limitada. Já o PEI de baixo peso molecular (< 2 kDa) é

menos tóxico que a PEI de 25 kDa, no entanto, apresenta uma eficiência reduzida. Portanto, é fundamental encontrar um equilíbrio entre a capacidade de transfeção e a citotoxicidade, desenvolvendo vetores baseados em PEI com elevada capacidade de transfeção do material genético apresentando um mínimo de citotoxicidade em relação às células (Deng et al., 2009; Nikitenko & Prassolov, 2013).

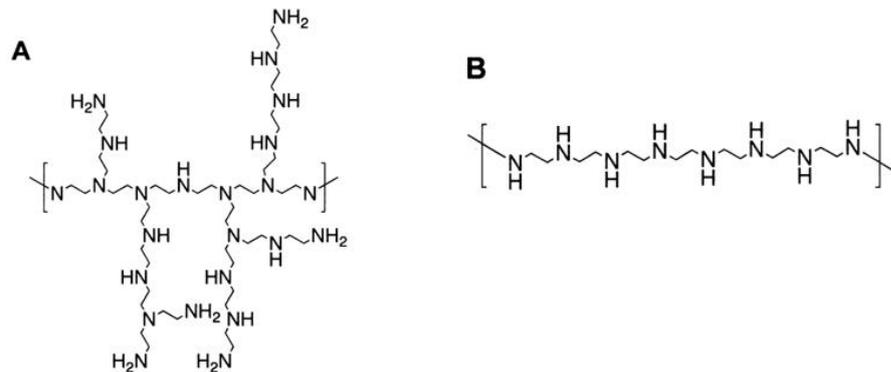


Figura 12 - Estruturas da PEI ramificadas (A) e lineares (B). Imagem adaptada de (Fortune, 2010).

Devido à sua natureza catiónica, a PEI consegue condensar o ADN plasmídico aniônico por meio de interações eletrostáticas, formando um complexo nanométrico denominado de poliplexo (Figura 13). Esses poliplexos possuem um tamanho reduzido e uma carga catiónica, o que facilita o processo de internalização celular (Ibraheem et al., 2014).

Uma vez no interior da célula (Figura 13), os poliplexos são capturados pelas vesículas endossomais, que bombardeiam prótons para o seu interior através da ativação dos seus canais iônicos ATPases. Este processo resulta na protonação das aminas presentes na estrutura do PEI, evitando a acidificação endossômica. Simultaneamente, ocorre o influxo contínuo de prótons e a entrada passiva do íon cloreto, o que resulta no aumento da pressão osmótica no interior do endossoma. E esse aumento provoca a ruptura da membrana endossomal/lipossomal e a libertação dos poliplexos para o citoplasma. Esse fenómeno de fuga endossomal do PEI é conhecido como “efeito esponja de prótons” e é um dos principais fatores que influenciam a eficiência da transfeção (Jin et al., 2014; Loureiro, 2016).

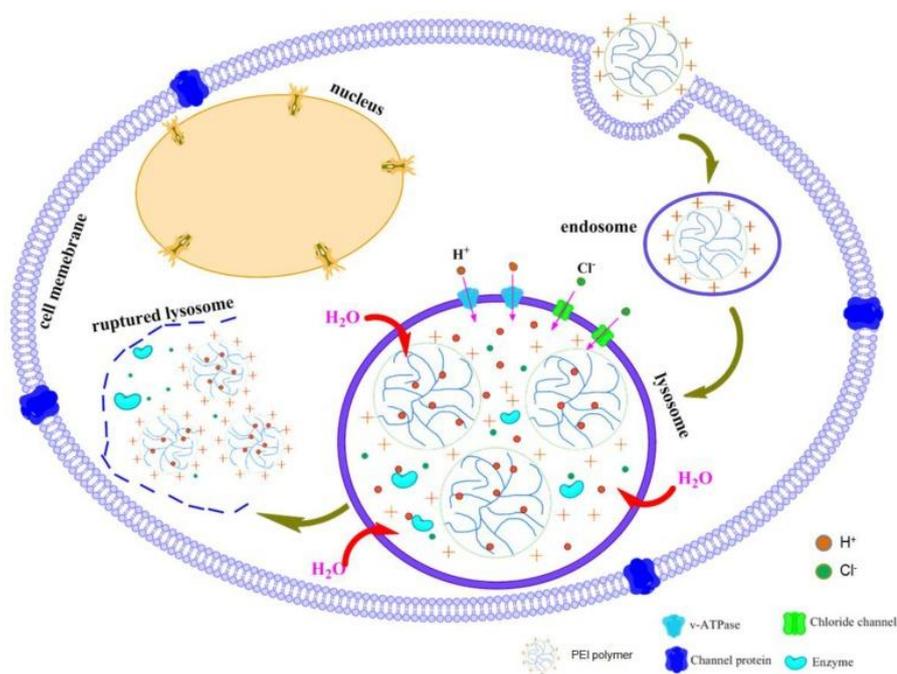


Figura 13 – Representação esquemática do efeito esponja de prótons da PEI. Imagem adaptada de (Jin et al., 2014).

Para o sucesso da terapia gênica mitocondrial é essencial o desenvolvimento de sistemas de entrega com afinidade mitocondrial, e o PEI por si só não possui esta especificidade de direcionamento. Nesse sentido, sistemas de entrega mitocondriotrópicos baseados em dequalínio (DQA) surgem como uma excelente escolha para contornar esse obstáculo (Mallick et al., 2019).

- O dequalínio é um catião anfifílico, com regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, de forma arredondada. É capaz de formar vesículas catiónicas redondas, chamadas de DQAsomes, que possuem características semelhantes às lipossomas. Estudos realizados revelaram que os DQAsomes catiónicos exercem um efeito desestabilizador nas membranas endossomais, resultando em sua ruptura e, conseqüentemente, na captação do DNA pela maquinaria de importação de proteínas mitocondriais (D'Souza et al., 2003; Z. Wang et al., 2017).

O vetor PEI-DQA permite à formação de complexos extremamente condensados, de tamanho nanométrico, com uma atividade endossomolítica excelente. Os complexos formados possuem a capacidade de se acumular próximo às mitocôndrias assim como se fundir com a membrana mitocondrial externa (D'Souza et al., 2005). Todavia, estudos indicaram que a eficiência de transfeção de complexos de DQAsomes com mpADN numa

linhagem de macrófagos de camundongos foi significativamente reduzida, destacando a necessidade de otimizações para melhorar a eficiência de transfeção desse conjugado (Cardoso et al., 2015).

1.2.3.3 TAT

Os péptidos de penetração celular (CPPs) têm sido muito reconhecidos como vetores de entrega eficiente de fármacos, ADN plasmídico e nanopartículas, por serem vetores não tóxicos, não imunogênicos, biodegradáveis, e apresentarem alto potencial na conjugação com moléculas terapêuticas e elevada taxa de permeação nas células (Dong et al., 2016; Franz et al., 2016). Os CPPs são péptidos curtos constituídos normalmente por menos de 30 aminoácidos, com carga global positiva. Podem ser classificados em dois grupos principais: os péptidos ricos em arginina e os anfipáticos.

- Os péptidos anfipáticos apresentam na sua estrutura domínios hidrofílicos e hidrofóbicos, que lhes confere uma maior interação com o material genético permitindo assim, a translocação membranar seguida de entrada nas células (Faria et al., 2021).

- Os péptidos catiónicos ricos em arginina, como o nome sugere, possuem na sua estrutura uma sequência rica em arginina que em condições fisiológicas apresentam uma elevada carga positiva. Essa carga catiónica, juntamente com a capacidade de formar ligações de hidrogénio por meio do grupo guanidínio lateral, possibilita fortes interações eletrostáticas com a membrana celular carregado negativamente. Tudo isso, aumenta a capacidade de internalização desse tipo de péptido. Um dos exemplos de CPPs catiónicos ricos em arginina muito usado na atualidade é o TAT (Neves et al., 2020; Tavares Da Silva et al., 2014).

Em 1980, foi descoberto por Frankel que a proteína TAT do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH-1), consegue atravessar facilmente a membrana celular, ativando a transcrição viral. Esse péptido possui na sua estrutura uma sequência de 11 aminoácidos com 6 resíduos de arginina e 2 resíduos de lisina (figura 14, Tabela 2) (Albuquerque et al., 2020; Tavares Da Silva et al., 2014). Em diversos estudos de investigação, os vetores baseados em TAT demonstraram capacidade em atravessar a membrana plasmática de forma não invasiva, preservando a integridade das membranas.

Por esse motivo, são considerados altamente eficientes e seguros (Ruseska & Zimmer, 2020).

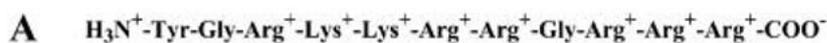


Figura 14 - Estrutura química da sequência de 11 aminoácidos com 6 resíduos de arginina e 2 resíduos de lisina da proteína TAT do VIH-1. Imagem adaptada de **(Ziegler & Seelig, 2004)**.

Tabela 2. A Origem e sequência do aminoácido do TAT descritos na literatura e a sua respetiva categoria. Adaptada de (Tavares Da Silva et al., 2014).

| Péptido | Origem | Sequência | Categoria |
|----------------|----------------------|------------------|----------------------------------|
| TAT | Proteína TAT – VIH-1 | GRKKRRQRRRPPQ | Catiónico (ricos em arginina) |

Sendo o TAT um dos CPPs ricos em arginina, o seu o mecanismo de internalização celular ainda não foi totalmente compreendido. No entanto, existem duas hipóteses principais: a endocitose e a penetração transmembranar direta (Albuquerque et al., 2020; Faria et al., 2021). A escolha tipo de via de entrada depende de várias propriedades físico-químicas, como a distribuição de carga, o comprimento, o peso molecular e a temperatura. Alguns autores acreditam que em condições de baixa concentração de péptidos prevalece o mecanismo de translocação via endocitose, enquanto a concentrações mais elevadas a penetração transmembranar direta se torna predominante (Ruseska & Zimmer, 2020).

- Penetração transmembranar direta

O mecanismo de internalização por penetração transmembranar direta (Figura 15) envolve a interação direta de péptidos carregados positivamente com a bicamada lipídica carregada negativamente. Essa interação leva à formação de micelas invertidas, poros membranares e modelo em “carpete”, onde os péptidos ficam retidos no interior das micelas. Em seguida, acontece a desestabilização da micela invertida permitindo a libertação dos péptidos no meio intracelular. No entanto, esse mecanismo é adequado apenas para internalização de péptidos de baixo peso molecular (Ruseska & Zimmer, 2020; Tavares Da Silva et al., 2014).

