



David José Fonseca Fontinha

Licenciatura em Biologia Celular e Molecular

**Combinação de lipossomas e nanopartículas
de ouro para silenciamento génico**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutor Pedro V. Baptista, Prof. Catedrático, FCT NOVA

Júri:

Presidente: Professora Doutora Isabel Maria
Godinho de Sá Nogueira

Arguente: Professor Doutor Pedro
Manuel Broa Costa

Vogal: Professor Doutor Pedro Miguel
Ribeiro Viana Baptista

Combinação de lipossomas e nanopartículas de ouro para silenciamento génico

Copyright © David José Fonseca Fontinha, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

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

Agradecimentos

Primeiramente, sinto uma tremenda obrigatoriedade em agradecer ao meu orientador, o Professor Dr. Pedro Viana Baptista, por me ter dado a oportunidade de participar neste projeto e pelo acompanhamento que ofereceu no decorrer do mesmo, juntamente com a chance de participar na escrita de um artigo científico, coisa que no início do meu percurso não esperava fazer. Adicionalmente, gostaria de agradecer ao professor por toda a sua ajuda, compreensão e mentoria, tanto a nível académico como a nível pessoal. Um muito obrigado por me ajudar a crescer enquanto aluno, investigador e pessoa, e por ser o exemplo daquilo que um dia almejo alcançar.

Seguidamente, expresso a minha gratidão perante o Dr. Bruno Veigas, que foi um agente fundamental na minha integração e adaptação ao laboratório. Um muito obrigado por todas as conversas e pelas altas expectativas e confiança que me atribuíste, o que aconteceu como resultado de teres visto potencial e acreditado em mim. Deixo também os meus agradecimentos à Dr^a Catarina Roma-Rodrigues e ao Dr. Luís Raposo pelo suporte, pela paciência, por ajudarem qualquer pessoa no necessário e por terem conseguido coordenar o laboratório em alturas tão pouco convencionais, o que não deve ter sido nada fácil.

Dedico um grande obrigado à Professora Dr^a Alexandra Fernandes e a todos os membros (passageiros ou não) dos laboratórios *Nanomedicine* e *Human Genetics and Cancer Therapeutics* por terem feito parte desta etapa e participado no meu processo de aprendizagem de uma forma ou de outra. Em particular, gostaria de expressar a minha gratidão perante a Daniela Ferreira, por ser um símbolo e exemplo de trabalho e sacrifício, e a Catarina Martins, cuja positividade e otimismo acabavam por equilibrar muitas vezes com o meu ceticismo “cru e frio”.

Aproveito assim, como não poderia deixar de ser, para agradecer a todos aqueles que durante uns tempos “mais felizes” e muitos outros “menos felizes” se mantiveram a meu lado. Obrigado por serem meus amigos, na definição mais fundamental da palavra. A todos os meus companheiros na anTUNiA, obrigado por serem uma fonte de boa disposição e escape sempre que mais precisei. Destes últimos, deixo uma menção honrosa ao Gonçalo Rolo e ao “recém dinamarquês” João da Silva, por saberem melhor que ninguém o que é que a casa gasta. Ao Oliviu, este tem sido o teu ano, mas por todos os motivos errados... és uma pessoa incrível, com um enorme carácter e futuro, e sei que vais conseguir alcançar tudo o que desejares. À Mafalda, és das melhores pessoas que conheço e uma amiga impecável, que nunca se esquece de enviar uma mensagem (mesmo ao fim de meses sem contacto) só para saber se eu ainda estou vivo (agradecido minha cara). Ao Gonçalo, são muitos anos a virar frangos não é verdade? Já lá vão 17 anos de

uma camaradagem inesperada que nem sei como agradecer, não tenho palavras! Acho que apenas me resta dizer: “Obrigado por existires”.

À minha família, todos nós sabemos o quão difíceis têm sido os últimos meses. Os inúmeros problemas que surgem, a sensação que nunca fica tudo bem, os sustos de saúde de entes-queridos, os imprevistos, o lidar com o desespero cotidiano da ignorância geral... Este ano tem sido repleto de uma falta de segurança e de uma ansiedade enorme que não tarda em passar. No entanto, entre todas as adversidades, alguns raios de sol conseguem passar por entre as brechas deste céu encoberto e algumas etapas são concretizadas. Esta é apenas mais uma, cujo “triunfo” não era possível sem vós. À minha mãe, gostaria de lembrar o exemplo de ser humano e humildade que é, uma pessoa que todos os dias tenta ser melhor que no dia anterior a todos os níveis, que aprendeu a perdoar, e que desenvolveu a capacidade rara e invejável de descobrir felicidade nas pequenas coisas. Ao meu pai, dedico uma enorme gratidão, pois sempre foi uma demonstração de trabalho árduo, anos de sacrifício e de uma leveza muito necessária em alturas importantes, capaz de rir e fazer sorrir em qualquer ocasião, por mais cinzentos que estejam os dias. Ao meu irmão, parceiro de uma vida inteira, tenho a dizer que ficarei eternamente grato por toda a proteção, por toda a partilha, por todos os momentos que passaram e passarão, pelo teu coração do tamanho do mundo e por estares sempre a meu lado, não podia pedir mais e espero um dia ser tão bom irmão quanto tu és.

Por fim, tenho de agradecer, do fundo do meu coração, à pessoa que mais me acompanha e que mais de perto vê toda a minha essência. À pessoa que me tem acompanhado nesta montanha-russa com mais baixos que altos, que me consola, que me empurra para a frente em alturas quando nem eu próprio tenho vontade de andar, que tem sido a minha luz no fundo do túnel e que me faz ter esperança num futuro melhor. Muito obrigado Cristiana, muito obrigado meu amor.

Resumo

As doenças oncológicas representam atualmente a segunda maior causa de morte a nível global, sendo o aumento progressivo do número de mortes anuais ao longo do tempo um evento expectável. Apesar do contínuo e necessário estudo do cancro, a variabilidade e capacidade de adaptação deste grupo de doenças demonstra desafiar os métodos de terapia tradicionais. Como tal, o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos apresenta uma enorme importância.

A nanotecnologia e a sua aplicação na medicina, com ênfase no tratamento do cancro, oferece vantagens inauditas relativamente aos métodos terapêuticos tradicionais. As plataformas de nanomedicina permitem potenciar novos tipos de estratégias para o tratamento e controlo do cancro, como é o caso de técnicas de terapia genética, com foco no silenciamento génico. As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm demonstrado a sua capacidade como ferramentas de diagnóstico dadas as características da sua superfície e as suas propriedades óticas únicas. Os lipossomas, para além poderem apresentar composições e modificações personalizáveis, têm demonstrado uma elevada eficiência na entrega de diferentes cargas terapêuticas. Atualmente, o uso AuNPs e lipossomas como vetores de entrega de ácidos nucleicos terapêuticos (TNAs) para silenciamento génico tem sido estudado.

Neste trabalho, AuNPs funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) e ssDNA (*single strand DNA*) foram combinadas com diferentes formulações lipossomais (formulação J e formulação M), com o intuito de estudar a capacidade de silenciamento do oncogene *c-MYC* por parte dos complexos obtidos em células da linhagem HCT116 (cancro colorretal), juntamente com o impacto que os diferentes nanoconjugados e complexos apresentam no *uptake* e na viabilidade celular.

Os estudos realizados apontam a formulação J1 como tendo uma eficiente capacidade de silenciamento para um período de incubação de 6h, apesar de apresentar menores valores de *uptake* celular e menor impacto na viabilidade celular quando comparada com o uso de AuNP@PEG@MYC para o mesmo período de incubação.

Palavras-chave: cancro, nanopartículas de ouro, silenciamento génico, lipossomas, complexos lipossomais, células HCT116.

Abstract

Oncological diseases currently represent the second leading cause of death globally, with the progressive increase in annual deaths over time being an expected event. Despite the continuous and necessary study of cancer, the variability and adaptability of this group of diseases demonstrates that they challenge traditional methods of therapy. As such, the development of new therapeutic methods is of great importance.

Nanotechnology and its application in medicine, with an emphasis on cancer treatment, offers unprecedented advantages over traditional therapeutic methods. Nanomedicine platforms enable new types of strategies for cancer treatment and control, such as gene therapy techniques, with a focus on gene silencing. Gold nanoparticles (AuNPs) have demonstrated their capacity as theragnostic tools given their surface characteristics and unique optical properties. Liposomes, besides being able to present customizable compositions and modifications, have demonstrated a high efficiency in the delivery of different therapeutic loads. Currently, the use of AuNPs and liposomes as delivery vectors for therapeutic nucleic acids (TNAs) for gene silencing has been studied.

In this work, AuNPs functionalized with polyethylene glycol (PEG) and ssDNA (single strand DNA) have been combined with different liposomal formulations (formulation J and formulation M) in order to study the silencing capacity of *c-MYC* oncogene by the complexes obtained in HCT116 cells (colorectal cancer), as well as the impact of the different nanoconjugates and complexes on cell uptake and cell viability.

This research has shown that the J1 formulation has an efficient silencing capability for a 6h incubation period, although it has lower cell uptake values and less impact on cell viability when compared to the use of AuNP@PEG@MYC for the same incubation period.

Keywords: cancer, gold nanoparticles, gene silencing, liposomes, Au-liposome complex, HCT116 cells.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CANCRO.....	1
1.1.1. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS TUMORAIS	3
1.1.2. DIAGNÓSTICO DO CANCRO	12
1.1.3. TRATAMENTO.....	14
1.1.3.1. <i>Terapia Genética em Cancro</i>	15
1.1.3.2. <i>Terapia Combinatória no Tratamento de Cancro</i>	22
1.2. NANOMEDICINA E CANCRO.....	23
1.2.1. PLATAFORMAS NANOTECNOLÓGICAS E TERAPIA GENÉTICA	29
1.2.1.1. <i>Formulações Lipossomais</i>	33
1.2.1.2. <i>Nanopartículas de Ouro</i>	35
1.2.2. COMBINAÇÃO DE LIPOSSOMAS E NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	39
1.3. CONTEXTO E OBJETIVOS.....	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCONJUGADOS DE OURO.....	43
2.1.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	43
2.1.2. FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	44
2.1.3. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCONJUGADOS DE OURO	45
2.2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCONJUGADOS LIPÍDICOS	46
2.2.1. COMBINAÇÃO DOS NANOCONJUGADOS DE OURO COM LIPOSSOMAS.....	46
2.2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCONJUGADOS LIPÍDICOS.....	47
2.3. CULTURA CELULAR	48
2.4. <i>CHALLENGE</i> COM DIFERENTES NANOCONJUGADOS	49
2.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GENÉTICA	50

2.6. VERIFICAÇÃO DO <i>UPTAKE</i> CELULAR DOS DIFERENTES NANOCONJUGADOS E FORMULAÇÕES	51
2.6.1. FRACIONAMENTO POR ESPETROSCOPIA UV-VISÍVEL.....	51
2.6.2. QUANTIFICAÇÃO DE OURO POR ICP-MS.....	52
2.7. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCONJUGADOS PARA SILENCIAMENTO GENÉTICO	56
3.2. INCORPORAÇÃO DE NANOCONJUGADOS EM LIPOSSOMAS E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	61
3.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>c-MYC</i> EM CÉLULAS DA LINHAGEM CELULAR HCT116 INCUBADAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES NANOCONJUGADOS.....	64
3.4. ANÁLISE DO <i>UPTAKE</i> DE NANOCONJUGADOS DE OURO	66
3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	67
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	69
5. BIBLIOGRAFIA	73