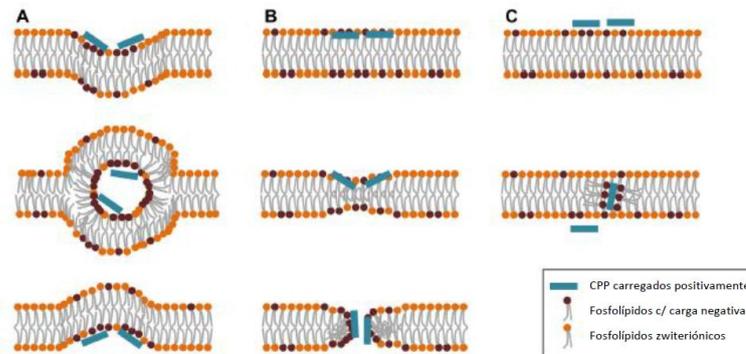


Figura 15 - Representação esquemática do mecanismo proposto para a internalização de um CPP via penetração direta: (A) Modelo das micelas invertidas; (B) Formação de poros membranares e (C) Modelo “em carpete”. Imagem adaptada de (Tavares Da Silva et al., 2014).

- Endocitose

A internalização de CPP por meio da endocitose envolve duas etapas: a penetração endocítica e a evasão do endossoma. A segunda etapa é crucial, não apenas para evitar a degradação do péptido (e das moléculas conjugadas a ele), mas também para permitir que o péptido alcance seu alvo e exerça sua atividade biológica desejada. Esse mecanismo geralmente é o mais aceito para a internalização de péptidos, e atualmente são conhecidas três vias endocíticas diferentes para esse fenômeno (Figura 16): a macropinocitose, endocitose mediada por clatrina e endocitose mediada por cavéolas.

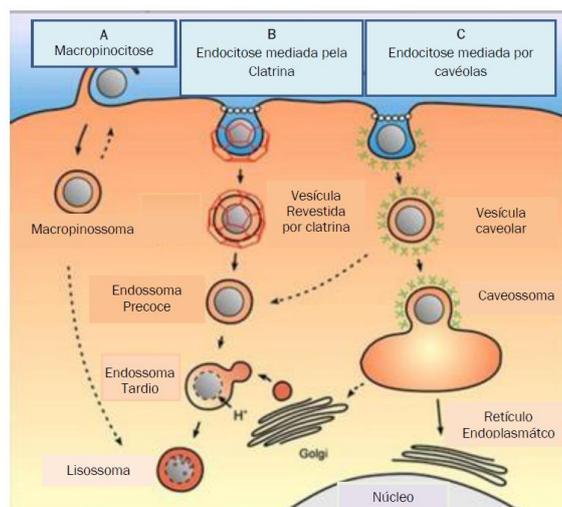


Figura 16 – Internalização de um CPP descrita por três diferentes vias endocitóticas: (A) Macropinocitose; (B) Endocitose mediada por clatrina e (C) Endocitose mediada por cavéolas. Imagem adaptada de (Tavares Da Silva et al., 2014).

Cada via endocítica possui características distintas e pode ser utilizada por diferentes CPPs dependendo das suas propriedades físico-químicas e das células-alvo específicas (Nikitenko & Prassolov, 2013; Tavares Da Silva et al., 2014).

Na terapia gênica, o péptido TAT demonstrou elevada capacidade de complexação do ADN plasmídico, excelente desempenho em termos de captação celular e entrega de genes. Todas essas vantagens podem ser atribuídas a sua elevada densidade de carga (Faria et al., 2022). Além disso, o TAT já mostrou habilidade de atravessar as membranas mitocondriais, o que desperta grande interesse em seu uso na terapia genética mitocondrial. Essas características fazem do TAT uma opção promissora para a entrega direcionada de material genético às mitocôndrias (Del Gaizo et al., 2003).

2 Objetivos

Este trabalho de investigação tem como objetivo a formulação de sistemas de entrega capazes de encapsular eficientemente um gene mitocondrial e promover a sua captação e internalização celular, permitindo a sua acumulação e entrada nas mitocôndrias das células.

Para alcançar este objetivo, foram preparados complexos baseados em polímero PEI e péptido TAT com o intuito de complexar eficientemente o gene mpGFP expresso exclusivamente nas mitocôndrias. Para garantir o direcionamento à mitocôndria, o polímero PEI foi conjugado ao cloreto de dequalínio (DQA), formando a composto PEI-DQA. As nanopartículas foram preparadas a diferentes rácios N/P, razão entre aminas catiónicas em relação aos fosfatos de carga negativa do plasmídeo. A razão N/P do péptido TAT foi mantida constante em todos os sistemas.

Ensaio para avaliar a capacidade de encapsulação dos complexos poliméricos e o seu comportamento com a adição do TAT foram realizados assim como, a caracterização das nanopartículas para determinação de propriedades como a morfologia, o tamanho, a carga superficial, e a polidispersidade. A biocompatibilidade dos sistemas desenvolvidos, a capacidade de internalização celular e o seu direcionamento específico à mitocôndria também foram avaliados.

3 Materiais

O ADN plasmídico que codifica a proteína verde-fluorescente, plasmídeo desenvolvido exclusivamente para a tradução mitocondrial (mpGFP) (5,9 kbp), foi oferecido pela Dra. Diana Lyrawati (Cardoso et al., 2015). O péptido TAT foi adquirido à empresa Biomatik (Cambridge, ON, Canadá), e a polietilenamina (PEI) de 10 e 25 kDa à Sigma-Aldrich. A Agarose e o GreenSafe Premium foram obtidos da NZYTech Lda (Lisboa, Portugal) enquanto a sonda MitoTracker Orange CMTMRos, usada na coloração da mitocôndria, foi fornecida pela empresa Molecular Probes (Leiden, Holanda).

As células cancerígenas do colo do útero (HeLa) foram adquiridas da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

4 Métodos

Preparação dos complexos

A formulação dos complexos consistiu na adição de 50 μ L de PEI-DQA, em várias razões Nitrogénio/Fosfato (N/P) variando de 20 a 100, a 150 μ L de pGFP. Ambas as soluções foram dissolvidas em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,5). As soluções do polímero PEI-DQA de 10 e 25 kDa foram adicionadas respetivamente, gota a gota, durante 1 min com agitação constante no vortex ao volume de pGFP (50 μ L de PEI-DQA a 150 μ L de pGFP), deixou-se equilibrar durante 25 min à temperatura ambiente para permitir a formação dos complexos. Todas as formulações foram realizadas em duplicados, a diferentes pesos moleculares do PEI (10 e 25 kDa) e a vários rácios N/P, através da razão molar entre os grupos amins (N) carregados positivamente do PEI-DQA e os grupos fosfatos (P) carregados negativamente do pGFP. Seguidamente, os

sistemas foram centrifugados a 13.000 rpm a 4 °C durante 20 min, e o pellet contendo os complexos foi recuperado. A quantidade de plasmídeo não complexado presente nos sobrenadantes foi usada posteriormente para a análise da eficiência de encapsulação através da eletroforese em gel de agarose.

No caso dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP, foram preparados a partir de alíquotas do péptido TAT de 0,5 mg/mL dissolvido no mesmo tampão que as soluções anteriores, e a sua adição foi seguindo o procedimento descrito anteriormente para os sistemas PEI-DQA/pGFP. Nos complexos ternários, a determinação da relação N/P foi estabelecida considerando a proporção de cargas, individualmente, para os grupos aminas do PEI ou TAT em relação aos grupos fosfatos do pADN. Sendo que as proporções molares do PEI-DQA para o plasmídeo, N/P, foram de 20, 50 e 100, e a do TAT para com o plasmídeo foi de N/P 4 (Faria et al., 2022).

Determinação de Eficiência de encapsulação (EE)

A quantidade de pGFP não-encapsulado presente no sobrenadante foi analisada através da eletroforese em gel de agarose. Para esta técnica dissolveu-se 0,8 g de agarose em 100 mL de tampão TAE 1X, e 2,4 µL de green safe (µg/µL). A eletroforese foi realizada a 120 V durante 30 minutos e o gel analisado recorrendo à luz ultravioleta (UV) (312 nm), com a utilização do sistema Uvitec Cambridge Fire-Reader UV (UVITEC, Cambridge, Reino Unido).

Morfologia dos complexos

Após a formulação dos complexos, o pellet foi ressuspensionado em 400 µL de água mili-Q, e centrifugado (13 000 rpm, 10 min), é necessário repetir este processo por pelo menos 3 vezes. Seguidamente o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo nanopartículas ressuspensionado em 40 µL de tungstênio 2%. Foi realizada na amostra uma diluição de 1:20 em água mili-Q e colocada 10 µL da amostra nas lamelas em formato redondo a secar "overnight" à temperatura ambiente. Por fim as amostras foram revestidas por pulverização catódica com ouro (Emitech K550) e o microscópio eletrônico

de varrimento, com voltagem de aceleração de 20 Kv em várias ampliações foi usado para determinar a morfologia dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP

Tamanho e potencial zeta (ζ) dos complexos

A determinação do tamanho e da carga superficial das nanopartículas desenvolvidas foi através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, DLS, usando o equipamento Zetasizer nano ZS a 25°C. Para tal, o pellet contendo as nanopartículas foi ressuspensionado em solução de glicose a 5% com NaCl a 1Mm. A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS) usando um laser He-Ne 633 nm com ótica não invasiva de retroespalhamento (NIBS) foi usada para determinar o tamanho dos complexos, já o espalhamento de luz eletroforética usando técnica de laser M3-PALS para avaliar a carga superficial do sistema, e a obtenção e tratamento dos dados foi pelo software Malvern Zetasizer software v 6.34.

Cultura celular

As células utilizadas neste trabalho foram as células HeLa, células cancerígenas provenientes do colo do útero. As células foram cultivadas em frascos T de 25 cm³ com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F-12) (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, mais 1% de estreptomicina/penicilina (Sigma). As células foram mantidas numa incubadora a temperatura de 37 °C e uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂ até a confluência ser alcançada. Depois, as células foram subcultivadas a cada sete dias para manter o seu crescimento exponencial.

Citotoxicidade dos sistemas

A citotoxicidade do complexo TAT4/PEI-DQA/pGFP foi avaliada através do ensaio MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], onde há redução do

sal tetrazólio (MTT) em cristais de Formazan de intensa cor roxo-azulado, pelo complexo piruvato desidrogenase presente na matriz mitocondrial (Berridge & Tan, 1993). As células foram tripsinizadas, contadas e diluídas numa concentração aproximadamente 5.000.000 células/mL. Em seguida 0,002 mL dessa preparação foi adicionada a cada poço de uma placa 96, contendo 200 µL de meio completo. O ensaio foi realizado em sextuplicado para cada sistema. No dia seguinte mudou-se o meio para meio simples para facilitar a transfeção, pelo menos 12h antes de transfetar. As células foram transfetadas adicionando 10 µL da amostra contendo os vários sistemas testados, a cada poço.

A transfeção foi terminada após 6 h trocando o meio simples para meio completo. Ao fim de 48 h de incubação, retirou-se o meio e adicionaram-se 50 µL de MTT (5 mg/mL) a cada poço. 4 h após a incubação com a MTT, descartou-se todo o meio, ressuspendeu-se em 200 µL DMSO e incubou-se por mais 30 min a 37 °C. Por fim, retirou-se 80 µL de cada poço para uma placa de leitura. A absorvância de cada poço foi lida a 570 nm, utilizando o espectrofotómetro *XMark microplate*. A viabilidade celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular \%} = \frac{\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância do branco}}{\text{Absorvância do controlo} - \text{Absorvância do branco}} \times 100$$

O valor de absorvância obtido é diretamente proporcional ao número de células vivas. A biocompatibilidade do sistema TAT4/PEI-DQA/pGFP foi avaliada em células HeLa por meio do ensaio MTT, quantificando as células metabolicamente ativas.

Capacidade de transfeção dos sistemas

A capacidade de transfeção dos complexos TAT4/PEI-DQA/pGFP foi avaliada pela técnica de microscopia confocal de fluorescência:

- a. A primeira fase deste ensaio consiste na marcação do plasmídeo com a sonda fluorescente FITC, no entanto, não foi necessária visto que o péptido TAT usado neste trabalho de investigação para a formulação dos vetores já se encontra marcado com FITC dispensando a marcação do plasmídeo. Deste modo, procedeu-se à

preparação dos complexos com PEI de 10 e 25 kDa a rácios N/P de 50 e 100 como descrito anteriormente.

b. Marcação do núcleo e da mitocôndria

Antes de realizar a transfeção celular dos sistemas formulados realizou-se a marcação da mitocôndria e do núcleo das células com o intuito de permitir a monitorização da capacidade de transfeção e de direcionamento mitocondrial. E para tal, o núcleo das células foi corado de azul através da incubação com 250 μ L da sonda DAPI (445/450 nm) (1:1000) para cada poço durante 20 min, após isto descartou-se o DAPI e as células foram lavadas 3 vezes com PBS. Tendo o núcleo marcado passou-se para a marcação da mitocôndria com a adição de 250 μ L da sonda MitoTrack Orange (vermelho, 555/580 nm) (1:10000) durante 25 min, em seguida procedeu-se novamente à lavagem 3 vezes com PBS. Todo esse processo foi realizado com proteção da luz.

c. Transfeção celular

As células HeLa foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 por poços em placas 8 μ -slide em meio completo (suplementado com soro e antibiótico) até atingirem uma confluência de aproximadamente 70%, e seguiu-se para a transfeção em que 12h antes o meio das células foi mudado para meio simples (sem soro e sem antibiótico) para facilitar o processo em si. Estando as células preparadas tendo o núcleo e a mitocôndria corados com DAPI e MitoTrack Orange respetivamente, prosseguiu-se para a transfeção celular pela adição de 10 μ L do pellet contendo as nanopartículas marcadas com FITC para cada poço. E após 2, 4 e 6h de transfeção as células foram visualizadas por meio da microscopia confocal de fluorescência (ZEISS LSM 710, Oberkochen, Alemanha).

5 Resultados e Discussão

Formulação e caracterização dos sistemas de entrega

A primeira etapa deste trabalho corresponde à formulação de dois sistemas de entrega, os sistemas PEI-DQA/pGFP e TAT4/PEI-DQA/pGFP. A formulação dos sistemas PEI-DQA/pGFP consistiu na adição do polímero a rácios N/P de 20 e 50, gota a gota, à solução do pGFP de concentração e volume fixo. As fortes interações eletrostáticas entre o seu grupo fosfato carregado negativamente e o nitrogénio carregado positivamente presente na estrutura do polímero permitiu a formação de complexos altamente condensados, à escala nanométrica.

Para a formulação dos complexos ternários TAT4/PEI-DQA/pGFP, um volume fixo de TAT de rácio 4 foi adicionada ao sistema PEI-DQA/pGFP de rácios 50 e 100, e o procedimento seguido foi o mesmo descrito anteriormente. Este péptido por ser também catiónico apresenta uma elevada densidade de carga o que permite uma maior disponibilidade de cargas positivas para interagir com plasmídeo. A proporção de cargas foi em relação aos grupos amina do PEI ou TAT que representam cargas positivas- para os grupos fosfato carregados negativamente do plasmídeo. Quanto maior for a razão N/P, maior será a capacidade de complexação do plasmídeo.

Eficiência de encapsulação do pGFP

A eficiência de encapsulação do pGFP foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose (Figura 17) em que uma amostra de pGFP foi utilizada como controlo e a ausência de bandas indica a eficiente complexação de plasmídeo.

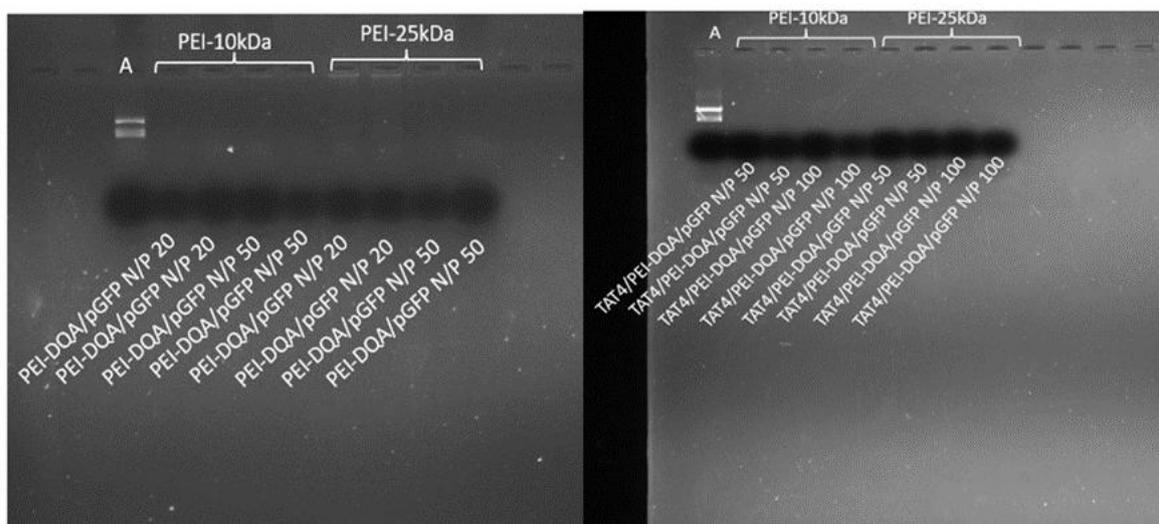


Figura 17 – Eficiência de encapsulação do pGFP pelos sistemas PEI-DQA/pGFP (10 kDa e 25 kDa) formulados a rácios N/P 20 e 50, e os sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP formulados a rácios N/P 50 e 100, investigada por eletroforese em gel de agarose. (A) - amostra controlo de pGFP.

Analisando a imagem nota-se a ausência de bandas tanto para o sistema PEI-DQA/pGFP como para o sistema TAT4/PEI-DQA/pGFP, o que comprova a eficiente complexação do pGFP. O PEI possui uma elevada densidade de carga catiónica, o que permite fortes interações eletrostáticas com o plasmídeo carregado negativamente. Ambos os sistemas baseados em PEI de pesos moleculares diferentes, 10 kDa e 25 kDa, conseguiram encapsular o plasmídeo com sucesso. Conforme observado em pesquisas recentes, os sistemas com PEI de rácios de 20, 50 e 100 possuem uma habilidade de complexar o plasmídeo de forma eficiente. Além disso, o aumento da razão N/P resulta numa maior disponibilidade de carga catiónica, ou seja, quanto maior o rácio do sistema maior será a sua capacidade de condensar o plasmídeo (Faria et al., 2022).

Os sistemas baseados em TAT exibiram, assim como os outros sistemas, uma excelente capacidade de encapsulação do plasmídeo em comparação com a amostra de controlo (A), pois apresentam uma elevada disponibilidade de carga catiónica que neutraliza eficientemente as cargas negativas do plasmídeo, indicado pela ausência de bandas.

Morfologia

A morfologia dos sistemas formulados foi analisada pela técnica de microscopia eletrônica de varrimento (SEM), uma técnica que permite avaliar a forma, o tamanho e as propriedades da superfície dos complexos. Apenas os sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP preparados a vários rácios N/P = 20, 50 e 100 e a pesos moleculares de PEI de 10 kDa e 25 kDa prosseguiram para esta análise microscópica (figura 18). Isso porque estudos realizados recentemente indicaram que a adição do péptido de carga positiva aumenta a densidade de carga catiónica dos sistemas levando a formação de nanopartículas altamente condensadas e de tamanhos reduzidos, no geral inferiores a 800 nm (Faria et al., 2022a).

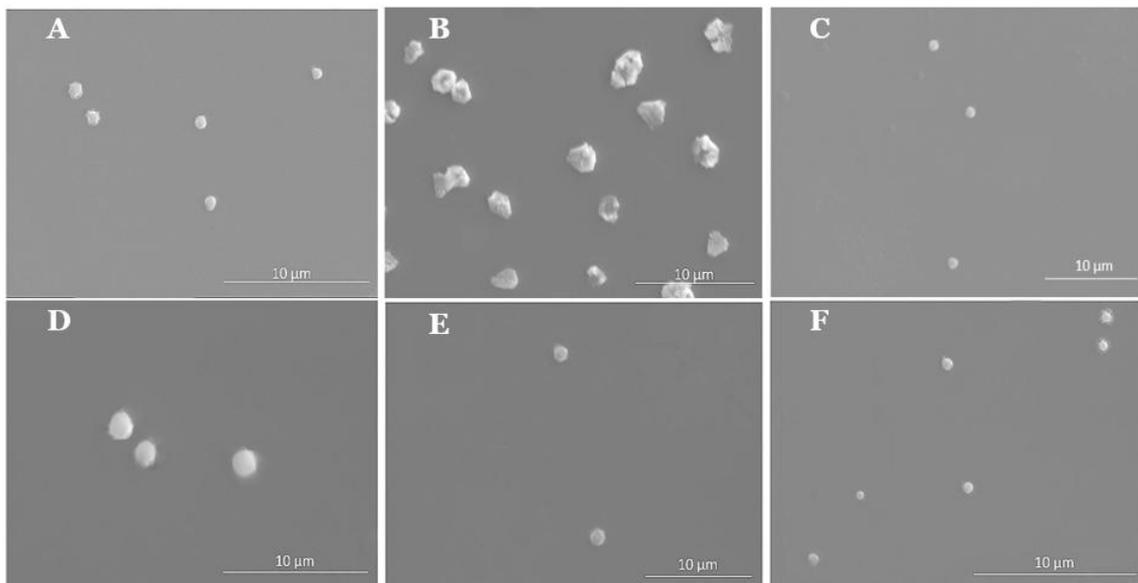


Figura 18 - Microscopia eletrônica de varrimento para os sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP com PEI de 10 kDa formulado a rácios N/P 20 (A), rácio N/P 50 (B) e rácio N/P 100 (C), e PEI de 25 kDa formulado a rácios de N/P 20 (D), rácio N/P 50 (E) e rácio N/P 100 (F).