Lista de Figuras

- Figura 1.1** – Distribuição da incidência e mortalidade em percentagem para os 10 tipos de cancro mais comuns em 2018, relativamente aos novos casos e número de mortos registados nesse ano (adaptado de *GLOBOCAN, 2018*)³ 1
- Figura 1.2** – Representação das características fundamentais e adquiridas pelas células cancerígenas propostas por Hanahan e Weinberg (adaptado de *Hanahan and Weinberg, 2011*)⁸ 4
- Figura 1.3** – Representação esquemática de diferentes tipos de complexos formados pela combinação de AuNPs e lipossomas. (A) Encapsulação de AuNPs em lipossomas; (B) Incorporação de AuNPs nas membranas dos lipossomas; (C) Conjugação de AuNPs na superfície dos lipossomas. (Adaptado de *Kojima et al. 2008*)¹⁸⁷ 40
- Figura 2.1** – Exemplo de distribuição do *seeding* das células da linhagem HCT116 em placas de 24 poços (à esquerda) (volume final de 500 µL por poço) e em placas de 96 poços (à direita) (volume final de 100 µL por poço). Os círculos vermelhos representam poços contendo células e meio cultura (DMEM) e as linhas azuis representam poços que contém água, para evitar perda de volume nos poços primários. 49
- Figura 3.1.A** - Espectros de absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente (nm) dos diferentes nanoconjugados. As setas indicam o pico de SPR das diferentes AuNPs, evidenciando o desvio existente 56
- Figura 3.1.B** - Representação gráfica da derivada da média móvel dos valores de absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente (nm) dos diferentes nanoconjugados. 57
- Figura 3.2** - Reta de calibração elaborada a partir de dados teóricos e empíricos apresentados por Haiss *et al.*, que relaciona o diâmetro de nanopartículas de ouro esféricas (nm) com a razão entre a absorvância das mesmas correspondente ao seu pico de SPR e a absorvância destas a 450 nm. 58
- Figura 3.3** - Distribuição do tamanho dos vários nanoconjugados. Representação gráfica da frequência de nanopartículas observadas (em percentagem) em função do diâmetro das mesmas (nm)... 60
- Figura 3.4** - Espectros de absorvância das formulações J1 e M1. As formulações J0 e M0 foram usadas como branco na medição dos espectros, respetivamente. 63
- Figura 3.5** - Silenciamento génico do gene *c-MYC* em células da linhagem celular HCT116. O gráfico representa a expressão relativa de mRNA após incubação das células HCT116 com 0.6 nM de AuNP@PEG@MYC (correspondendo a 36 nM de oligonucleótido), 1.7 nM de formulação J1 (correspondendo a 29.7 nM de oligonucleótido) e 1.2 nM de formulação M1 (correspondendo a 37.2 nM de oligonucleótido). Os dados foram normalizados ao gene de controlo 18S e depois às células expostas a AuNP@PEG. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão dos valores obtidos em três medições independentes de cada população correspondente a cada *time-point*. Não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes condições experimentais (Student's *t*-test, *p*-value > 0.05)... 65
- Figura 3.6.** – Percentagem de AuNPs internalizadas por células da linhagem HCT116 após incubação com os diferentes nanoconjugados e formulações descritas por um período de 6h. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão dos valores obtidos em três medições independentes de cada população. Foi realizada a análise estatística dos dados obtidos por aplicação de Student's *t*-test entre as diferentes condições e o controlo (AuNP@PEG), sendo o *p*-value > 0.05 em todos os casos e, conseqüentemente, os resultados não são considerados estatisticamente significativos. 66
- Figura 3.7** – Viabilidade celular, em percentagem, de células da linhagem HCT116 após realizado *challenge* com um tempo de incubação de 6h. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão dos valores obtidos em três medições independentes de cada população. Foi realizada a análise estatística dos dados obtidos através da aplicação de Student's *t*-test entre as diferentes condições e o controlo (AuNP@PEG), sendo o *p*-value > 0.05 em todos os casos e, conseqüentemente, os resultados não são considerados estatisticamente significativos. 67

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Descrição de ferramentas de terapia genética aplicadas ao tratamento do cancro (adaptado de <i>Ferreira et al, 2020</i>).....	18
Tabela 1.1 - Descrição de ferramentas de terapia genética aplicadas ao tratamento do cancro (adaptado de <i>Ferreira et al, 2020</i>) (continuação).....	19
Tabela 1.2 - Visão geral de ferramentas de edição genética presentes em ensaios clínicos (adaptado de <i>Ferreira et al, 2020</i>).....	20
Tabela 1.2 - Visão geral de ferramentas de edição genética presentes em ensaios clínicos (adaptado de <i>Ferreira et al, 2020</i>) (continuação).....	21
Tabela 1.3 - Tipos de nanopartículas (NPs) usadas como <i>nanocarriers</i> na terapia do cancro e em terapia genética (adaptado de <i>Ferreira et al,2020</i>).....	31
Tabela 1.3 - Tipos de nanopartículas (NPs) usadas como <i>nanocarriers</i> na terapia do cancro e em terapia genética (adaptado de <i>Ferreira et al,2020</i>) (continuação).....	32
Tabela 3.1 - Valores de comprimento de onda correspondente ao pico de SPR, diâmetro aproximado e concentração em suspensão dos diferentes nanoconjugados.....	59
Tabela 3.2 - Valores de Z-average (nm), índice de polidispersividade (PI) e Potencial Zeta referentes aos diferentes nanoconjugados. Os valores representados foram calculados fazendo a média de pelo menos três medições independentes e o respetivo desvio-padrão (com exceção da medição de Potencial Zeta que apenas foi possível ser realizada uma vez).....	60
Tabela 3.3 - Valores de concentração final de lípido ($\mu\text{mol/mL}$), diâmetro médio das partículas (nm) e índice de polidispersividade (PI) das populações analisadas referentes às diferentes formulações lipossomais, vazias e conjugadas com nanoconjugados de ouro.	61
Tabela 3.4 - Valores de número total de lípidos por lipossoma, número de partículas lipídicas por mL de suspensão, concentração de partículas lipídicas em suspensão, concentração de nanoconjugados de ouro e a proporção destes em relação ao número de partículas lipídicas referentes a cada formulação. ...	62

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.

AAV – *adeno associated virus*

Abs – absorbância

AgNP – nanopartícula de prata

ALT – *alternative lengthening of telomeres*

ASOs – oligonucleótidos antisense

Au-lipossoma – lipossoma combinado com nanopartículas de ouro

AuNP – nanopartícula de ouro

AuNP@PEG – nanopartícula de ouro funcionalizada com polietilenoglicol

AuNP@PEG@MYC – nanopartícula de ouro funcionalizada com polietilenoglicol e oligonucleótido ssDNA antisense de *c-MYC*

CRISPR – *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

Ct – *Threshold cycle*

DEPC – dietilpirocarbonato

DLS – *dynamic light scattering*

DMEM – *Dulbecco's modified Eagle medium*

DOTAP – 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano

DOPC – dioleoil fosfatidilcolina

DOPE – dioleoil fosfatidiletanolamina

DPPC – dipalmitoilfosfatidilcolina

DRVs – *dried reconstituted vesicles*

DSPC – 1,2-distearoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DSPE-PEG – 1,2-distearoil-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)]

DTT – ditioneitol

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMT – *epithelial-mesenchymal transition*

EPR – *enhanced permeability and retention*

FBS – *fetal bovine serum*

GUVs – *giant unilamellar vesicles*

HCT116 – linhagem celular de cancro colorretal humano

ICP-MS – *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

IONs – nanopartículas de óxido de ferro

LUVs – *large unilamellar vesicles*

MET – *mesenchymal-epithelial transition*

MLVs – *multilamellar vesicles*
MNP – Nanopartícula magnética
MRI – *magnetic resonance imaging*
MTS – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazólio]
NK – *Natural Killer*
NP – nanopartícula
PBS – *phosphate buffer saline*
PC – fosfatidilcolina
PCR - *polymerase chain reaction*
PE – fosfatidiletanolamina
PEG – polietilenoglicol
PEI – polietilenoimina
PET – tomografia por emissão de positrões
PG – polipropilenoglicol
PS – fosfatidilserina
PTT – *photothermal therapy*
qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*
RISC – *RNA-induced silencing complex*
RNAi – RNA de interferência
SERS – *surface enhanced Raman spectroscopy*
SLNs – *solid lipid nanoparticles*
SM – esfingomiéline
SNALPs – *stable nucleic acid-lipid particles*
SPIONs – nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas
SPR – *surface plasmon resonance*
SUVs – *small unilamellar vesicles*
TAC – tomografia axial computadorizada
TALENs – *transcription activator-like effector nucleases*
TNA – *therapeutic nucleic acid*
TSP – trombospondina
UV-Vis – ultravioleta-visível
VEGF – *vascular endothelial growth factor*
WHO – “World Health Organization”
ZFNs – *zinc finger nucleases*

1. Introdução

1.1. Cancro

Cancro é a denominação de um grupo de doenças nas quais um conjunto de células prolifera descontroladamente, geralmente através do desajuste de mecanismos moleculares de regulação celular e promoção da invasão de tecidos, alteração das condições metabólicas e fisiológicas locais podendo, numa fase mais tardia e providenciadas condições adequadas, ser capaz de disseminação ao longo do organismo inteiro e colonização de diferentes tecidos e órgãos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2018 foram registados 17 milhões de novos casos de cancro, sendo a segunda maior causa de morte no mundo e responsável por aproximadamente 9,6 milhões de mortes a nível global¹. O cancro do pulmão, da mama e colorretal apresentam-se com maior incidência, sendo o primeiro a principal causa de morte relacionada com o cancro^{2,3} (Figura 1.1).

Esta doença deriva de fatores genéticos, diversos agentes externos e da idade do indivíduo, sendo que alguns comportamentos também representam fatores de risco. A deteção antecipada do cancro permite um tratamento mais eficaz e, conseqüentemente, a redução da mortalidade da doença¹.

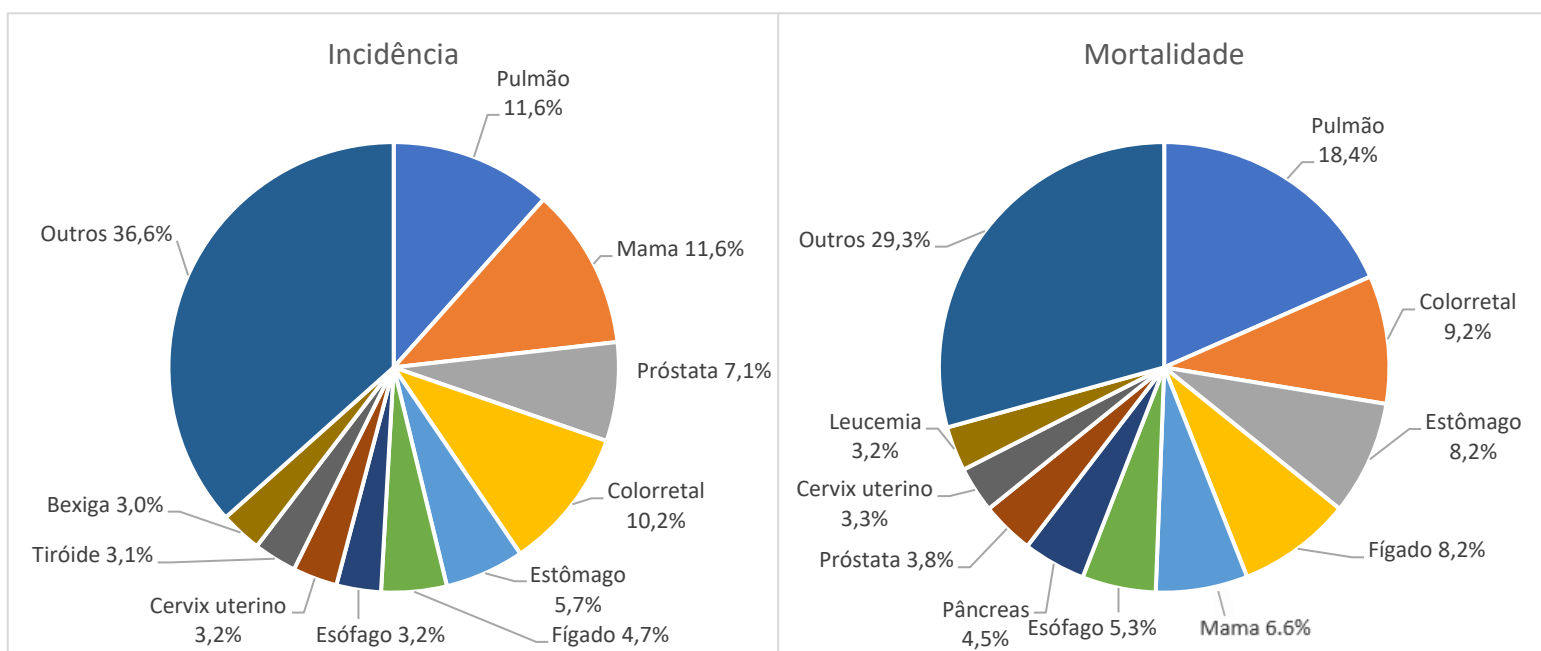


Figura 1.1 – Distribuição da incidência e mortalidade em percentagem para os 10 tipos de cancro mais comuns em 2018, relativamente aos novos casos e número de mortos registados nesse ano (adaptado de *GLOBO-CAN, 2018*)³.

O desenvolvimento de cancro é um processo multifásico que ocorre durante a vida de um organismo, afetando uma subpopulação de células, como resultado de um conjunto de alterações moleculares e adaptação ao ambiente, como por exemplo mutações e a seleção⁴.

A carcinogénese – processo de formação do cancro – tem diversas causas, que podem ser classificadas em dois principais grupos: causas internas e causas externas⁵. A formação do cancro resulta da interação entre os fatores genéticos de um organismo (causas internas), como a aquisição de mutações somáticas ou hereditárias, modificações epigenéticas e alterações a nível hormonal e/ou imunitário, e carcinógenos^{6,7} (causas externas) que apresentam capacidade de danificar o genoma ou causar disrupção de diversos processos metabólicos a nível celular, promovendo assim a carcinogénese.