Ao analisar as imagens referentes à morfologia dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP, podemos confirmar que a combinação entre o polímero e o péptido resulta na formação de complexos de plasmídeo à escala nanométrica, com formas aproximadamente esféricas ou ovais e tamanhos reduzidos. Os sistemas formulados com PEI de 25 kDa apresentam no geral uma morfologia/forma mais regular quando comparados com os de PEI 10 kDa. A razão N/P influencia tanto a forma como o tamanho dos sistemas. Por consequência, os

sistemas de rácio N/P de 50 e 100 apresentaram nanopartículas altamente condensadas com morfologia esférica ou oval de tamanhos reduzidos, o que facilita a sua captação e internalização celular.

Tamanho e potencial zeta dos complexos

O tamanho médio, a carga superficial e o índice de polidispersidade (PdI) dos diferentes nanosistemas formulados a diferentes rácios N/P foram determinados pela técnica de dispersão dinâmica de luz no equipamento Zetasizer nano ZS e os valores estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de potencial Zeta, Tamanho médio e Índice de polidispersidade (PdI) dos sistemas PEI-DQA/pGFP e TAT4/PEI-DQA/pGFP N/P, com PEI de 10 e 25 kDa para rácios de 20, 50 e 100.

| Tipo de sistema | Potencial zeta (mV) | Tamanho (nm) | PdI |
|--|----------------------------|---------------------|----------------|
| PEI-DQA/pGFP (PEI 10kDa) N/P 20 | -7,200 ± 5,854 | 253,133 ± 15,250 | 0,4166 ± 0,393 |
| PEI-DQA/pGFP (PEI 10kDa) N/P 50 | -11,920 ± 3,931 | 461,667 ± 13,020 | 0,349 ± 0,471 |
| PEI-DQA/pGFP (PEI 10kDa) N/P 100 | -3,450 ± 1,513 | 803,300 ± 55,560 | 0,302 ± 0,032 |
| PEI-DQA/pGFP (PEI 25kDa) N/P 20 | - 9,550 ± 4,164 | 46,380 ± 1,785 | 0,792 ± 0,044 |
| PEI-DQA/pGFP (PEI 25kDa) N/P 50 | -4,100 ± 0,353 | 210,100 ± 19,214 | 0,403 ± 0,035 |
| PEI-DQA/pGFP (PEI 25kDa) N/P 100 | -4,030 ± 1,895 | 742,100 ± 8,838 | 0,303 ± 0,026 |
| TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI 10kDa) N/P 20 | -2,063± 1,710 | 262,667 ± 1,528 | 0,126 ± 0,064 |
| TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI 10kDa) N/P 50 | -2,486 ± 0,178 | 242,333 ± 3,213 | 0,090± 0,010 |
| TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI 10kDa) N/P 100 | -0,583 ± 0,782 | 200,667 ± 2,517 | 0,086 ± 0,023 |
| TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI 25kDa) N/P 20 | -2,406 ± 0,035 | 225,667 ± 4,163 | 0,090 ± 0,017 |
| TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI 25kDa) N/P 50 | -1,670 ± 0,089 | 207,000 ± 2,000 | 0,133 ± 0,058 |
| TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI 25kDa) N/P 100 | 0,663 ± 0,346 | 193,000 ± 2,646 | 0,133 ± 0,061 |

Os valores do potencial zeta (mV) dos sistemas descritos na Tabela 3 mostram que os sistemas de PEI-DQA/pGFP exibem uma carga global negativa, sendo que essa carga negativa diminui à medida que o rácio N/P aumenta. Para o mesmo rácio N/P = 100, observou-se um ligeiro aumento do valor do potencial zeta do sistema preparado com PEI de 10 kDa (-3,450 mV) relativamente ao sistema com PEI de 25 kDa (-4,030 mV). A adição do DQA a PEI pode ter sido o motivo desse sistema apresentar um potencial zeta mais baixo uma vez que, o DQA possui carga neutra, o que pode influenciar a disponibilidade de carga positiva na superfície dos sistemas (Faria et al., 2022a).

Em contrapartida, os sistemas ternários baseados em TAT apresentaram valores de densidade de carga superficial significativamente maiores quando comparados com os sistemas PEI-DQA/pGFP. Os sistemas ternários preparados com PEI de 10 e 25 kDa a rácio N/P = 100 exibiram valores próximos de 0 mV (-0,583 mV e +0,663 mV, respetivamente). Esse aumento do potencial zeta é atribuído a conjugação de péptidos e polímeros, formando sistemas ternários com excelente capacidade de condensação do pGFP e maior densidade de carga. Tanto o TAT como a PEI-DQA, ambos são catiónicos, logo apresentam elevada densidade de carga, o que resulta em uma maior quantidade de aminas disponíveis em relação aos grupos fosfato do plasmídeo.

No que se refere aos tamanhos médios dos sistemas formulados, constatamos que a maioria dos sistemas apresentam tamanhos inferiores a 500 nm, com exceção dos sistemas PEI-DQA/pGFP de rácio 100 que apresentam tamanhos médios relativamente maiores (803,300 e 742,100 nm). Para os sistemas ternários formulados, o efeito dos rácios N/P utilizados foi claramente notório, uma vez que o aumento do rácio N/P levou à diminuição dos tamanhos dos sistemas. Também verificamos que a preparação dos sistemas com PEI de elevado peso molecular contribuiu para a redução do tamanho dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP. Entre todos os sistemas formulados com PEI de 25 kDa, o sistema TAT4/PEI-DQA/pGFP de rácio N/P= 100 foi o que apresentou o menor tamanho (193 nm). Tudo isso, demonstra que os sistemas ternários baseados em TAT possuem uma elevada capacidade de condensação do plasmídeo, formando sistemas com tamanhos reduzidos, o que é essencial para a sua entrada na célula.

A fim de avaliar a distribuição dos tamanhos das amostras, PdI é utilizado como parâmetro. Partículas monodispersas são caracterizadas por valores de PdI próximos a 0,01 enquanto valores entre 0,5 e 0,7 indicam polidispersão e valores acima de 0,7

sugerem uma ampla distribuição de tamanhos dos sistemas formulados (Faria et al., 2022). Com base nos valores de PDI apresentados na Tabela 3, pode-se afirmar que, de modo geral, todos os sistemas formulados são monodispersos, o que significa que as partículas possuem tamanhos aproximadamente iguais. Sendo que os valores de PDI do sistema TAT4/PEI-DQA/pGFP são ainda mais próximos de 0,01.

Citotoxicidade

O estudo de biocompatibilidade dos sistemas formulados foi realizado por meio do ensaio de MTT em células HeLa. Este ensaio colorimétrico consiste na redução do sal tetrazólio de cor amarela em cristais de formazan de intensa cor roxo-azulado por células metabolicamente ativas.

A citotoxicidade dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP preparados a rácios N/P de 20, 50 e 100 e a pesos moleculares de PEI de 10 e 25 kDa, foi avaliada em células HeLa após 24h e 48h de incubação, conforme representado na figura 19, respetivamente. Como controlo negativo, foram usadas células não transfetadas, e como controlo positivo, células tratadas com etanol 70%.

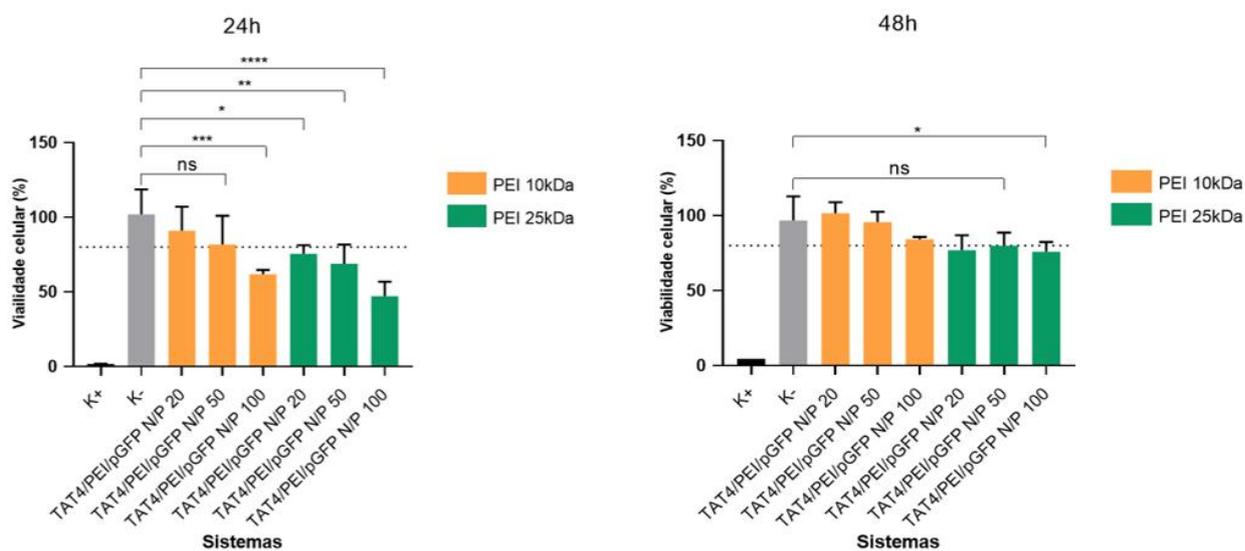


Figura 19 - Viabilidade celular das células HeLa após 24h e 48h de transfeção mediada pelos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI de 10 kDa e 25 kDa) formuladas a rácios N/P 20, 50 e 100, respetivamente. A percentagem de viabilidade celular é expressa em relação às células controlo. Os valores foram calculados tendo em conta os dados obtidos de quatro medições independentes (média \pm DP, n = 4) e analisados pelo teste “one-way”. ANOVA”.