Existem diferentes tipos de carcinógenos, nomeadamente: carcinógenos físicos, como diversas formas de radiação; carcinógenos químicos, como o amianto, componentes químicos do fumo do tabaco, arsénio, etc.; e carcinógenos biológicos, como infeções causadas por certos agentes patológicos (vírus, bactérias ou parasitas).

O nível de interligação entre ambos os tipos de causa depende de determinadas alterações genéticas, que influenciam a suscetibilidade do organismo a diferentes carcinógenos. O envelhecimento do organismo é também um fator fundamental no desenvolvimento do cancro, devido à combinação de diversos fatores, como a exposição a diversos carcinógenos no quotidiano, a acumulação de lesões a nível celular e mutações, e a tendência para a diminuição da eficiência dos mecanismos de reparação celular ao longo do tempo de vida do organismo¹.

As células tumorais apresentam também um conjunto de propriedades funcionais capazes de promover a carcinogénese, que são adquiridas através de mecanismos distintos ao longo da progressão e propagação tumoral⁸. O desenvolvimento de instabilidade genómica e a resposta inflamatória associada ao desenvolvimento tumoral são fundamentais para a aquisição das propriedades funcionais mencionadas. A carcinogénese é também substancialmente influenciada pelo microambiente tumoral desenvolvido ao longo do processo de tumorigénese – ambiente envolvente ao tumor que inclui elementos como vasculatura, células do estroma e células do sistema imunitário associados ao mesmo – que por sua vez influencia as condições a que as células tumorais se encontram (por exemplo, baixos níveis de oxigénio, falta de nutrientes, barreiras físicas ao crescimento apresentadas pelo tecido circundante, etc.)⁹.

Tradicionalmente, o cancro é classificado de acordo com o tipo de tecido de origem das células cancerígenas (sendo mais comuns carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas e mielomas), com o local onde primeiramente foi desenvolvido (por exemplo, cancro do pulmão) e consoante a progressão tumoral e grau de metastização (normalmente caracterizado por quatro graus do cancro), podendo também ser caracterizados relativamente às mutações presentes nas células cancerígenas^{10,11}.

1.1.1. Características das Células Tumorais

A capacidade de proliferar ignorando os mecanismos reguladores da mesma e a habilidade de invadir e colonizar diferentes tecidos no organismo são propriedades funcionais fundamentais das células cancerígenas⁸. Estudos sugerem que a maioria dos cânceros derivam de uma única célula anormal que, ao acumular mutações adicionais, ganha uma vantagem evolutiva em relação às células vizinhas, crescendo e proliferando de forma descontrolada e originando eventualmente um tumor^{12,13}.

As mutações podem ser somáticas ou epigenéticas e os tumores podem ser classificados quanto à capacidade de metastização das suas células – capacidade de invasão de tecidos circundantes e formação tumores secundários (metástases) – assim existindo tumores benignos (que não apresentam esta capacidade) e tumores malignos (caso as células tumorais consigam realizar este processo).

A nível molecular, devido à aleatoriedade das mutações, estas podem acontecer em genes cuja mudança não influencia o desenvolvimento do cancro e em genes cuja sobreexpressão ou inativação é crítica para a tumorigénese e a carcinogénese, seja de forma direta ou indireta^{14,15}. Estes últimos podem ser agrupados em duas classes¹⁶: proto-oncogenes (por exemplo, os genes MYC, RAS, ABL, BCR, RAF, etc.), cujas formas mutadas e sobreexpressas são denominadas de oncogenes, e genes supressores de tumores (por exemplo, os genes RB, TP53, BCL2, SWI e SNF, etc.) respetivamente. Os oncogenes desempenham diversas funções importantes na progressão do ciclo celular, na apoptose e na diferenciação celular. A sua sobreexpressão provoca a desregulação da expressão de vários outros genes e de vias de sinalização associadas ao desenvolvimento tumoral, sendo observada em vários tipos de tumores. Os genes supressores de tumores têm como função a inibição da proliferação celular e do desenvolvimento tumoral, sendo que em muitos tumores o *downregulating*, inativação ou perda destes genes resulta na ausência de mecanismos de regulação negativa essenciais para a inibição da proliferação celular, contribuindo assim para a proliferação anormal de células tumorais.

As alterações moleculares referidas influenciam não só a origem e o desenvolvimento tumoral como também o grau de diferenciação e capacidade de invasão das células cancerígenas, o que é afetado pelo aumento característico relativo à frequência e acumulação de mutações em células cancerígenas¹⁷, que pode ser devido a um aumento da sensibilidade a agentes mutagénicos, por degradação de componentes da maquinaria responsável pela manutenção da integridade do genoma ou através do comprometimento dos sistemas responsáveis por indução de apoptose ou estados de senescência em células danificadas. A sucessão de alterações no genoma das células cancerígenas proveniente do desenvolvimento de instabilidade genética¹⁷ contribui assim fortemente para a carcinogénese, visto que certas mutações e alterações epigenéticas são capazes de conferir uma vantagem seletiva a determinada subpopulação de células, permitindo assim que estas tenham um desenvolvimento mais rápido e eventualmente dominem o tecido e ambiente local.

O desenvolvimento tumoral encontra-se também associado à resposta inflamatória¹⁸. Virtualmente todas as lesões neoplásicas contém células do sistema imunitário em menor ou maior concentração, que advém da resposta inflamatória associada ao desenvolvimento tumoral. A inflamação pode contribuir para o desenvolvimento de capacidades fundamentais de células cancerígenas através do fornecimento de moléculas bioativas ao microambiente tumoral, como fatores de crescimento que mantêm sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, fatores pró-angiogénicos, enzimas capazes de modificar a matriz extracelular de modo a facilitar a angiogénese, invasão e metástase e sinais indutores dos mesmos processos. As células inflamatórias podem também libertar agentes químicos, como espécies reativas de oxigénio, que são ativamente mutagénicas, contribuindo assim para o acelerar da evolução genética de células cancerígenas.

As características enunciadas das células tumorais contribuem assim para o desenvolvimento de propriedades fundamentais no processo de carcinogénese⁸, como a capacidade de manutenção de uma proliferação crónica, a evasão de supressores de crescimento, a resistência a mecanismos de morte celular, a imortalização das células tumorais, a indução da angiogénese, as modificações associadas ao metabolismo energético, a evasão de destruição por parte do sistema imunitário e a ativação da invasão de células cancerígenas noutros tecidos e metastização (Figura 1.2).

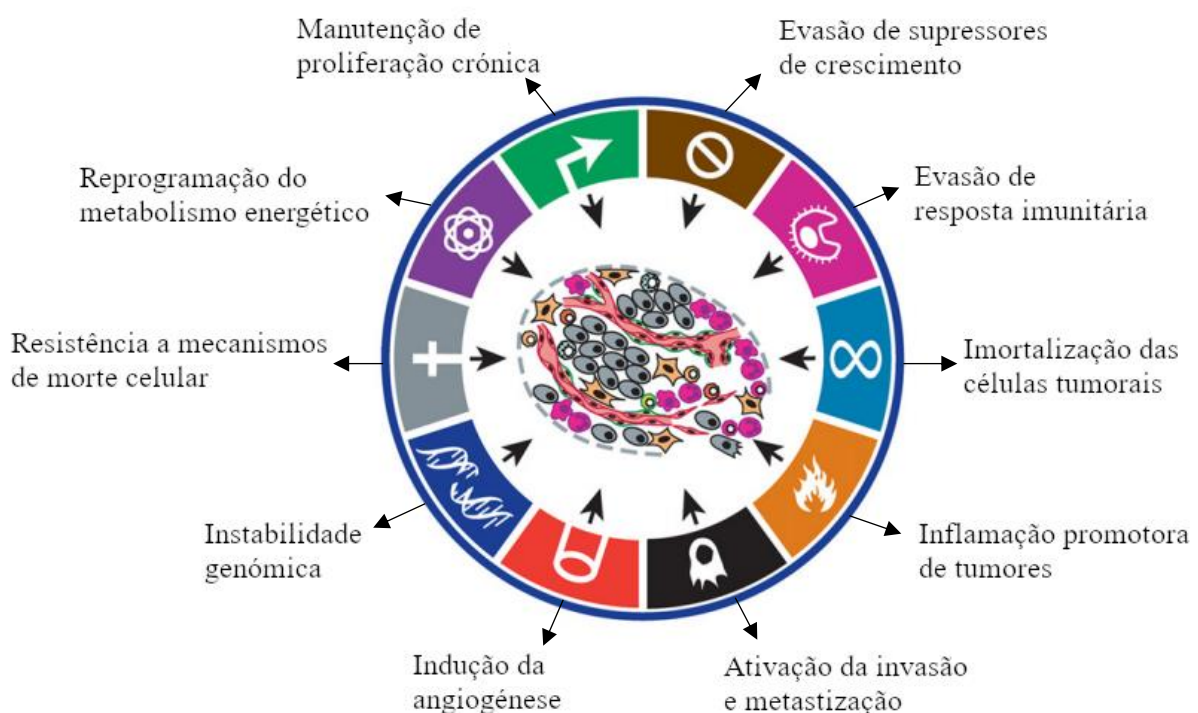


Figura 1.2 – Representação das características fundamentais e adquiridas pelas células cancerígenas propostas por Hanahan e Weinberg (adaptado de *Hanahan and Weinberg, 2011*)⁸.

Manutenção de proliferação crónica

A manutenção de proliferação crónica é uma das propriedades fundamentais das células cancerígenas^{8,19}. Em tecidos normais, a produção e libertação de sinais que promovem o crescimento, divisão e progressão no ciclo celular é realizada de forma controlada, garantindo a homeostasia do número de células e a manutenção da arquitetura e função dos mesmos. Estes sinais são transmitidos maioritariamente por fatores de crescimento que se ligam a recetores presentes na superfície celular e, consequentemente, que emitem sinais através de vias de transdução de sinal intracelulares, regulando assim o crescimento e progressão do ciclo celular. Frequentemente, esses sinais influenciam outras propriedades celulares, como a sobrevivência e o metabolismo energético das mesmas. As células cancerígenas apresentam desregulação relativa aos sinais mencionados, sendo capazes de manter a sinalização proliferativa ativa de forma contínua através de diferentes formas, nomeadamente: via estimulação autócrina; por estimulação das células normais do estroma associado ao tumor, que consequentemente fornecem vários fatores de crescimento às células cancerígenas; através do aumento do número de recetores relativos a fatores de crescimento na superfície celular; por alterações estruturais dos mesmos recetores para aumentar a afinidade destes a fatores de crescimento; através da ativação constitutiva da via de transdução de sinal por mutações somáticas ou via disrupção de mecanismos de feedback negativo responsáveis por atenuar e inibir a proliferação celular.

Evasão de supressores de crescimento

Para além da constante indução e manutenção de sinais que estimulam o crescimento celular, as células cancerígenas precisam também de evitar mecanismos inibidores da proliferação celular, sendo estes muitas vezes dependentes da ação de genes supressores de tumores^{8,19}. Dois dos principais genes supressores de tumores codificam para as proteínas RB e TP53, que operam como elementos centrais em dois circuitos complementares associados à regulação celular, influenciando a escolha de proliferação, senescência ou apoptose por parte da célula. A interligação dos dois circuitos permite reprimir replicação inapropriada por parte de células cancerígenas que apresentam falta de um destes principais genes supressores de tumores.

Estudos demonstram que ao cultivar células normais num ambiente bidimensional e ao ser atingida uma elevada densidade populacional, ocorre a supressão de proliferação celular adicional, resultando em monocamadas de células confluentes – inibição por contacto. Vários tipos de células cancerígenas em cultura *in vitro* demonstram ignorar a inibição por contacto evidenciada por células normais, sugerindo um comportamento análogo *in vivo* durante o processo de carcinogénese. As células cancerígenas apresentam também capacidade de evadir os efeitos antiproliferativos de TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), proteína responsável pelo controlo da proliferação, diferenciação e outras funções

celulares. Em muitos tumores em fases avançadas, as vias de sinalização associadas a TGF- β são redirecionadas para a ativação de mecanismos celulares que conferem características associadas ao carácter maligno das células cancerígenas.