Pela análise do gráfico após 24h de transfeção, mediada pelos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP preparados com PEI de 10 e 25 kDa a rácios N/P de 20, 50 e 100, foi possível evidenciar que os sistemas formulados com polímero de baixo de peso molecular e a rácios menores não apresentaram citotoxicidade, uma vez que os resultados obtidos são estatisticamente não significativos (ns) quando comparados com o controlo negativo indicando assim biocompatibilidade. No entanto, o mesmo sistema de rácio N/P=100 demonstrou um perfil citotóxico com uma diferença estatística significativa (**p= 0,008) quando comparada com as células não transfetadas. Os sistemas preparados com PEI de 25 kDa demonstraram citotoxicidade relativamente ao controlo negativo com diferenças estatísticas significativas (*p= 0,0391, **p=0,0061 e ****p≤0,001 respetivamente). Foi notório também a influência do aumento do peso molecular do PEI e do rácio N/P na diminuição da viabilidade celular das células HeLa. Sendo que os sistemas de PEI de 25 kDa a rácio N/P= 100 apresentaram uma menor percentagem de viabilidade celular isto porque o aumento dos rácios leva ao incremento da densidade de aminas catiónicas presentes na estrutura do polímero PEI tornando-o altamente citotóxico. A tendência dos sistemas de PEI de elevado peso molecular e de maior rácio apresentarem perfil citotóxico também foi verificada na literatura (Faria et al., 2022).

Os resultados obtidos após 48h de transfeção indicaram similarmente que nenhum dos sistemas sintetizados apresentaram citotoxicidade para as células HeLa sendo estatisticamente não significativos (ns) em exceção do sistema TAT4/PEI-DQA/pGFP de PEI de 25 kDa a rácio N/P= 100 que apresentou uma diferença estatística significativa (*p= 0,0463) em relação ao controlo negativo. Apesar dos sistemas desenvolvidos, no geral, demonstrarem biocompatibilidade, é possível constatar a diminuição da viabilidade celular dos sistemas com o aumento do peso molecular do PEI e com o incremento do rácio N/P. Os sistemas preparados com PEI de elevado peso molecular apresentaram uma menor viabilidade celular em relação ao seu homólogo de baixo peso molecular, isto porque o polímero PEI de 25 kDa é altamente tóxico quando comparado com o de 10 kDa. O aumento do rácio N/P levou ao aumento da carga catiónica dos sistemas desenvolvidos e conseqüentemente a uma maior citotoxicidade, sendo que os sistemas de rácio N/P= 100 exibiram uma percentagem de viabilidade relativamente mais baixa quando comparado

com os de rácio N/P de 20 e 50. Deste modo, pode-se constatar que a razão N/P pode ser uma ferramenta de ajuste do perfil citotóxico dos complexos formulados.

Eficiência de transfeção celular

Como o objetivo deste trabalho é desenvolver sistemas de entregas eficientes com capacidade de internalização e direcionamento mitocondrial, logo ensaios de co-localização são fundamentais. E para tal, recorreu-se à técnica de microscopia confocal de fluorescência em que os núcleos foram corados de azul por DAPI, o TAT usado nas formulações dos sistemas com FITC e as mitocôndrias com MitoTracker Orange a vermelho. As imagens microscópicas da capacidade de penetração das nanopartículas de TAT4/PEI-DQA/pGFP preparadas com PEI de 10 kDa e 25 kDa para rácios 50 e 100 nas células HeLa após 2h, 4h e 6h encontram-se representadas nas figuras 20, 21, 22 e 23.

Como forma a completar o estudo de viabilidade celular, procedeu-se à quantificação da intensidade de fluorescência do TAT-FITC 6h após a transfeção em células HeLa sendo usadas como controlo negativo as células não transfetadas (K⁻) e os resultados estão apresentados no gráfico da figura 24.

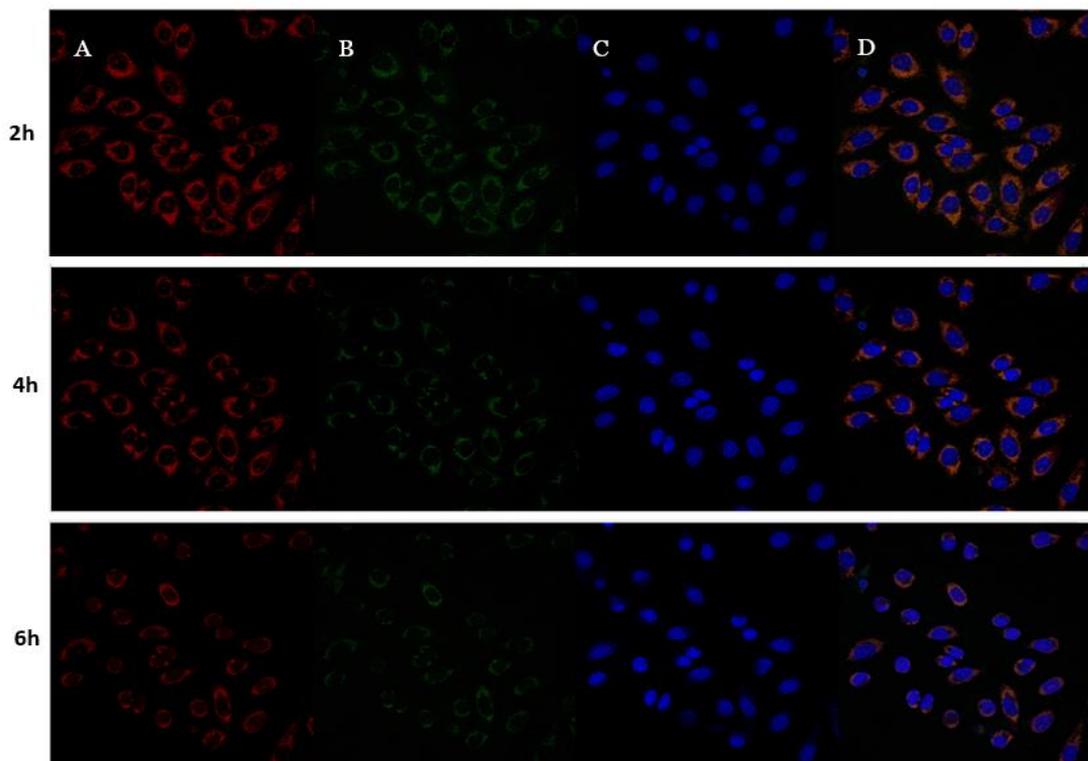


Figura 20 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 10 kDa) N /P 50 investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D).

Como pode ser observado pela figura 20, os pontos verdes fluorescentes presentes na imagem (B) correspondem às nanopartículas marcadas com FITC nas mitocôndrias das células durante todo o período de transfeção. Essa análise indica a ocorrência eficiente da transfeção celular e que os sistemas TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI de 10 kDa) de rácio N/P 50 foram internalizados, e logo após este processo, direcionados à mitocôndria. Na imagem (D) é possível constatar pela cor laranja resultado da sobreposição das mitocôndrias marcadas a vermelho e as nanopartículas verdes fluorescentes, um acúmulo significativo dos sistemas desenvolvidos no presente organelo. Isto demonstra que estes sistemas podem ser direcionados à mitocôndria.

No entanto, é visível a diminuição de pontos verdes fluorescentes nas mitocôndrias com aumento do tempo de transfeção tornando quase indetetáveis nas últimas 6h. Tudo isto, indica que o sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP a rácios menores e a baixo peso molecular possui dificuldade de internalização celular visto que apresenta um valor de potencial zeta relativamente menor, o que lhe confere uma menor capacidade de internalização celular e de direcionamento mitocondrial.

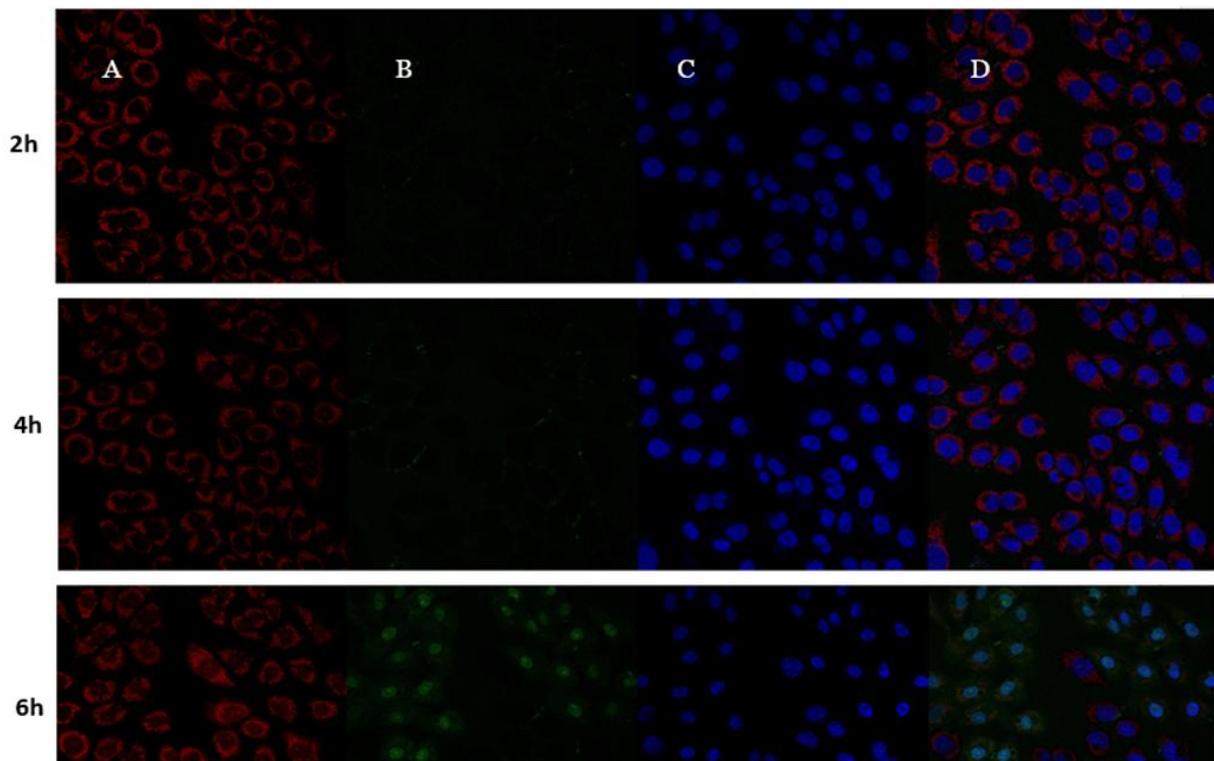


Figura 21 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 10 kDa) N /P 100 investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D).

As imagens da figura 21 permitem monitorar a internalização e a capacidade de direcionamento mitocondrial dos sistemas TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 10 kDa) de rácio N /P de 100. E pelas imagens (B), nas primeiras 4h após a transfeção os pontos verdes fluorescente das nanopartículas são bastante fracos sendo quase indetetáveis. Contudo, 6h após a transfeção nota-se um aumento significativo de pontos verdes fluorescentes comprovando assim a ocorrência da transfeção e internalização celular dos sistemas TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 10 kDa) de rácio N /P de 100 sendo a seguir direcionados à mitocôndria. E sendo alguns encontrados nos núcleos. Através da imagem (D), 6h após a transfeção consegue-se observar o acúmulo significativo das nanopartículas tanto nas mitocôndrias como no núcleo das células, o que demonstra que estes sistemas podem ser direcionados com sucesso para a mitocôndria, como também atravessar o núcleo.

A elevada capacidade de acumulação do pGFP nas mitocôndrias evidenciada por este deve-se ao fato do sistema possuir rácio N/P= 100 conferindo uma carga catiónica superficial maior e um tamanho reduzido quando comparado com o seu homólogo de menor rácio. Essas características contribuem para uma internalização celular em maior extensão e uma elevada especificidade de direcionamento mitocondrial.

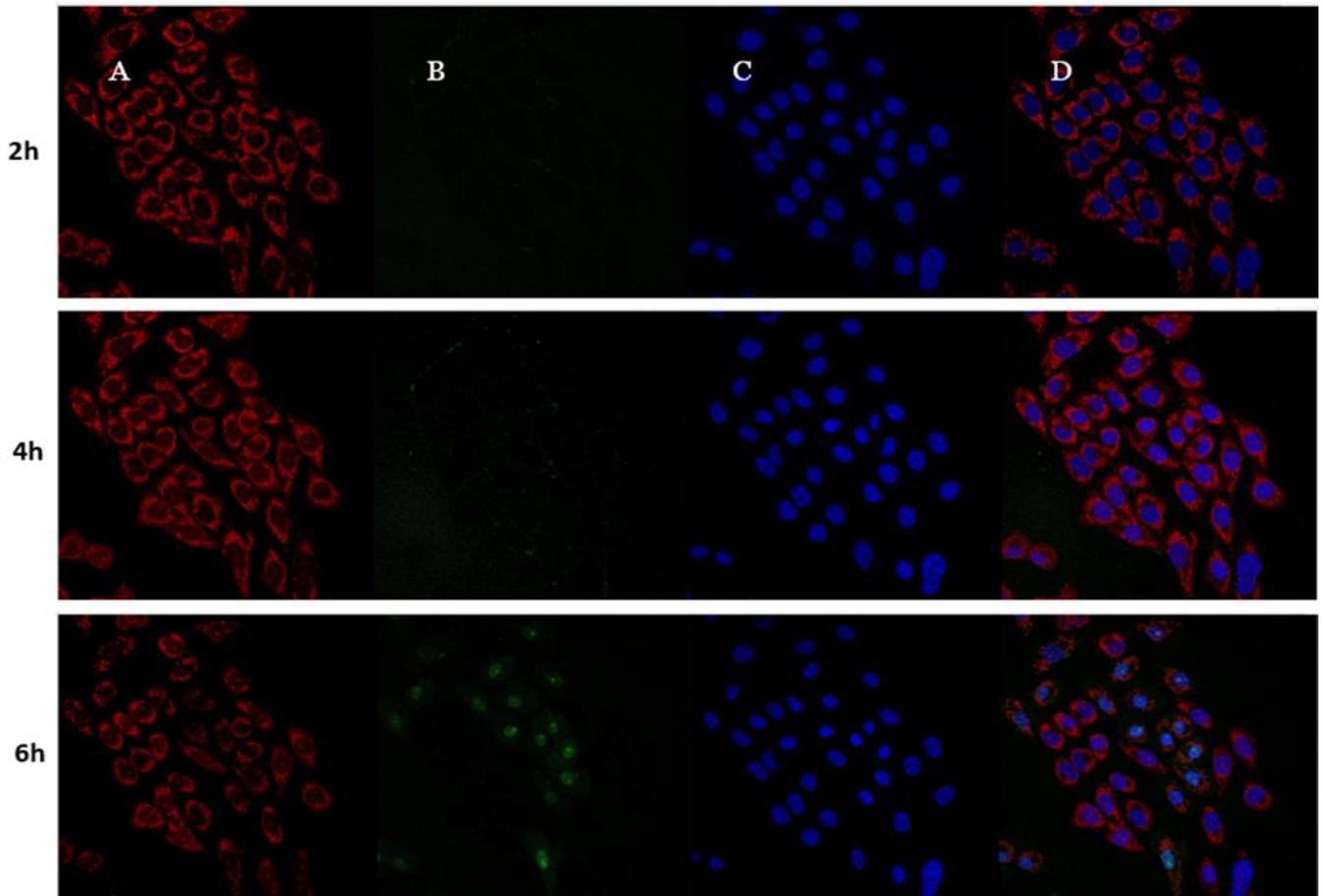


Figura 22 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização com a mitocôndria do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 25 kDa) N /P 50 investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D).

A capacidade de transfeção e direcionamento mitocondrial dos complexos TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI de 25 kDa) de rácio N/P = 50 encontra-se representado pela figura 22. E pela imagem (B) os pontos verdes fluorescentes correspondentes as nanopartículas marcadas com FITC nas primeiras 4h após a transfeção, são muito fracos sendo difíceis de identificar. Contudo, com aumento do tempo de transfeção, 6h, é possível detetar uma presença significativa de pontos verdes fluorescentes apresentando assim uma maior capacidade de penetração celular e direcionamento à mitocôndria. Na imagem (D), nota-se que maior parte das nanopartículas se encontram acumuladas no núcleo das células, isto pode ser indicado pela sobreposição dos núcleos corados a azul com DAPI e as nanopartículas de verde fluorescente. Essa forte evidência dos sistemas marcados com FITC neste organelo pode ser atribuído ao aumento do peso molecular do

polímero uma vez que a PEI de 25 kDa apresenta uma elevada eficiência de transfeção quando comparada com a de baixo peso molecular e demonstra que estes sistemas conseguiram acumular nas mitocôndrias e posteriormente nos núcleos.

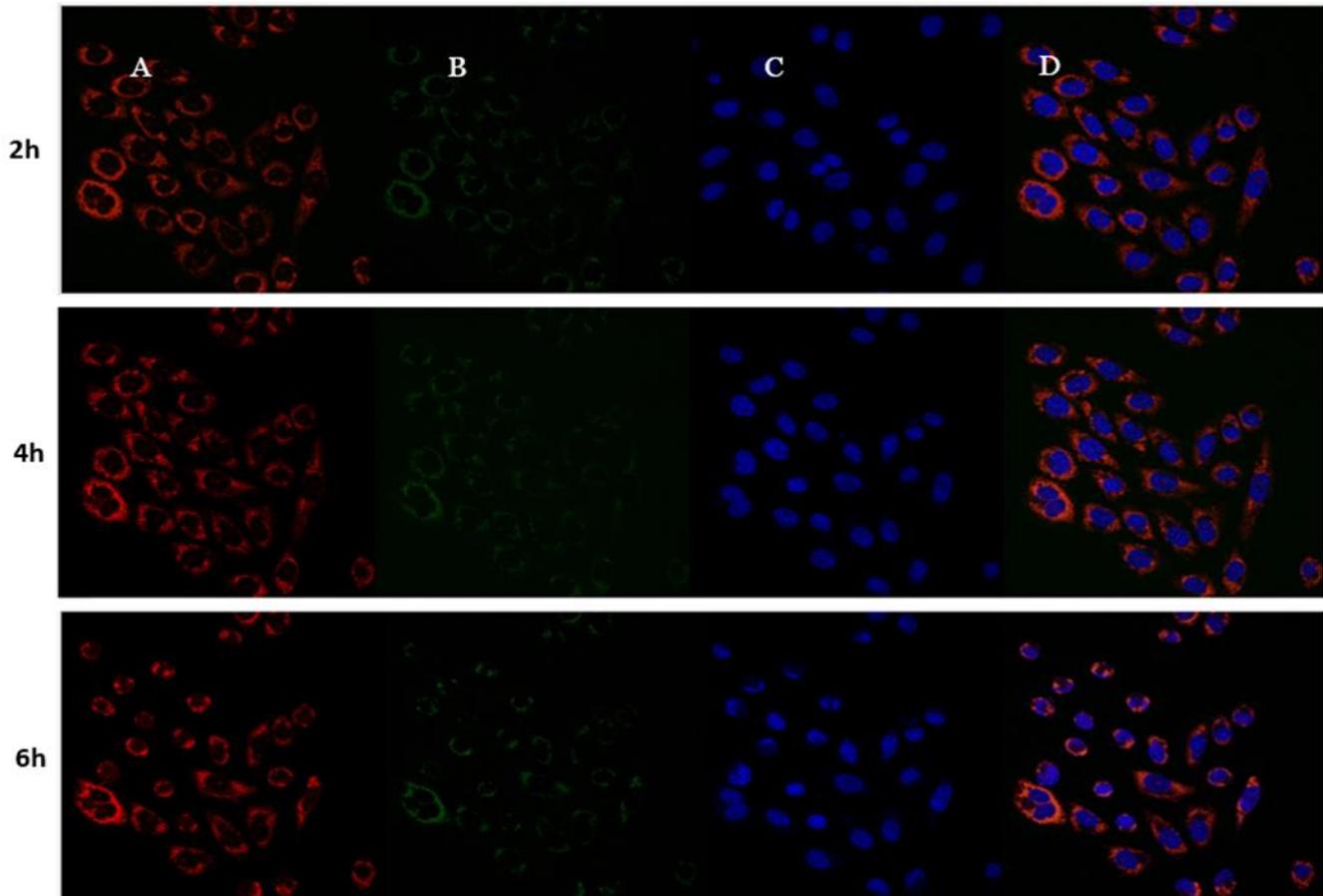


Figura 23 - Imagens relativas à capacidade de transfeção e co-localização com a mitocôndria do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 25 kDa) N /P 100 nas células HeLa, investigada por microscopia confocal de fluorescência após 2h, 4h e 6h de transfeção. Mitocôndrias marcadas a vermelho com MitoTracker Orange (A), as nanopartículas coradas a verde com FITC (B), os núcleos marcados a azul pela sonda DAPI (C) e a sobreposição de todas as imagens (D).

A figura 23 correspondente ao sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP (PEI 25 kDa) N /P 100 demonstraram também uma capacidade de internalização celular e direcionamento mitocondrial desses sistemas indicado pela presença de pontos verdes fluorescentes das

nanopartículas. Pela imagem (D) é possível evidenciar a acumulação dos sistemas nas mitocôndrias das células indicado pela cor laranja. Este sistema por possuir um tamanho bastante reduzido e o valor do potencial zeta próximo de 0 mV, favorece a sua internalização nas células pois partículas de menor tamanho e carga catiónica interagem facilmente com os proteoglicanos de carga negativas presentes na superfície celular. Apesar da presença das nanopartículas no interior das mitocôndrias não foi possível verificar o seu incremento ao longo das 6h de transfeção como visualizados tanto nos sistemas de PEI de 25 kDa como no de rácio N/P =100.