Resistência a mecanismos de morte celular

A morte celular programada serve como uma barreira natural ao desenvolvimento do cancro^{8,20}. O entendimento acerca dos mecanismos envolvidos na apoptose tem revelado como esta é desencadeada em resposta aos vários fatores de stress fisiológico que as células cancerígenas experienciam, seja ao longo da tumorigénese ou como resultado de terapias anticancerígenas^{21,22}. Notoriamente, desequilíbrios na sinalização resultantes de elevados níveis de expressão de oncogenes e danos no DNA associados a hiperproliferação encontram-se entre as principais causas de apoptose. Contudo, estudos revelam que a apoptose é atenuada em tumores que sucedem em progredir para estados mais avançados e resistir a terapias. A maquinaria apoptótica possui componentes reguladores e efetores, estando os reguladores divididos em dois circuitos principais²³: um responsável por receber e processar sinais extracelulares indutores de morte celular (via apoptótica extrínseca) e outro cuja apoptose é ativada através da deteção e integração de uma variedade de sinais de origem intracelular (via apoptótica intrínseca). Cada um dos circuitos mencionados culmina na ativação de uma proteína normalmente latente, que dá início a uma cascata de proteólise que envolve caspases efetoras responsáveis pela fase de execução da apoptose, na qual a célula é progressivamente desmantelada e consumida quer pelas células vizinhas como por células fagocitárias. As células tumorais apresentam vários mecanismos capazes de limitar ou contornar a apoptose, entre os quais se encontram a perda de função do supressor de tumor p53, o aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) ou de sinais que promovem a sobrevivência celular (IGF-1, IGF-2), por diminuição da expressão de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim, Puma) ou por inibição da via apoptótica extrínseca²⁴.

A sobrevivência de células tumorais é também influenciada por processos autofágicos^{20,25}. A autofagia permite a quebra de organelos celulares em metabolitos de baixo peso molecular a ser usados na biossíntese ou metabolismo energético, sendo este processo uma resposta fisiológica a diferentes formas de stress celular, como a exposição de células a ambientes pobres em nutrientes. Alguns estudos apresentam a autofagia como barreira da tumorigénese, podendo funcionar independentemente ou em correlação com a apoptose. No entanto, certos tratamentos oncológicos como a radioterapia ou a quimioterapia podem induzir elevados níveis de autofagia em resposta ao stress celular causado pelos mesmos, diminuindo assim a eficiência dos tratamentos²⁶. Para além disso, estudos demonstram que células cancerígenas sobre elevados níveis de stress podem encolher por autofagia a um estado reversível de

dormência, que pode resultar na persistência e eventual recrescimento de tumores após tratamento oncológico^{8,20}.

Em contraste com a morte celular programada que ocorre por apoptose, a morte celular por necrose apresenta potencial para a promoção de sinais pró-inflamatórios e desenvolvimento tumoral^{20,27}. Células necróticas, ao explodir e libertar o seu conteúdo para os tecidos e meio circundantes, libertam também sinais pró-inflamatórios, recrutando células provenientes do sistema imunitário cuja função é avaliar a extensão do dano nos tecidos e remover detritos necróticos associados ao mesmo. No contexto do cancro, estas células podem promover o desenvolvimento tumoral, dado a capacidade das mesmas de estimular angiogénese, proliferação de células cancerígenas e de invasão. Adicionalmente, células necróticas podem libertar fatores regulatórios bioativos capazes de estimular diretamente a proliferação de células vizinhas, contribuindo para a progressão tumoral. Assim sendo, a morte celular por necrose, apesar de parecer benéfica contra a hiperproliferação associada a células tumorais, poderá resultar em vários efeitos adversos⁸.

Imortalização das células tumorais

Ao contrário das células normais que apenas são capazes de passar por um número finito de ciclos de divisão celular, as células tumorais apresentam uma capacidade de replicação e proliferação ilimitada, evitando estados de senescência e de crise celular presentes no ciclo de vida de células normais⁸. Na imortalização das células tumorais, a proteção dos terminais dos cromossomas é um dos fatores essenciais, juntamente com a desregulação do ciclo celular. Em células não-imortalizadas, os telómeros sofrem um encurtamento progressivo remetente a ciclos de divisão celular, perdendo eventualmente a capacidade de proteger os terminais dos cromossomas e consequentes danos na sequência e estrutura dos mesmos, que põem em causa a viabilidade celular. A telomerase, enzima responsável por adicionar sequências específicas e repetitivas de DNA às extremidades do DNA telomérico, encontra-se ausente em células não-imortalizadas, mas expressa a níveis funcionalmente significativos na maioria das células imortalizadas²⁸. Ao aumentar o número de repetições e, conseqüentemente, a extensão do DNA telomérico, a telomerase é capaz de contrariar a erosão progressiva dos telómeros, estando assim correlacionada com a resistência de células imortalizadas a mecanismos de senescência e crise celular, duas barreiras à proliferação celular desregulada e, por associação, ao desenvolvimento do cancro²⁹. A imortalização de células tumorais tem sido atribuída à sua capacidade de manter uma extensão suficiente de DNA telomérico capaz de evitar o desencadeamento de senescência celular ou apoptose, alcançada normalmente pelo aumento de expressão da telomerase ou por diferentes mecanismos de manutenção dos telómeros (*Alternative Lengthening of Telomeres – ALT*)³⁰. A perda de DNA telomérico

encontra-se também associada em muitos tumores a um aumento de instabilidade genómica, derivado de uma instabilidade a nível do cariótipo e ampliações e deleções de segmentos cromossómicos⁸.

Indução da angiogénese

A angiogénese é regulada quer por indução, quer por inibição, geralmente através de proteínas sinalizadores que ligam a recetores presentes na superfície das células endoteliais. Um dos principais fatores indutores da angiogénese é o VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)³¹, cuja expressão pode ser aumentada por condições de hipoxia e por sinalização por certos oncogenes, enquanto que um dos principais fatores inibidores do mesmo processo é a trombospondina (TSP)³², que também consegue ligar aos recetores transmembranares das células endoteliais, provocando assim sinais supressores capazes de contrariar estímulos pró-angiogénicos.

Tal como tecidos normais, o tecido tumoral necessita de adquirir nutrientes e oxigénio e eliminar resíduos metabólicos e dióxido de carbono. A neovasculatura tumoral, gerada por angiogénese, trata de responder às necessidades enunciadas⁸. Ao contrário do que acontece em tecidos normais, em que a angiogénese é um processo quiescente apenas ativo transientemente como parte de certos processos fisiológicos, durante a progressão tumoral o processo de angiogénese encontra-se quase sempre ativo, causando o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos através da vasculatura já existente de modo a suportar um contínuo crescimento tumoral³³. Os vasos sanguíneos produzidos dentro de tumores são tipicamente aberrantes, na medida em que a neovasculatura tumoral apresenta vasos sanguíneos distorcidos e aumentados com ramificações excessivas e desorganizadas, fluxo sanguíneo errático, micro-hemorragias, vazamento e níveis anormais de proliferação e apoptose em células endoteliais³⁴. A ativação dos mecanismos de angiogénese pode resultar também da ação certos oncogenes em células tumorais, como RAS e MYC, capazes de aumentar a expressão de fatores angiogénicos, enquanto que outros sinais indutivos podem ser produzidos indiretamente por células do sistema imunitário associadas a fenómenos inflamatórios⁸.

Ativação da invasão de células cancerígenas noutros tecidos e metastização

O processo multifásico de metastização e invasão envolve uma sequência de etapas que engloba as alterações biológicas e celulares necessárias para que este aconteça^{35,36}. Começa com a invasão local de células cancerígenas em tecidos vizinhos, seguida da infiltração das mesmas em vasos sanguíneos e linfáticos próximos, circulação das células cancerígenas através do sistema circulatório e linfático, seguido do escape das células pelo lúmen dos vasos para o parênquima de tecidos distantes (extravasação),

a formação de pequenos nódulos de células cancerígenas (micrometástases) e, finalmente, o crescimento das lesões micrometásticas em tumores macroscópicos (colonização).

O EMT (*epithelial-mesenchymal transition*)^{37,38}, processo pelo qual células epiteliais perdem a polaridade celular e capacidade de adesão célula-célula ganhando propriedades migratórias e invasivas, assim como capacidade de resistir a apoptose e de ocorrer disseminação, tem sido considerado como um dos principais reguladores da metastização e invasão por parte de células cancerígenas. A diferente regulação da expressão de genes associados à mobilidade e migração celular por diferentes fatores de transcrição resulta num maior ou menor potencial de metastização. Este potencial é também influenciado pelas condições da matriz extracelular (ECM). Estudos têm vindo a demonstrar a influência que as células vizinhas podem ter na ativação da expressão de fatores de transcrição em células de modo a ativar o processo de EMT, demonstrando a potencialidade que contribuições heterotípicas que células cancerígenas têm com células adjacentes do estroma associadas ao tumor podem induzir expressão de fenótipos malignos, nomeadamente, a ativação de mecanismos de metastização e invasão. As células cancerígenas podem passar por reversão do processo de EMT, chamado MET (*mesenchymal-epithelial transition*), voltando a um estado de “não-invasão”, apresentando assim plasticidade.

Formas distintas de invasão podem estar subjacentes a diferentes tipos de cancro^{39,40}. O programa EMT regula um tipo particular de invasão designada por mesenquimal⁴¹. Para além deste, existem também outros mecanismos. São estes o mecanismo de invasão coletiva⁴², que envolve nódulos de células cancerígenas a avançar em massa para tecidos adjacentes, e a forma de invasão amebóide⁴³, em que células individuais demonstram plasticidade morfológica, permitindo que estas se desloquem através de espaços intersticiais existentes na matriz extracelular ao invés de ser criado um caminho próprio como ocorre nos outros tipos de invasão mencionados. Outra forma de invasão consiste na facilitação de invasão por células do sistema imunitário associadas a respostas inflamatórias⁴⁴, que se reúnem nas fronteiras tumorais e produzem enzimas que degradam a matriz extracelular e outros fatores que permitem um crescimento invasivo.

A metastização pode ser dividida em duas principais fases: a disseminação física de células cancerígenas através do tumor primário para tecidos distantes, e a adaptação destas células a microambientes de tecidos diferentes – o que resulta numa colonização bem-sucedida, i.e., o crescimento de micrometástases em tumores macroscópicos³⁵. O processo de colonização pode não ser bem-sucedido, sendo também influenciado pelo microambiente tumoral^{9,35}.

Em alguns tipos de cancro, o tumor primário pode libertar fatores supressores sistémicos que induzem as micrometástases a adotar um estado de dormência, podendo o crescimento destas acontecer após um período indeterminado, período este de adaptação aos tecidos colonizados^{45,46}. Este estado de dormência e incapacidade de crescimento poderá estar relacionado com a incapacidade de ativação de

angiogênese por parte dos microtumores. Para além disso, a autofagia em resposta a falta de nutrientes ou como resposta a medidas terapêuticas pode resultar no encolhimento de células cancerígenas, fazendo com que estas adotem também um estado reversível de dormência. Sinais de anti-crescimento presentes na matriz extracelular de tecidos normais e supressão de ações tumorais por parte do sistema imunitário são outros fatores que podem estar relacionados com o estado de dormência mencionado. A capacidade de colonização pode ser desenvolvida por parte das células cancerígenas colonizadoras ao chegar ao tecido alvo como forma de pressão seletiva ou então pode ser uma característica inerente das células disseminadas ao sair do tumor primário⁸.

Reprogramação do metabolismo energético

De modo a suportar o crescimento e proliferação celular de forma contínua e mais eficiente, as células cancerígenas apresentam a capacidade de modificar o seu metabolismo e vias de produção de energia^{47,48}. As células cancerígenas apresentam uma característica anómala relativa ao seu metabolismo de energia, visto que, mesmo na presença de oxigénio, estas conseguem limitar a sua produção energética maioritariamente à glicólise, o que é denominado por um estado de “glicólise aeróbica” – Warburg effect⁴⁹. A existência deste mecanismo em células cancerígenas parece ser algo contraintuitivo devido à notória diferença de rendimento energético associado às diferentes vias de produção de energia⁵⁰. No entanto, estudos sugerem que o aumento da glicólise permite o desvio de metabolitos intermediários para várias vias biossintéticas, influenciando a síntese de macromoléculas e organelos necessários para a construção de novas células⁵¹. O aumento de reservas de glucose tem sido associado ao aumento e ativação de transportadores de glucose (GLUT1), o que provoca um aumento da importação de glucose para o citoplasma. O aumento de expressão de certos oncogenes (RAS e MYC, por exemplo) e a mutação e inativação de genes supressores de tumores (como o gene TP53), cujas alterações em células tumorais são responsáveis por muitas das propriedades características das células cancerígenas como evidenciado anteriormente, poderão também estar relacionados com o aumento dos níveis de glucose intracelular^{48,52}.

Estudos demonstram a existência de tumores contendo duas subpopulações de células cancerígenas que diferem nas vias usadas para produção de energia⁵³. Uma das subpopulações celulares realizava “glicólise aeróbica” secretando ácido láctico, enquanto que as células da outra subpopulação importavam e utilizavam como principal fonte de energia o ácido láctico produzido pelas células da população anterior. Estas duas subpopulações celulares demonstravam assim funcionar de forma simbiótica.