Em resumo, a elevada capacidade de transfeção do sistema TAT4/PEI-DQA /pGFP formulado com PEI de 10 kDa de rácio N/P =100 é confirmada pela presença de pontos verdes fluorescentes no interior das mitocôndrias após 6h de incubação. Isso indica a eficiente capacidade de condensação do plasmídeo pelos complexos de rácio N/P= 100, permitindo a síntese de sistemas à escala manométrica com afinidade às mitocôndrias.

No caso do sistema de PEI de 25 kDa de rácio N/P =50, a sua capacidade de transfeção aumentou significativamente ao longo tempo de incubação. Após 6h de incubação, foi observada uma presença bastante evidente de pontos verdes fluorescentes no interior das mitocôndrias, indicando a internalização das nanopartículas marcadas com FITC. No entanto, em relação ao mesmo sistema de rácio N/P= 100, embora tenha sido evidenciada a presença de pontos verdes fluorescentes no interior das mitocôndrias, não se verificou o aumento da capacidade de transfeção do sistema 6h após a incubação, indicado pela fraca presença de pontos verdes fluorescentes. Este resultado não segue totalmente o perfil descrito na literatura uma vez que sistemas com PEI de elevado peso molecular a rácios maiores tendem a apresentar uma elevada capacidade de transfeção (Faria et al., 2022). Contudo, as imagens comprovaram a capacidade de direcionamento dos sistemas desenvolvidos à mitocôndria.

A intensidade de fluorescência foi quantificada após 6h de transfeção mediada pelos vetores PEI-DQA (10 kDa ou 25 kDa) /TAT/pGFP, em razões N/P de 50 e 100. As células HeLa não transfetadas foram usadas como controlo negativo (K).

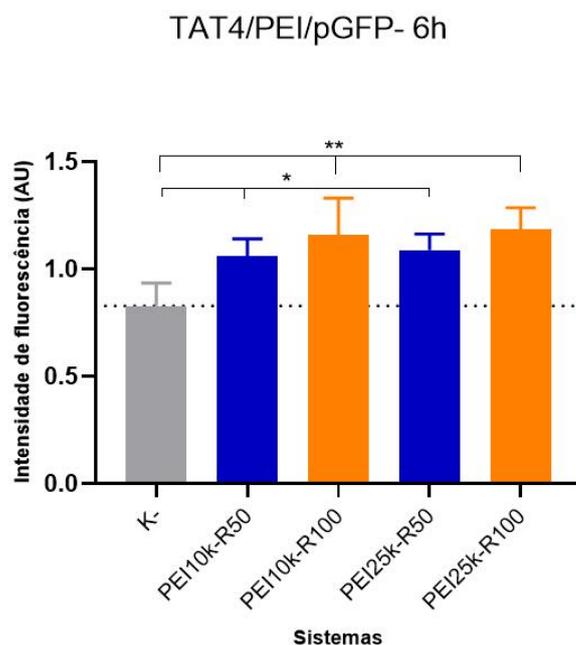


Figura 24 - Intensidade de fluorescência relativa do plasmídeo pGFP marcado com FITC dos sistemas TAT4/PEI-DQA/pGFP (PEI de 10 kDa e 25 kDa) formuladas a rácios N/P 50 e 100. A análise estatística foi elaborada recorrendo ao teste de “one-way ANOVA” de dados com $n = 4$. A significância estatística representada pelos asteriscos “***” e “**” tem um valor de $p = 0,0038$ e $p < 0,05$ respetivamente.

Pela análise do gráfico da figura 24, é notável um incremento da intensidade de fluorescência do pGFP-FITC com o aumento da razão N/P quando comparado com o controlo negativo. Os sistemas de maiores rácios N/P =100 demonstraram altos níveis de fluorescência de pGFP em relação aos sistemas de menores rácios N/P =50. No que se refere ao peso molecular do polímero, pela análise do gráfico consegue-se visualizar um ligeiro aumento da intensidade de fluorescência dos complexos formulados com PEI de 25 kDa quando comparados com os complexos de PEI de 10 kDa. Estes resultados indicam que a internalização celular dos sistemas desenvolvidos é influenciada pelo peso molecular de PEI considerado e pelo rácio N/P.

6 Conclusão e perspectivas futuras

A TGM surge como uma abordagem promissora para tratar as doenças mitocondriais associadas a mutações do ADNmt. Tem como finalidade a entrega do material genético nas mitocôndrias das células permitindo assim restabelecer o normal funcionamento da cadeia respiratória. O desenvolvimento de sistemas de entrega de genes com afinidade mitocondrial é uma etapa indispensável para o sucesso desta terapia.

Assim, neste trabalho de investigação desenvolvemos sistemas de entrega de um gene mitocondrial baseados em polímero PEI-DQA e péptido TAT que além de promoverem uma encapsulação/compleção eficiente de pDNA, permitiram a sua internalização celular e direcionamento mitocondrial sendo altamente biocompatíveis. Essas nanopartículas foram formuladas em várias razões N/P e a pesos moleculares do PEI diferentes com o intuito de avaliar a influência desses parâmetros na entrega do plasmídeo à mitocôndria. Pelos resultados obtidos verificamos que ambos os sistemas desenvolvidos PEI-DQA/pGFP como os TAT₄/PEI-DQA/pGFP são adequados para a encapsulação do plasmídeo. Os sistemas ternários baseados em polímeros e péptidos apresentaram uma morfologia esférica ou oval à escala manométrica, sendo que os sistemas preparados a PEI de 25 kDa e a razão N/P de 50 e 100 exibiram uma forma mais regular e condensada em relação aos sistemas formulados com PEI de 10 kDa de N/P= 20. Quanto ao tamanho e carga superficial, os sistemas TAT₄/PEI-DQA/pGFP revelaram tamanhos bastantes reduzidos e cargas superficiais próximas de 0 mV sendo que os complexos formulados com polímero PEI de 25 kDa a N/P =100 apresentaram um tamanho de 193 nm e uma carga superficial positiva de + 0,663 mV. A avaliação da citotoxicidade, demonstrou que os sistemas de maior peso molecular e a rácios maiores apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparadas com o controlo negativo após 24h de transfeção nas células HeLa. Após 48h todos os sistemas demonstraram biocompatibilidade em exceção do sistema com PEI de 25 kDa a rácio N/P= 100. Os complexos desenvolvidos conseguiram entregar o plasmídeo nas mitocôndrias das células demonstrando capacidade de transfeção celular e afinidade mitocondrial. Estes processos demonstraram ser influenciados pelo peso molecular do polímero e razão N/P.

Todos esses resultados indicaram que os sistemas ternários baseados em polímeros e péptidos podem ser usados como transportadores de plasmídeo para entrega à

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

mitocôndria. No entanto, estudos posteriores como, a quantificação da proteína GFP pela técnica de ELISA, avaliação da distribuição intracelular da proteína GFP e a verificação dos resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular das células HeLa, devem ser efetuados de modo a otimizar os sistemas desenvolvidos para promoção efetiva de expressão génica/proteica na mitocôndria, um passo essencial para avanços em TGM.

7 Referências bibliográficas

- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP, & Demeneix BA. (1996). A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther*, 7(16).
- Albuquerque, T., Faria, R., Sousa, Â., Neves, A. R., Queiroz, J. A., & Costa, D. (2020). Polymer-peptide ternary systems as a tool to improve the properties of plasmid DNA vectors in gene delivery. *Journal of Molecular Liquids*, 309.
- Anderson S., Bankier AT., Barrell BG., de Bruijn MH., Coulson AR., Drouin J., Eperon IC., Nierlich DP., Roe BA., Sanger F., Schreier PH., Smith AJ., Staden R., & Young IG. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457–465.
- Aravintha Siva, M., Mahalakshmi, R., Bhakta-Guha, D., & Guha, G. (2019). Gene therapy for the mitochondrial genome: Purging mutations, pacifying ailments. In *Mitochondrion*, 46, 195–208.
- Bennett, G. J., Doyle, T., & Salvemini, D. (2014). Mitotoxicity in distal symmetrical sensory peripheral neuropathies. *Nature Reviews Neurology*, 10(6), 326–336.
- Bergman, O., & Ben-Shachar, D. (2016). Mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) deficits in schizophrenia: Possible interactions with cellular processes. In *Canadian Journal of Psychiatry*, 61(8), 457–469.
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482.
- Bouzon, Z., Gargioni, R., & Ouriques, L. C. (2010). *Biologia Celular* (2ª). *BIOLOGIA/EAD/UFSC*.
- Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A., & Holt, I. J. (2003). Mammalian Mitochondrial DNA Replicates Bidirectionally from an Initiation Zone. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 50961–50969.

- Brito, J. da S. (2016). *Livro de ouro da medicina (I)*. Clube do autor.
- Camargo Barros, E. Y., Coneglian Barbosa, G., Franco Da Silveira, G., Costa Dearo, J. G., & Baraldi de Moraes, R. (2016). *A importância da proteína verde fluorescente (GFP) para o conhecimento do funcionamento do câncer*.
- Cardoso, A. M., Morais, C. M., Cruz, A. R., Cardoso, A. L., Silva, S. G., Do Vale, M. L., Marques, E. F., Pedroso De Lima, M. C., & Jurado, A. S. (2015). Gemini Surfactants Mediate Efficient Mitochondrial Gene Delivery and Expression. *Molecular Pharmaceutics*, 12(3), 716–730.
- Chaban, Y., Boekema, E. J., & Dudkina, N. V. (2014). Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. In *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1837(4), 418–426.
- Chan, D. C. (2006). Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. In *Cell*, 125(7), 1241–1252.
- Chiarini, E., Christina, T., & Penna, V. (2003). Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*. In *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39.
- Chinnery PF, Howell N, Lightowers RN, & Turnbull DM. (1998). Genetic Counseling and Prenatal Diagnosis for mtDNA Disease. *Am. J. Genet*, 1098–11.
- Chira, S., Jackson, C. S., Oprea, I., Ozturk, F., Pepper, M. S., Diaconu, I., Braicu, C., Raduly, L.-Z., Calin, G. A., & Berindan-Neagoe, I. (2015). Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors. In *Oncotarget*, 6(31), 30675–30703.
- Del Gaizo, V., MacKenzie, J. A., & Payne, R. M. (2003). Targeting proteins to mitochondria using TAT. *Molecular Genetics and Metabolism*, 80(1–2), 170–180.
- Deng, R., Yue, Y., Jin, F., Chen, Y., Kung, H.-F., Lin, M. C. M., & Wu, C. (2009). Revisit the complexation of PEI and DNA – How to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure? *Journal of Controlled Release*, 140(1), 40–46.