Evasão de destruição por ação do sistema imunitário

As células cancerígenas demonstram capacidade de evadir destruição e eliminação por parte de células do sistema imunitário (em particular por linfócitos T e B, células NK e macrófagos), o que realça o papel dicotômico do sistema imunitário, que tanto oprime como contribui para o desenvolvimento e progressão tumoral^{8,54}. A monitorização constante de células e tecidos por parte do sistema imunitário contribui para a deteção e eliminação de uma vasta maioria de células tumorais em estados iniciais, no entanto, devido à mutabilidade constante das células cancerígenas, estas evoluem de modo a conseguir evitar a identificação por parte do sistema imunitário ou até mesmo limitar a ação destrutiva do mesmo, evitando assim a sua erradicação. Estes mecanismos passam, exemplo, por evitar a identificação de *neoantigens* das células cancerígenas por parte dos componentes do sistema imunitário (redução de imunogenicidade), pelo recrutamento de células associadas à resposta inflamatória com atividade imunossupressora ou até mesmo pela produção e secreção de imunossupressores para o microambiente tumoral por parte das células cancerígenas. Estudos evidenciam a importância do sistema imunitário como barreira para a formação e progressão tumoral, indicando que tanto a resposta inata como a resposta adaptativa do sistema imunitário são capazes de contribuir significativamente para a vigilância imunológica e, conseqüentemente, para a erradicação de células tumorais^{8,55}.

As características e propriedades referidas das células cancerígenas apresentam um papel fulcral na progressão e propagação do cancro. O estudo e compreensão destas características compreende assim um papel chave no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e tratamento oncológicos.

1.1.2. Diagnóstico do Cancro

O crescente entendimento dos processos moleculares do cancro tem contribuído para o aprimoramento de três abordagens diferentes em relação à doença: a prevenção, o diagnóstico e o tratamento⁵⁶. Ao longo dos anos, vários ensaios têm sido realizados para detetar, identificar e listar possíveis carcinógenos. Estudos sugerem que uma percentagem significativa (30-50%) dos casos de cancro poderia ser prevenida ao modificar ou evitar a exposição a fatores de risco, como por exemplo, tabaco, obesidade, radiação ultravioleta ou ionizante ou poluição¹. Assim sendo, a investigação focada nos diferentes fatores de risco (ambientais e comportamentais) e na influência destes na carcinogénese, apresenta relevância na prevenção do cancro.

Um diagnóstico correto e atempado do cancro é essencial para um tratamento adequado e eficaz da doença, podendo reduzir significativamente a mortalidade da mesma. Atualmente, o diagnóstico do cancro é baseado fundamentalmente em três conceitos⁵⁶: testes laboratoriais para identificação de biomarcadores; testes de imagem e biopsias.

Diferentes técnicas usadas na criação de representações visuais do interior do organismo para análise clínica e intervenção médica, como tomografia axial computadorizada (TAC), *magnetic resonance imaging* (MRI), tomografia por emissão de positrões (PET), ultrassons, raios-X, entre outros, permitem a visualização de massas ou áreas de anormalidade dentro do organismo, como no caso da existência de tumores⁵⁷. No entanto, métodos de imagem por si só não permitem a diferenciação entre células cancerígenas e células não-cancerígenas. Assim sendo, atualmente, para a maioria dos cancros a realização de uma biopsia é o método mais utilizado para obter um diagnóstico mais definitivo. A biopsia consiste na colheita de uma amostra de tecido e análise do mesmo para determinação da sua natureza, neste âmbito, da sua tumorigenicidade. Existem vários tipos de biopsias, podendo estas ser classificadas relativamente ao tipo de tecido a ser analisado ou ao método usado na colheita da amostra (por exemplo, biopsia da medula óssea, biopsia de pele, biopsia endoscópica, biopsia por agulha, biopsia por cirurgia, entre outros)⁵⁸.

Avanços significativos na área de diagnóstico molecular e deteção de biomarcadores oncológicos têm permitido o desenvolvimento de estratégias viáveis para deteção e monitorização do cancro, para além da realização de diagnósticos de forma mais antecipada, caracterização tumoral e uma determinação mais eficiente da fase em que a doença se encontra, contribuindo assim para a personalização do tratamento oncológico⁵⁹. Um biomarcador é designado como uma substância ou atividade que pode ser objetivamente medida e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, um processo patogénico ou uma resposta a uma intervenção terapêutica⁶⁰. Os biomarcadores oncológicos estão presentes em tecidos tumorais ou em soro e englobam uma grande variedade de moléculas, incluindo DNA, mRNA, enzimas, metabolitos, fatores de transcrição e recetores presentes nas membranas celulares⁶¹.

Tendo em conta a abundância de biomarcadores moleculares oncológicos existentes, aqueles capazes de precisar mutações somáticas ou na linha germinativa, alterações transcricionais e modificações pós-traducionais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento e inovação do diagnóstico e tratamento do cancro⁶². Vários métodos de detecção baseados no reconhecimento específico de biomarcadores oncológicos têm sido desenvolvidos, como *polymerase chain reaction* (PCR)⁶³, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)⁶⁴, eletroforese⁶⁵, *surface plasmon resonance* (SPR)⁶⁶, *surface enhanced Raman spectroscopy* (SERS)⁶⁷, ensaios colorimétricos⁶⁸, ensaios eletroquímicos⁶⁹, métodos de fluorescência⁷⁰, *etc.*

A sensibilidade e especificidade dos sistemas de detecção de biomarcadores oncológicos são determinadas por diferentes fatores, como a eficiência de ligação entre sonda e alvo, a capacidade de converter a ligação referida num sinal mensurável, e a habilidade de evitar interferências por ligação das sondas a biomoléculas diferentes do alvo⁵⁹. Apesar das vantagens enunciadas anteriormente, existem desafios perante os métodos enunciados, tais como a diversidade da doença e a habilidade limitada que um único biomarcador possui para identificar vários tipos de cancro com elevada especificidade e sensibilidade, o facto de que alguns dos métodos desenvolvidos apresentam elevada sensibilidade mas reduzida especificidade, aumentando o risco de sinais falso-positivos (como tal, sensores capazes de analisar múltiplos analitos simultaneamente têm sido desenvolvidos), e a necessidade de validação e standardização das diferentes técnicas e do aprimoramento da sensibilidade e especificidade dos ensaios⁵⁹.

Recentemente, o diagnóstico do cancro tem abandonado a dependência da biopsia direta de tecidos tumorais para a detecção da doença, diagnóstico e monitorização do tratamento do cancro. Devido às limitações práticas e riscos associados ao diagnóstico baseado em biopsias de tecidos, novas plataformas de diagnóstico de cancro não-invasivas têm continuado a evoluir em anos recentes⁷¹. Exemplos destas plataformas incluem biopsias líquidas, que procuram identificar células cancerígenas em circulação, biopsias à urina e saliva, usadas em ensaios genómicos moleculares e biopsias ao sopro, que medem compostos orgânicos voláteis indicadores de cancro. Estas técnicas são baseadas principalmente na evolução do diagnóstico molecular e permitem um acompanhamento contínuo da progressão do cancro e do tratamento.

Avanços tecnológicos e na área do diagnóstico permitem assim uma mudança de paradigma remetente às estratégias terapêuticas aplicadas atualmente e uma melhoria geral na eficiência de tratamento.

1.1.3. Tratamento

O tratamento do cancro depende de uma variedade de fatores, como as características moleculares do cancro, a localização e a extensão da doença e o estado de saúde do paciente, sendo o objetivo a destruição de todas as células tumorais causando o menor dano possível a tecidos saudáveis¹. Atualmente, a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são os principais métodos terapêuticos usados no tratamento do cancro, podendo ser aplicados individualmente ou em conjunto de forma a obter o melhor resultado possível⁷².

As terapias convencionais mencionadas tiram muitas vezes partido de certas propriedades de células cancerígenas, como a instabilidade genética das mesmas e a perda de controlo relativamente à progressão no ciclo celular⁷³. Concretizando, a radioterapia e a quimioterapia são terapias não-seletivas, afetando tanto células cancerígenas como células normais, causando danos a nível celular e molecular nos tecidos. No entanto, as células cancerígenas demonstram ser mais suscetíveis aos efeitos das terapias mencionadas, visto que apresentam mecanismos de reparação de danos no DNA deficientes, o que em combinação com a falta de controlo na progressão do ciclo celular por parte destas células e as mutações causadas pelas terapias mencionadas, resulta na acumulação de mutações nocivas à sobrevivência celular e, conseqüentemente, uma maior sensibilidade por parte das células cancerígenas a estes tipos de tratamento. Tendo em conta diminuta seletividade das terapias tradicionais, o desenvolvimento de métodos terapêuticos que consigam atingir células cancerígenas de forma mais específica é de extrema importância⁷⁴.

A elaboração de diferentes protocolos e técnicas de tratamento tem vindo a tomar partido das características e propriedades fundamentais das células cancerígenas, juntamente com as múltiplas vias bioquímicas envolvidas como foco de tratamento⁸. O direcionamento de terapias com foco em simultaneamente danificar ou inibir a atividade de múltiplas capacidades funcionais das células cancerígenas propõe assim uma forma de tratamento do cancro mais eficaz e duradouro.

A aquisição de resistência por parte de células cancerígenas^{75,76} é também um notável obstáculo perante a aplicação de terapias convencionais. As células cancerígenas podem exibir resistência intrínseca a fármacos, proveniente de variações genéticas do indivíduo e na diferença genética de células somáticas em tumores, ou resistência adquirida, devido a uma exposição prolongada ao fármaco. Esta resistência pode ser desenvolvida por diferentes mecanismos, como a redução no influxo do fármaco ou o aumento no efluxo do fármaco, a ativação de sistemas de destoxificação celular, variações na metabolização do fármaco, a ativação de mecanismos de reparação do DNA; a evasão de apoptose induzida pelo fármaco, etc.

De modo a superar as limitações existentes na aplicação das terapias oncológicas clássicas, estratégias alternativas têm sido propostas, como a personalização e aumento de especificidade do

tratamento^{77,22}, o direcionamento do foco terapêutico para o entendimento e controlo do processo de evolução tumoral em fases iniciais⁷⁸, o desenvolvimento de terapias direcionadas para o microambiente tumoral⁷⁹ (com foco, por exemplo, na angiogénese, inflamação ou exploração das condições hipóxicas) ou a aplicação de terapias baseadas na progressão do ciclo celular⁸⁰, através do uso de fármacos citotáticos de modo a abrandar a progressão e mortalidade da mesma⁸¹.

A necessidade médica de superar as limitações existentes das terapias tradicionais resultou na investigação e desenvolvimento de, entre outros, vetores específicos para células cancerígenas⁸², métodos de imunoterapia⁸³, técnicas de terapia genética⁸⁴ e diversas terapias combinadas^{85,86} aplicadas ao tratamento do cancro.

1.1.3.1. Terapia Genética em Cancro

Avanços no estudo do genoma humano e no conhecimento de genética molecular ao longo das últimas duas décadas têm vindo a impulsionar abordagens terapêuticas baseadas em manipulação genética de modo a melhorar a regressão do cancro e encontrar uma potencial cura para a doença.

A terapia genética engloba qualquer procedimento que pretende tratar ou aliviar uma doença ao modificar geneticamente as células de um paciente, sendo que estas modificações consistem na alteração, deleção ou substituição de um ou mais genes em células-alvo⁸⁴. Os materiais a ser transferidos para as células do paciente podem ser genes, segmentos de genes ou oligonucleótidos e a transferência de material genético para células alvo pode ocorrer através de vários métodos, podendo estes ser agrupados em duas categorias principais: vetores virais⁸⁷ e vetores não-virais⁸⁸. Relativamente aos vetores não-virais, diferentes abordagens têm sido desenvolvidas, usando métodos físicos (por exemplo, nanopartículas⁸⁹ ou eletroporação⁹⁰) e químicos⁹¹ (como lipossomas). Após a transferência do material genético para dentro das células alvo, este pode induzir silenciamento, down-regulation, modificação ou reparação dos genes-alvo⁸⁴.

A modificação de genes-alvo pode também melhorar a resposta de terapias oncológicas subsequentes, como quimioterapia, imunoterapia ou radioterapia, enquanto que a reparação de genes alvo pode ajudar na prevenção de futura carcinogénese ou complicações relacionadas com cancro. As terapias genéticas englobam também a imunomodulação das células tumorais ou do sistema imunitário do organismo⁹² e a manipulação do microambiente tumoral⁹³, de modo reduzir a vasculatura do tumor ou aumentar a antigenicidade tumoral através de um melhor reconhecimento por parte do sistema imunitário do organismo.

Por sua vez, o conceito de introduzir ácidos nucleicos terapêuticos (do inglês, Therapeutic Nucleic Acids - TNAs) em células-alvo, de forma controlada, com o objetivo de bloquear a expressão de

genes específicos promotores do desenvolvimento cancerígena (*gene silencing*) ou restaurar a expressão de genes supressores de tumores que perderam a sua função ao longo da ontogenia cancerígena, tem sido extensivamente investigado no âmbito do tratamento do cancro. Atualmente, existe uma amplitude de estratégias de terapia genética que dependem da capacidade de vectorização de TNAs e/ou de uma combinação de ferramentas usadas em edição genética – que visam corrigir eventos moleculares a nível celular contribuidores para o desenvolvimento cancerígena – para as células-alvo pretendidas⁹⁴. Estas plataformas incluem ferramentas de edição genómica, elementos capazes de induzir e modular mecanismos endógenos de RNA de interferência (RNAi), e componentes capazes de identificar e destruir marcadores moleculares aberrantes^{95,96}. As ferramentas de edição genómica são definidas pela capacidade de modificar o genoma de organismos vivos com precisão, podendo incidir em DNA, usando ferramentas de edição genómica⁹⁷ como CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)^{98,99}, TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*)¹⁰⁰, ZFNs (*zinc finger nucleases*)¹⁰¹ e meganucleases¹⁰²; ou RNA, usando oligonucleótidos antisense (ASOs)¹⁰³, mecanismos de RNA de interferência (RNAi)¹⁰⁴, ribozimas e riboswitches¹⁰⁵.

Recentemente, as ferramentas moleculares usadas para modelação do genoma e expressão genética têm sido usadas em diferentes estratégias conceptuais para monitorização da progressão tumoral ou eliminação de células cancerígenas. No entanto, a escolha o uso das diferentes ferramentas não é muito evidente tendo em conta que estas apresentam algumas limitações cruciais. A Tabela 1.1 destaca algumas das principais características das estratégias mencionadas e menciona algumas das suas aplicações mais recentes, enquanto que a Tabela 1.2 contribui com uma visão geral acerca do uso atual de algumas ferramentas de edição genética em ensaios clínicos. A maioria das limitações podem ser superadas através do *design* de formulações e estratégias de *delivery* adequadas. Estas devem ser capazes de transportar elevadas cargas do efector molecular desejado com alta precisão a nível celular, garantindo o aumento do seu tempo de meia-vida em circulação e conferindo proteção contra mecanismos de degradação endógenos.

A tecnologia baseada em RNAi tem sido apresentada como uma nova estratégia terapêutica direcionada com particular interesse no tratamento do cancro. Certos miRNAs presentes no citoplasma encontram-se associados ao RISC (*RNA-induced silencing complex*), assim ativando a degradação de mRNA ou a repressão da tradução do mesmo¹⁰⁶. Os mecanismos de RNAi são mediados por dsRNA usado na regulação da expressão genética, visto que tanto os siRNA como os miRNA são sintetizados a partir da clivagem de dsRNA pela enzima Dicer. No entanto, apesar da alta especificidade do RNAi, pode ocorrer a indução de efeitos *off-target* através do silenciamento do gene-alvo num tecido diferente do desejado. Para além disso, a administração sistémica de terapias baseadas em RNAi (siRNA e ASOs) apresenta por si só algumas barreiras, como a exposição das moléculas terapêuticas a degradação por nucleases ou a eliminação por parte do organismo, a ativação de uma resposta imunitária, a instabilidade

e baixa disponibilidade de oligonucleótidos livres, e a carga negativa dos mesmos (que afeta pejorativamente a internalização destes por parte das células)¹⁰⁷. De modo a resolver os problemas relativos à técnica enunciados, a vectorização de siRNA e ASOs para efeitos terapêuticos tem sido desenvolvida.

Os ASOs (tecnologia de DNA antisense, por exemplo) permitem a inibição ou *down-regulation* da produção de uma proteína específica através do uso de moléculas de DNA antisense complementares à sequência-alvo na célula, que hibridam com a sequência de mRNA correspondente bloqueando a expressão do gene-alvo na sua totalidade, seja por sinalização da clivagem da sequência de mRNA, impedimento estérico da tradução, etc.¹⁰⁴. A tecnologia de DNA antisense é também uma valiosa ferramenta relativamente à regulação da expressão genética, tendo sido usada em combinação com técnicas de quimioterapia convencional aplicadas ao tratamento do cancro. Atualmente, o método de *gene silencing* mais utilizado engloba o uso de tecnologia de RNAi, mais especificamente de siRNA¹⁰⁴.

Particularizando, o *gene silencing* consiste na diminuição da expressão de um gene alvo através da entrega intracelular de TNAs, dependendo geralmente de mecanismos de RNAi (como shRNA, siRNA e miRNA) para a modulação da expressão genética. A maioria dos alvos de silenciamento estão relacionados com oncogenes (por exemplo, *c-MYC*, *KRAS*, *BCR-ABL*, *EGFR*), devido ao desencadear de proliferação anormal celular associado ao aumento de expressão dos mesmos ou ao aumento de atividade das oncoproteínas resultantes. Outros alvos incluem outros genes relacionados com a sobrevivência tumoral, como por exemplo, genes indutores de angiogénese¹⁰⁸.

Por fim, as abordagens anteriores para o tratamento do cancro, como a integração de retrovírus no genoma do hospedeiro com risco de mutagénese, imunogenicidade contra o vírus e/ou tumor e a resistência ao tratamento, têm sofrido um decréscimo significativo com a nova geração de vetores virais e não-virais^{84,109,110}.

A terapia génica/genética pode assim vir a desempenhar um papel importante na terapia do cancro como parte de um tratamento multimodal, em combinação com outras formas de terapia oncológica, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. O tipo e modo de terapia genética deverá ser determinado com base nos constituintes do genoma de um indivíduo específico, juntamente com os aspetos particulares do tumor, genoma e estado imunitário do organismo, de modo a desenvolver um tratamento multimodal único e ótimo para as necessidades de cada paciente.

Tabela 1.1 - Descrição de ferramentas de terapia genética aplicadas ao tratamento do cancro (adaptado de *Ferreira et al, 2020*).

Ferramentas de edição genética	Características	Vantagens	Limitações	Aplicação no tratamento do cancro	Ref
CRISPR/Cas9	CRISPR/Cas9 facilita a edição genómica em multiplex, com a possibilidade de simultaneamente deletar ou inserir múltiplas sequências de DNA.	CRISPR/Cas9 é rápido de desenvolver, simples e de menor custo em comparação com outras ferramentas de edição genética. Potencial para edição de múltiplos <i>loci</i> em simultâneo.	Elevada frequência de integração aleatória. Ativação de vias de reparação de DNA por <i>non-homologous end joining</i> (pode levar a microdeleções no local DSB).	Modificação de células T na terapia do cancro.	[^{97,98,111-113}]
ZFNs	Domínios de ligação ao DNA reconhecem sequências trinucleótídicas de DNA (sequências de DNA mais longas podem também ser afetadas).	ZFNs podem ser desenhados de modo a incluir uma variedade de domínios efetores para reconhecimento de virtualmente qualquer sequência de DNA.	Numerosos efeitos <i>off-target</i> . Técnica cara e difícil de implementar.	Aplicações clínicas para além do cancro (HIV)	[^{114,115}]
TALENs	A especificidade de <i>targeting</i> de DNA advém da fusão de proteínas bacterianas TALE. TALEN <i>arrays</i> reconhecem apenas um único nucleótido e não tem impacto na especificidade de ligação.	<i>TALEN engineered nucleases</i> apresentam melhor especificidade e eficiência comparando com ZFNs.	A principal limitação é a clonagem seriada de grandes módulos e a junção eficiente destes módulos, de forma definida, usando ligases.	Ensaio clínico – Neoplasia cervical intraepitelial; neoplasias hematológicas.	[^{96,97,115}]

Tabela 1.1 - Descrição de ferramentas de terapia genética aplicadas ao tratamento do cancro (adaptado de *Ferreira et al, 2020*) (continuação).

Ferramentas de edição genética	Características	Vantagens	Limitações	Aplicação no tratamento do cancro	Ref
RNA interferência	RNAi é geralmente usado na <i>down-regulation</i> da expressão genética. Para além disso, as moléculas efetoras (como siRNA) podem ser vetorizadas individualmente ou expressas a partir de plasmídeos adequados.	RNAi usa maquinaria celular, o que é facilitado por moléculas de siRNA.	Tempo de meia-vida curtos devido à ação de RNases. Baixa estabilidade bioquímica. Elevado custo.	Silenciamento de oncogenes em diversos casos de cancro – uso clínico.	[^{104,116-118}]
Oligonucleótidos Antisense	ASOs são pequenas moléculas de DNA ou RNA complementares ao mRNA-alvo. Ligação com o alvo resulta na alteração do <i>splicing</i> de mRNA ou na degradação de transcritos-alvo. Pode também levar ao bloqueio da tradução dos transcritos-alvo.	Simple de desenhar e vetorizar para dentro de células.	Obstáculos na <i>delivery in vivo</i> (imunogénico) que pode causar efeitos secundários. Tempo de meia-vida curtos devido à ação de RNases.	Aplicações clínicas para além do cancro (por exemplo, talassemia).	[^{104,108,119,120}]
Meganucleases	A tecnologia baseada em meganucleases envolve <i>re-engineering</i> da especificidade de ligação da DNA que ocorre naturalmente na família das <i>homing endonucleases</i> .	As meganucleases são a classe mais pequena de <i>engineered nucleases</i> , tornando-as recetivas a todos os métodos padrão de <i>gene delivery</i> visto que produzem menos efeitos <i>off-target</i> .	As meganucleases são de difícil construção, consumindo bastante tempo e com elevado custo.	Não existe menção em aplicações clínicas.	[^{102,115}]

Tabela 1.2 - Visão geral de ferramentas de edição genética presentes em ensaios clínicos(adaptado de *Ferreira et al, 2020*).

Plataforma	Condição/ Doença	Alvo	Tipo de Células	Vectorização	Referência dos Ensaio Clínicos (Fase)
ZFN	Infecção por HIV-1	CCR5	T (CD4+)	Adenovírus	NCT01252641 (I/II)
			T CD4/CD8	mRNA	NCT02225665 (I/II)
			HSPC (CD34+)	mRNA	NCT02500849 (I)
	Lesões pré-cancerígenas do cérvix induzidas por HPV	HPV16/18 E7	Epitelial	DNA	NCT02800369 (I)
	Hemofilia B	Gene do Fator IX	Hepatócitos	AAV	NCT02695160 (I)
	<i>Relapsed/refractory B-ALL</i>	CD52, TRAC	CAR T	Lentivírus	NCT02808442 (I)
TALEN	Câncer do colo do útero associado ao HPV	HPV16/18 E6/E7	Epitelial	Plasmídeo	NCT03226470 (I)
TALENs acoplados a CRISPR/Cas9	Câncer do colo do útero associado ao HPV	HPV16/18 E6/E7	Epitelial	Plasmídeo	NCT03057912 (I)

AAV: *adeno-associated virus*; AML: *acute myeloid leukemia*; BCL11A: *mouse B cell lymphoma factor 11A*; CAR T: *Chimeric Antigen Receptor T*; CCR5: *chemokine receptor 5*; CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*; HPV: *Human papillomavirus*; HSPCs: *hematopoietic stem/progenitor cells*; PDCD1: *programmed cell death 1*; TALEN: *transcription activator-like effector nuclease*; TRAC: *T cell receptor alpha chain*; ZFN: *zinc-finger nuclease*.

Tabela 1.2 - Visão geral de ferramentas de edição genética presentes em ensaios clínicos(adaptado de *Ferreira et al, 2020*) (continuação).

Plataforma	Condição/ Doença	Alvo	Tipo de Células	Vectorização	Referência dos Ensaio Clínicos (Fase)
	AML	CD123, TRAC	CAR T	mRNA	NCT03190278 (I)
	Diversos tipos de cancro	PDCD1	T	DNA	NCT02793856 (I) NCT03081715 (I)
CRISPR/ Cas9	<i>Relapsed/refrac- tory CD19+ leu- kemia and lymphoma</i>	TRAC, B2M CD19 e CD20 ou CD22, TRAC	CAR T CAR T	Lentivírus, eletroporação Lentivírus, eletroporação	NCT03166878 (I/II) NCT03398967 (I/II)
	Leucemia e lin- foma de células T	CD7, CD28	CAR T	-	NCT03690011 (I)
	β -talassemia	BCL11A	HSPC (CD34+)	-	NCT03655678 (I/II)
	Anemia falcí- forme	BCL11A	HSPC (CD34+)	-	NCT03745287 (I/II)

AAV: *adeno-associated virus*; AML: *acute myeloid leukaemia*; BCL11A: *mouse B cell lymphoma factor 11A*; CAR T: *Chimeric Antigen Receptor T*; CCR5: *chemokine receptor 5*; CRISPR: *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*; HPV: *Human papillomavirus*; HSPCs: *hematopoietic stem/progenitor cells*; PDCD1: *programmed cell death 1*; TALEN: *transcription activator-like effector nuclease*; TRAC: *T cell receptor alpha chain*; ZFN: *zinc-finger nuclease*.