- Deshayes, S., Konate, K., Dussot, M., Chavey, B., Vaissière, A., Van, T. N. N., Aldrian, G., Padari, K., Pooga, M., Vivès, E., & Boisguérin, P. (2020). Deciphering the internalization mechanism of WRAP:siRNA nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1862(6).
- Dong, S., Zhou, X., & Yang, J. (2016). TAT modified and lipid – PEI hybrid nanoparticles for co-delivery of docetaxel and pDNA. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 954–961.
- D’Souza, G. G. M., Boddapati, S. V., & Weissig, V. (2005). Mitochondrial leader sequence-plasmid DNA conjugates delivered into mammalian cells by DQAsomes co-localize with mitochondria. *Mitochondrion*, 5(5), 352–358.
- D’Souza, G. G. M., Rammohan, R., Cheng, S. M., Torchilin, V. P., & Weissig, V. (2003). DQAsome-mediated delivery of plasmid DNA toward mitochondria in living cells. *Journal of Controlled Release*, 92(1–2), 189–197.
- Faria, R., Paul, M., Biswas, S., Vivès, E., Boisguérin, P., Sousa, Â., & Costa, D. (2022). Peptides vs. Polymers: Searching for the Most Efficient Delivery System for Mitochondrial Gene Therapy. *Pharmaceutics*, 14(4).
- Faria, R., Sousa, Â., Neves, A. R., Queiroz, J. A., & Costa, D. (2019). Methotrexate-plasmid DNA polyplexes for cancer therapy: Characterization, cancer cell targeting ability and tuned in vitro transfection. *Journal of Molecular Liquids*, 292.
- Faria, R., Vivès, E., Boisguérin, P., Sousa, A., & Costa, D. (2021). Development of peptide-based nanoparticles for mitochondrial plasmid DNA delivery. *Polymers*, 13(11).
- Fontana, G. A., & Gahlon, H. L. (2020). Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation. In *Nucleic Acids Research*, 48(20), 11244–11258.
- Fortune, J. A. (2010). Specific and efficient in vivo delivery of DNA and siRNA by polyethylenimine and its derivatives-Doctoral Thesis. Massachusetts Institute of Technology.
- Fraga, A. G. de, & Lazzari, V. M. (2021). Técnicas de substituição de DNA mitocondrial para reduzir a transmissão da Síndrome de Leigh. *Clinical & Biomedical Research*, 41(1), 65-74.

- Franz, J., Lelle, M., Peneva, K., Bonn, M., & Weidner, T. (2016). SAP(E) - A cell-penetrating polyproline helix at lipid interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1858(9), 2028–2034.
- Giacca, M. (2010). Introduction to Gene Therapy. In *Gene Therapy* (pp. 1–7).
- Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770–776.
- Ibraheem, D., Elaissari, A., & Fessi, H. (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. In *International Journal of Pharmaceutics*, 459(1–2), 70–83.
- Inagaki, Y., Ehara, M., Watanabe, K. I., Hayashi-Ishimaru, Y., & Ohama, T. (1998). Directionally Evolving Genetic Code: The UGA Codon from Stop to Tryptophan in Mitochondria. In *J Mol Evol*, 47(4), 378–384.
- Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2011). Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. In *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1807(6)735–745.
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y., & He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. In *Theranostics*, 4(3), 240–255.
- Kasiviswanathan, R., Collins, T. R. L., & Copeland, W. C. (2012). The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9–10), 970–978.
- Kelvisong. (2013). *Diagrama de uma mitocôndria com partes*. Wikimedia Commons.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. In *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 333–343.
- Kowaltowski, A. J., Menezes-Filho, S. L., Abreu, P., Nolasco, P., Assali, E., Gonçalves, I. G., Miller, N., Laurindo, F. R. M., Bruni-Cardoso, A., & Shirihai, O. (2019). Mitochondrial Morphology Regulates Organellar Ca²⁺ Uptake and Changes Cellular Ca²⁺ Homeostasis. *FASEB J*, 33(12), 13176–13188.

- Kresina, T. F. (2004). An introduction to molecular medicine and gene therapy (4^aed). John Wiley and Sons.
- Loureiro, A. P. C. (2016). Vetores não virais com aplicação na terapia génica: Os poliplexos. *Repositório científico da Universidade de Coimbra*.
- Lungwitz, U., Breunig, M., Blunk, T., & Göpferich, A. (2005). Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 247–266.
- Lyrawati, D., Trounson, A., & Cram, D. (2011). Expression of GFP in the mitochondrial compartment using DQAsome-mediated delivery of an artificial mini-mitochondrial genome. *Pharmaceutical Research*, 28(11), 2848–2862.
- Mallick, S., Song, S. J., Bae, Y., & Choi, J. S. (2019). Self-assembled nanoparticles composed of glycol chitosan-dequalinium for mitochondria-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 451–460.
- Martin, L. J. (2012). Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 107, 355–415.
- Martinou, J. C., & Youle, R. J. (2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. In *Developmental Cell*, 21(1), 92–101.
- Martins Pereira, G. (2014). TERAPIA GÉNICA: CONCEITOS E APLICAÇÕES NA MEDICINA DENTÁRIA-Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Mckinney, E. A., & Oliveira, M. T. (2013). Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet Mol Biol*, 36(3), 308-3015
- Michael, F., & Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. In *Cell Biology*, 94.
- Michikawa, Y., Hofhaus, G., Lerman, L. S., & Attardi, G. (1997). Comprehensive, rapid and sensitive detection of sequence variants of human mitochondrial tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, 25(12), 2455-2463.

- Neves, A. R., Albuquerque, T., Faria, R., Paul, M., Biswas, S., Sousa, Â., & Costa, D. (2021). Development of tailor-made dendrimer ternary complexes for drug/gene co-delivery in cancer. *Pharmaceutics*, 13(8), 1256.
- Neves, A. R., Sousa, A., Faria, R., Albuquerque, T., Queiroz, J. A., & Costa, D. (2020). Cancer gene therapy mediated by RALA/plasmid DNA vectors: Nitrogen to phosphate groups ratio (N/P) as a tool for tunable transfection efficiency and apoptosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110610.
- Nikitenko, N. A., & Prassolov, V. S. (2013). Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta Naturae*, 5(3), 35–53.
- Oliveira, B. de A., França, E. dos S., Souza, V. G., Vallinoto, A. C. R., & Silva, A. N. M. R. da. (2018). Vetores virais para uso em terapia gênica. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 9(2).
- Orrenius S, & Nicotera P. (1993). The calcium ion and cell death. *J Neural Transm Suppl.*, 43, 1–11.
- Parveen, S., Misra, R., & Sahoo, S. K. (2012). Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(2), 147–166.
- PF Chinnery, & DM Turnbull. (1997). Editorial Clinical features, investigation, and management of patients with defects of mitochondrial DNA. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63(5), 559–563.
- Pfeffer, G., Majamaa, K., Turnbull, D. M., Thorburn, D., & Chinnery, P. F. (2012). Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2012(4).
- Poulton, J., Macaulay, V., & Marchington, D. R. (1998). Mitochondrial genetics '98 is the bottleneck cracked? In *Am. J. Hum. Genet*, 62(4), 752-757.
- Quinlan, C. L., Perevoshchikova, I. V., Hey-Mogensen, M., Orr, A. L., & Brand, M. D. (2013). Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. *Redox Biology*, 1(1), 304–312.

- Roy, I., Stachowiak, M. K., & Bergey, E. J. (2008). Nonviral gene transfection nanoparticles: function and applications in the brain. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(2), 89–97.
- Ruseska, I., & Zimmer, A. (2020). Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 101–123.
- Russell, O. M., Gorman, G. S., Lightowers, R. N., & Turnbull, D. M. (2020). Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. In *Cell*, 181(1), 168–188. Cell Press.
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 20–31.
- Salvado, R., Sousa, F., Queiroz, J., & Costa, D. (2015). Development of mitochondrial targeting plasmid DNA nanoparticles: Characterization and in vitro studies. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480, 287–295.
- Shokolenko, I. N. (2014). Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update. *World Journal of Experimental Medicine*, 4(4), 46.
- Silva, A. A. da, & Gonçalves, R. C. (2010). Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, 40, 994–1002.
- Silva da Franca, T. (2019). Organelas Transdutoras de Energia: Mitocôndria – Respiração. *Moodle USP*.
- Tavares Da Silva, L. A. (2014). *Síntese de Péptidos Antimicrobianos e Penetradores Celulares*-Dissertação de mestrado. Universidade do Porto.
- Taylor, R. W., & Turnbull, D. M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. In *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 389–402.
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, Suppl 2, S81-91.

- Tucker, E. J., Compton, A. G., & Thorburn, D. R. (2010). Recent advances in the genetics of mitochondrial encephalopathies. In *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 10(4), 277–285.
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. In *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1797, (2), 113–128.
- Vasconcelos, A. C. (2000). *Patologia Geral em Hipertexto*. Minas Gerais.
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. In *Annual Review of Genetics*, 39, 359–407.
- Wang, Y., Hu, L. F., Zhou, T. J., Qi, L. Y., Xing, L., Lee, J., Wang, F. Z., Oh, Y. K., & Jiang, H. L. (2021). Gene therapy strategies for rare monogenic disorders with nuclear or mitochondrial gene mutations. In *Biomaterials*, 277, 121108.
- Wang, Z., Guo, W., Kuang, X., Hou, S., & Liu, H. (2017). Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective. In *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 498–508.
- Wonnapijit, P., Chinnery, P. F., & Samuels, D. C. (2008). The Distribution of Mitochondrial DNA Heteroplasmy Due to Random Genetic Drift. *American Journal of Human Genetics*, 83(5), 582–593.
- Xiao, J. (2009). Single-molecule imaging in living cells. In P. Hinterdorfer & Van Oijen A. (Eds.), *Handbook of single-molecule biophysics* (pp. 46–84). Springer.
- Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T. J., Yang, M. Y., Bowmaker, M., Jacobs, H. T., & Holt, I. J. (2006). Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO Journal*, 25(22), 5358–5371.
- Yasuzaki, Y., Yamada, Y., & Harashima, H. (2010). Mitochondrial matrix delivery using MITO-Porter, a liposome-based carrier that specifies fusion with mitochondrial membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(2), 181–186.

Desenvolvimento de vetores baseados em péptidos para direcionamento à mitocôndria.

Ziegler, A., & Seelig, J. (2004). Interaction of the Protein Transduction Domain of HIV-1 TAT with Heparan Sulfate: Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters. In *Biophysical Journal*, 86 (1 Pt 1), 254-263.