1.1.3.2. Terapia Combinatória no Tratamento de Cancro

O aumento da eficiência de terapêuticas contra o cancro pode passar pela combinação de diferentes terapias de modo a maximizar o efeito anticancerígeno pretendido, através da identificação de múltiplas peculiaridades que conferem vulnerabilidade às células cancerígenas em contraste com células normais, do desenvolvimento de tratamentos direcionados especificamente a cada uma das vulnerabilidades definidas e da combinação de diferentes métodos de tratamento ótimos para o tratamento do cancro num paciente individual¹²¹.

A combinação de fármacos anticancerígenos melhora a eficácia de tratamento comparando com abordagens mono-terapêuticas¹²², pois afeta vias metabólicas chave nas células tumorais de forma sinérgica. Esta abordagem pode reduzir potencialmente a resistência de células cancerígenas a fármacos, proporcionando simultaneamente benefícios anticancerígenos, como a redução do crescimento tumoral e do potencial de metastização, efeito citostático nas células tumorais e indução de apoptose.

O futuro do tratamento oncológico passa assim pelo estudo da biologia molecular oncológica e de biomarcadores oncológicos, e pelo aumento da precisão e personalização das terapias. A nanomedicina é uma área cujo desenvolvimento e investigação apresenta cada vez mais soluções para os desafios referidos.

1.2. Nanomedicina e Cancro

Os limites intrínsecos das terapias convencionais usadas no tratamento oncológico têm vindo a promover o desenvolvimento e aplicação de novas estratégias mais eficientes e seguras para o mesmo efeito, entre as quais o uso de nanotecnologia e a nanomedicina têm particular destaque. Apesar do considerável sucesso alcançado nesta área, a sua implementação apresenta alguns obstáculos que advêm da complexidade e heterogeneidade da biologia tumoral, de um entendimento incompleto das interações bio-nano e dos desafios relacionados com a produção, controlos, translação para a clínica e comercialização¹²³.

O interesse cada vez maior em aplicar nanotecnologia no tratamento e diagnóstico do cancro pode ser justificado pelas características particulares de alguns dos nanomateriais¹²³, sendo algumas destas propriedades e aplicações enumeradas de seguida:

- Capacidade de melhoria do índice terapêutico de certos fármacos, aumentando a eficácia e/ou diminuindo a toxicidade dos mesmos, e de certas propriedades farmacêuticas (como a estabilidade, solubilidade, tempo de circulação e acumulação no tumor) de moléculas terapêuticas.
- Vectorização de fármacos de forma específica para diferentes tecidos, células ou órgãos.
- Libertação contínua ou desencadeada por estimulação de agentes terapêuticos.
- Facilita a entrega de macromoléculas biológicas (por exemplo, DNA, siRNA, mRNA e proteínas) em locais de ação intracelulares.
- Permite a co-entrega de múltiplos agentes terapêuticos de modo a melhorar a eficiência da terapia e superar a resistência de células cancerígenas a fármacos.
- Maior sensibilidade no diagnóstico de cancro e técnicas de imagem.
- Combinação de ação terapêutica com técnicas de imagem.
- Propriedades terapêuticas inerentes de alguns nanomateriais após estimulação.

O uso de nanopartículas como vetor na entrega de fármacos, ferramenta de diagnóstico e de imagem e no desenvolvimento de vacinas sintéticas e aparelhos médicos em miniatura remete para o potencial da nanotecnologia no tratamento oncológico, sendo que várias plataformas terapêuticas baseadas em nanopartículas (NP) têm sido aprovadas para o tratamento do cancro, estando a sua aplicação como aparelho de diagnóstico e em abordagens como a quimioterapia, hipertermia, terapia de

radiação, terapia genética e imunoterapia em rápida evolução. Consequentemente, um dos principais interesses relativamente às abordagens referidas é a possibilidade de combinação de diferentes modos terapêuticos com a capacidade de visualização em tempo real da distribuição e acumulação das NPs no local alvo do organismo, o que por sua vez pode ser acoplado à possível detecção de biomarcadores críticos da doença e levar a uma melhor compreensão do estado da mesma. Desta forma, a nanotecnologia permitiu o desenvolvimento de técnicas de (nano)teragnóstico, proporcionando terapia e diagnóstico numa única plataforma¹²³.

A maioria das NPs terapêuticas usadas no tratamento de tumores sólidos são administradas sistemicamente, havendo uma acumulação destas no tumor via efeito EPR (*enhanced permeability and retention*)¹²⁴ – *targeting* passivo – que é geralmente associado um vazamento relacionado com a formação rápida de vasculatura tumoral defeituosa por necessidade de nutrientes por parte das células tumorais, o que permite a passagem das NPs para o espaço intersticial tumoral, e a uma drenagem linfática pouco eficaz que resulta na retenção das NPs no tecido. A entrega passiva de NPs em tumores toma assim partido das alterações patofisiológicas na dinâmica de fluidos e solutos no organismo de modo a haver um direcionamento e acumulação preferencial de NPs para o local em questão. As NPs podem também ser desenhadas de modo a que estas façam um *targeting* seletivo de células e tecidos específicos¹²⁵ – *targeting* ativo - através da incorporação de biomoléculas específicas (como anticorpos, pequenas moléculas, péptidos, etc.) que são reconhecidos pelas células-alvo, melhorando assim o direcionamento, seletividade e internalização das NPs e de agentes terapêuticos associados.

No entanto, vários processos biológicos podem influenciar a entrega sistémica das NPs¹²³, tal como a interação entre proteínas e NPs, a circulação sanguínea das mesmas, a extravasação de NPs para o microambiente tumoral perivascular e a interação com este último, a penetração das NPs no tecido tumoral e a internalização das mesmas por parte das células tumorais. Por sua vez, as propriedades das NPs (como o seu tamanho, geometria, características da superfície, elasticidade, rigidez, porosidade, composição e funcionalização) podem influenciar os processos biológicos referidos, determinando assim o direcionamento, retenção e ação terapêutica das NPs.

As plataformas nanotecnológicas permitem também o *targeting* de vários marcadores tumoral ao mesmo tempo, assim como a entrega de uma ampla gama de agentes terapêuticos de forma simultânea, o que pode resultar numa abordagem sinérgica capaz de lidar com a heterogeneidade tumoral e com a resistência demonstrada por parte das células tumorais e cancerígenas^{123,125}.

Interação Proteína-NP

Quando uma NP entra num ambiente biológico a sua superfície é rapidamente coberta por várias biomoléculas, levando tipicamente à formação de uma “coroa” proteica¹²⁶. A adsorção de proteínas à superfície das NP altera o tamanho, estabilidade e propriedades da mesma, atribuindo simultaneamente uma identidade biológica que determina a resposta fisiológica associada - seja a nível da internalização celular das NPs, do tráfego intracelular, farmacocinética, biodistribuição, toxicidade, eliminação por parte do organismo, etc. Enquanto que NPs funcionalizadas com certos ligandos podem perder a sua capacidade de *targeting* aquando da formação da “coroa” proteica, certas proteínas do plasma associadas a este processo podem melhorar a entrega de NPs em órgãos específicos. No entanto, em ambientes clínicos, a interação entre NPs e proteínas pode também despoletar reações de hipersensibilidade em pacientes ao ativar o sistema de complemento.

Circulação Sanguínea

O tempo de meia-vida das NPs em circulação na corrente sanguínea está relacionado com a eficácia de entrega das NPs – seja esta ativa ou passiva – com particular influência na extravasação passiva para o microambiente tumoral, que também sofre influência da eficiência de extravasação, da intensidade do fluxo sanguíneo na zona referente e na capacidade de perfusão dos tecidos¹²⁷. Para além da filtragem do sangue, um dos principais fatores limitantes do tempo de circulação das NPs é a interação inespecífica entre estas e as proteínas do soro, o que pode promover opsonização e reconhecimento por parte do sistema reticuloendotelial¹²⁸. Técnicas usadas no âmbito de prolongar o tempo de meia-vida de circulação de NPs incluem a funcionalização das mesmas com moléculas estabilizadoras (como por exemplo o polietilenoglicol – PEG - que ajuda a reduzir a adsorção de proteínas a partir da neutralização a carga da superfície das NPs, hidrofobicidade e repulsão estérica), a modulação da rigidez e elasticidade das partículas ou a camuflagem de NPs com marcadores biológicos presentes em células normais de modo a prevenir a ativação do sistema reticuloendotelial.

Extravasação para o Microambiente Tumoral

A extravasação de NPs que se encontram em circulação sistémica para o tecido tumoral pode ser influenciada pela vasculatura tumoral aberrante, pelo microambiente tumoral perivascular e pelas próprias NPs¹²⁷. No entanto, outros fatores como o tempo de meia-vida de circulação das NPs, o tipo de funcionalização das mesmas, a variabilidade da viscosidade do sangue e da pressão oncótica em vários segmentos da vasculatura do microambiente tumoral também são relevantes no movimento

das NPs em relação ao espaço intersticial tumoral. Para além disso, as propriedades físico-químicas das NPs influenciam não só a extravasação das NPs como a acumulação das mesmas no tecido alvo, que por sua vez também sofrem impacto da heterogeneidade tumoral.

Penetração no Tecido Tumoral

Apesar do foco na extravasação e acumulação no processo de entrega das NPs, a penetração uniforme das mesmas no tecido tumoral pode ser crucial na otimização dos resultados^{127,129}. Esta entrega pode ser auxiliada através da funcionalização das NPs com diferentes macromoléculas (por exemplo, dextrans e anticorpos), cujo tamanho e afinidade de ligação afeta a penetração tumoral e a cinética de difusão das NPs no tecido. A funcionalização referida pode melhorar a internalização de NPs por parte das células-alvo, no entanto, pode também reduzir a profundidade que estas alcançam no tumor.

Desafios na difusão das NPs para regiões mais interiores do tumor incluem barreiras fisiológicas intrínsecas ao microambiente tumoral, tais como uma densa matriz de intersticial e uma pressão de fluido intersticial elevada. A internalização inespecífica de NPs por parte de células do estroma podem contribuir para a limitação da difusão das plataformas nanoterapias. A afinação das propriedades físico-químicas das NPs pode apresentar uma solução viável de forma a ultrapassar as barreiras mencionadas. No entanto, enquanto NPs mais pequenas conseguem difundir com mais facilidade através do tecido tumoral, partículas com um tamanho diminuto podem ser rapidamente eliminadas por filtração renal, por exemplo.

Targeting do Microambiente Tumoral

Tendo em conta o importante papel do microambiente tumoral no desenvolvimento, progressão e metástase de tumores, assim como na aquisição de resistência a fármacos por parte das células tumorais, este tem sido considerado um alvo relevante no tratamento do cancro⁷⁹. Assim sendo, modificações feitas no mesmo oferecem uma estratégia alternativa para o melhoramento da acumulação e penetração tumoral por parte das NPs. Quando comparado com células cancerígenas, o *targeting* de células não-tumorais que se encontram no microambiente tumoral (como células do estroma ou da vasculatura tumoral) apresenta particular interesse, visto que estas são provavelmente mais estáveis a nível genético e, como tal, menos suscetíveis ao desenvolvimento de resistência a fármacos, sendo que o equilíbrio entre o alcance de um efeito terapêutico acompanhado de um minimizar de toxicidade para células normais é de particular importância.

Para além do foco no microambiente tumoral do tumor primário, o direcionamento de terapias para as condições ambientais necessárias à sobrevivência e proliferação de células relacionadas com o processo de metástase tem oferecido uma nova abordagem de tratamento, visto que uma possível interferência nas mesmas pode ser particularmente benéfica num aspeto preventivo.

Internalização Celular e Tráfego Intracelular

Uma eficiente internalização celular tem também um papel importante na melhoria da retenção das NPs por parte das células, do efeito EPR e da eficácia terapêutica do tratamento, tendo em conta que muitas nanoterapias requerem uma entrega intracelular de modo a apresentar atividade. Uma das abordagens utilizadas consiste na funcionalização de NPs com ligandos que reconhecem recetores específicos na superfície das células-alvo – *targeting* ativo. O tipo de abordagem mencionada tem particular importância quando a acumulação de NPs não depende do efeito EPR, como em casos de *targeting* vascular ou quando a entrega de agentes terapêuticos necessita de transcitose ativa de barreiras fisiológicas (como a barreira hematoencefálica, por exemplo)^{125,127}.

Posteriormente à internalização, as NPs necessitam de libertar as suas cargas terapêuticas para difusão destas ao longo dos compartimentos celulares até atingirem o(s) seu(s) alvo(s) ou de ser direcionadas através das vias de tráfego intracelular de modo a atuar na localização subcelular apropriada¹²³. Para entrega citosólica de certas biomacromoléculas, como ASOs ou siRNA, o escape endossomal e o desenvolvimento de estratégias que aumentem da sua eficiência é crucial¹³⁰. Atualmente, diferentes mecanismos de realização do escape endossomal têm sido propostos, tais como a formação de poros na membrana do endossoma, o efeito de “esponja de protões”, fusão membranar entre o endossoma e NPs lipídicas e a disrupção fotoquímica da membrana endossomal. O uso de vários agentes biológicos e químicos de modo a facilitar o escape endossomal têm também sido investigado.

Libertação Controlada de Agentes Terapêuticos

Algo igualmente importante de ter em conta remete para possível libertação gradual de carga terapêutica durante a circulação associada às NPs administradas de forma sistémica¹³¹. Com isto, partículas com longos tempos de circulação e baixos níveis de extravasação para o tecido tumoral podem apresentar relativamente pouca carga aquando da altura de chegada ao microambiente tumoral. Assim sendo, de modo a otimizar os resultados, o design de plataformas nanoterapêuticas requer um profundo entendimento de diversos parâmetros e da interconexão entre os mesmos, tais como a

farmacocinética das NPs e dos agentes terapêuticos, a relação entre a concentração de NPs e agentes associados ou separados e a diferença existente dos parâmetros anteriores no plasma e no tecido tumoral.

Com a finalidade de controlar de forma precisa a liberação de agentes terapêuticos, diversas plataformas nanoterapêuticas responsivas a estímulos têm sido desenvolvidas. De forma geral, estas NPs são desenhadas de modo a reconhecer mudanças discretas associadas ao microambiente tumoral e às células tumorais (como variações no pH, no estado redox ou reação com enzimas específicas do meio) ou de modo a sofrer ativação por estímulos externos (como calor, luz, campo magnético ou ultrassons), para induzir a liberação das suas cargas terapêuticas.

1.2.1. Plataformas Nanotecnológicas e Terapia Genética

Nos últimos anos, várias plataformas nanotecnológicas têm sido elaboradas e empregues no desenvolvimento de novas terapias aplicáveis ao tratamento do cancro. Estas plataformas têm por base compostos orgânicos e/ou inorgânicos, lípidos, proteínas e polímeros sintéticos, e incluem lipossomas, micelas, dendrímeros e NPs metálicas e poliméricas, que por sua vez podem ser sintetizadas numa multitude de composições químicas e apresentar uma ampla gama de propriedades físicas características (Tabela 1.3)^{82,132-134}.

Dos diferentes tipos de plataformas mencionados, os lipossomas foram a primeira classe de NPs terapêuticas a obter aprovação clínica para uso no tratamento do cancro. Juntamente com outras NPs de base lipídica, estas plataformas representam uma grande porção das NPs terapêuticas aplicadas a nível clínico, sendo que o encapsulamento de fármacos neste tipo de NPs tem contribuído para uma ampla melhoria na farmacocinética e na biodistribuição dos mesmos. NPs de albumina associadas a paclitaxel foram também posteriormente comercializadas, visto que estas plataformas permitem a formulação de fármacos hidrofóbicos mitigando simultaneamente o uso de excipientes tóxicos, o que resulta potencialmente num fármaco mais bem tolerado em doses mais elevadas e com uma administração mais rápida, permitindo assim uma maior concentração de fármaco no organismo. Outras plataformas nanotecnológicas como micelas e NPs poliméricas e NPs inorgânicas (como NPs de ouro, SPIONs, grafeno, *Quantum Dots*, etc.) têm sido investigadas com particular interesse no tratamento do cancro. Devido à sua origem endógena, os exossomas têm também sido propostos como vetores capazes de carregar cargas anticancerígenas de forma direcionada para os tumores. O uso de NPs virais (por exemplo, AAV e lentivírus) como vetores de entrega de agentes terapêuticos (principalmente de ASOs ou siRNA para efeitos de terapia genética) tem também sido cada vez mais facilitado através do aprimoramento de técnicas de engenharia genética e química.

A área da nanotecnologia tem visto vários avanços em anos recentes, tanto em relação ao desenvolvimento de novos materiais como na sua aplicação num número crescente de áreas, sendo a terapia genética uma área de particular interesse no tratamento de diversas doenças¹³⁵. Atualmente, vetores virais demonstram ser sistemas atrativos para aplicações de terapia genética, visto que apresentam uma elevada eficiência de transfeção que de momento dificilmente é igualada por vetores não-virais. No entanto, apesar da vantagem mencionada, os vetores virais podem frequentemente ativar e provocar uma reação por parte do sistema imunitário do organismo, o que por sua vez pode reduzir a eficiência de *gene delivery* subsequente. A utilização de vetores não-virais em terapia genética oferece a hipótese de evitar uma resposta por parte do sistema imunitário, com a vantagem de potencialmente permitir o transporte de maiores cargas terapêuticas. A mitigação das desvantagens atuais no uso de

vetores não-virais está associada ao avanço na área dos nanomateriais, que tem proporcionando um aumento da eficiência de transfeção e a navegação através de múltiplas barreiras biológicas por parte das NPs em questão.

Diferentes tipos de nanomateriais têm sido desenvolvidos como potenciais vetores não-virais para terapia genética (Tabela 1.3) sendo de seguida destacados alguns deles, nomeadamente, as formulações lipossomais e as nanopartículas de ouro (AuNPs).

Tabela 1.3 - Tipos de nanopartículas (NPs) usadas como *nanocarriers* na terapia do cancro e em terapia genética (adaptado de *Ferreira et al,2020*).

Tipos de NPs	Características	Aplicações	Limitações	Exemplos	Terapia Genética	Refs
Dendrímeros	Pequenas (1-15 nm) NPs poliméricas ramificadas. Alta solubilidade em água e alta capacidade de carregamento com agentes terapêuticos.	<i>Targeting</i> de células cancerígenas e tecidos danificados.	Síntese demorada; alguns desafios relativos à toxicidade na incorporação e libertação de fármacos.	Dendrímeros PAMAM usados em sistemas de entrega de fármacos.	Dendrímeros ricos em ácido borónico usados como vetores para CRISPR/Cas9.	136-139
Lipossomas	Nanoestruturas compostas por moléculas anfipáticas (normalmente, lípidos) com boa biocompatibilidade e <i>uptake</i> celular.	<i>Delivery</i> de cargas hidrofílicas ou hidrofóbicas dependendo da constituição lipídica.	Baixa estabilidade, degradação rápida e <i>clearance</i> por parte do organismo. Possível desencadeamento de oxidação lipídica (longo prazo)	Doxorrubicina incorporada numa formulação lipossomal sensível à temperatura - ThermoDox® (Celsion) – em fase III de ensaios clínicos para o tratamento de carcinoma hepatocelular primário.	Sistemas lipídicos para <i>delivery</i> de siRNA.	139-142
NPs poliméricas	Podem ser naturais (proteínas e polipéptidos) ou sintéticas. Biocompatibilidade e biodegradabilidade.	Libertação controlada de fármacos, proteção de moléculas terapêuticas e <i>targeting</i> específico.	Baixa eficiência de transfeção e alguma citotoxicidade.	A polietilenoimina (PEI) é a mais usada em complexos iónicos <i>nanosized</i> (poliPLEXOS).	<i>Delivery</i> de DNA plasmídeo (CRISPR/Cas9) em PLGA.	143-145

Tabela 1.3 - Tipos de nanopartículas (NPs) usadas como *nanocarriers* na terapia do cancro e em terapia genética (adaptado de *Ferreira et al,2020*) (continuação).

Tipos de NPs	Características	Aplicações	Limitações	Exemplos	Terapia Genética	Refs
NPs de carbono	<i>Carbon dots</i> , grafeno, óxidos e nanotubos de carbono (CNT). Propriedades óticas e mecânicas únicas.	Aplicações em técnicas de imagem e entrega de fármacos.	Citotoxicidade.	Sistemas de <i>drug delivery</i> responsivos a estímulos.	<i>Delivery e tracking</i> intracelular de siRNA	146-148
<i>Quantum Dots</i>	<i>Quantum Dots</i> são sondas luminescentes que apresentam alta fotoestabilidade.	Usados em imagem médica, detecção e <i>targeting</i> .	Elevada toxicidade devido ao CdSe (núcleo metálico das NPs)	Os <i>Quantum Dots</i> podem atuar como foto-sensibilizadores, produzindo espécies reativas de oxigénio (ROS) após irradiação com luz.	Não existem relatos de aplicações clínicas nesta área.	149,150
AuNPs	NPs de núcleo metálico com propriedades óticas e físico-químicas únicas.	Principalmente usadas para aplicações de <i>labelling</i> ; pode ser usada como ferramenta de diagnóstico.	Citotoxicidade, biodistribuição e tempo de retenção das NPs.	AuNPs podem ser usadas como agentes fototérmicos em hipertermia e como <i>nanocarriers</i> para silenciamento génico.	<i>Delivery</i> de CRISPR/Cas9 com/sem estímulo externo.	151-154
NPs magnéticas (MNP)	Atuam com ação de um campo magnético externo.	Imagem médica.	Citotoxicidade do núcleo de ferro.	Ferucarbotran (Resovist®) – nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) clinicamente aprovadas cobertas com carboxidextrano para melhoria do contraste de MRI no fígado.	CRISPR/Cas9-PEI-MNP.	155-157

1.2.1.1. Formulações Lipossomais

As formulações lipossomais têm sido dos sistemas de *delivery* mais populares, sendo empregues na melhoria da eficiência de entrega de agentes terapêuticos devido ao seu elevado grau de biocompatibilidade. A capacidade que os lipossomas apresentam de entregar diversos tipos de cargas, como fármacos usados em quimioterapia, oligonucleótidos (ASOs e siRNA), antígenos e proteínas, tem contribuído para o sucesso dos mesmos como métodos entrega de agentes terapêuticos¹⁵⁸.

Os lipossomas são definidos como vesículas unilamelares ou multilamelares de diferentes tamanhos (como, GUVs - *giant unilamellar vesicles*; MLVs - *multilamellar vesicles*; SUVs - *small unilamellar vesicles* e LUVs - *large unilamellar vesicles*), compostos primariamente por fosfolípidos – fosfatidilcolina (PC), esfingomiéline (SM), fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) – que são moléculas anfipáticas que, quando expostas a água, formam uma bicamada fosfolipídica que envolve uma fase interior aquosa¹⁵⁹. A superfície dos lipossomas pode ser coberta com certas moléculas, como PEG ou alguns açúcares, de modo a evitar a deteção e eliminação destes por parte do sistema reticuloendotelial e a aumentar o tempo de meia-vida de circulação dos mesmos. A funcionalização com PEG proporciona também um *linker* para a ancoragem de diferentes ligandos, como por exemplo, agentes responsáveis por *targeting* específico e direcionado para certos recetores nas superfícies das células-alvo, como alguns péptidos, anticorpos monoclonais, aptâmeros e certos compostos químicos^{158,159}.

As formulações lipossomais oferecem várias vantagens como sistemas de entrega de TNAs, nomeadamente, a sua capacidade de prevenir a degradação da carga terapêutica, ocorrer acumulação preferencial no tecido tumoral (*targeting* passivo) e entrega de elevadas concentrações de carga, direcionar especificamente TNAs para as células tumorais e para o microambiente tumoral (*targeting* ativo) e fornecer plataformas seguras e eficientes dependendo do conteúdo lipídico das formulações¹⁶⁰. Com isto, as formulações lipossomais têm demonstrado elevada eficiência na manutenção de altas concentrações de fármacos com reduzida biodisponibilidade, no entanto, para uma entrega bem sucedida de TNAs através de sistemas de base lipídica, é necessário haver a otimização da composição lipídica das formulações, do rácio entre lípido e agente terapêutico, do tamanho e carga das partículas, das modificações e características da superfície e da eficiência do encapsulamento da carga e da produção dos mesmos¹⁶¹.

Tradicionalmente, os lipossomas catiónicos têm sido os mais usados como sistemas de entrega de oligonucleótidos (siRNA, ASOs, etc.), sendo os lípidos constituintes, como o DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano), capazes de originar complexos com o oligonucleótido

negativamente carregado a partir de interações eletrostáticas – lipoplexos^{135,161}. Estes lipoplexos são capazes de interagir facilmente com a superfície extracelular da membrana celular negativamente carregada, o que promove a internalização das NPs e a consequente entrega da carga terapêutica a nível celular, no entanto, a interação facilitada pode levar à diminuição de especificidade e seletividade na entrega de TNAs, maior interação entre NPs e proteínas do soro ou até à estimulação de uma resposta imunitária. Um dos principais problemas remetentes ao uso de lipossomas catiónicos reside também na toxicidade dos mesmos após administração sistémica, estando estes associados à indução de ROS por exemplo. Assim sendo, é necessário o estudo mais aprofundado e a seleção mais cuidada dos lípidos e estratégias a implementar na síntese de formulações.

Para ultrapassar alguns dos problemas associados a *carriers* carregados, incluindo lipossomas catiónicos e *carriers* negativamente carregados, lípidos neutros como DOPC (Dioleoil fosfatidilcolina), DPPC (Dipalmitoilfosfatidilcolina) e DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina) têm sido usados na preparação de formulações lipossomais, sendo que a maioria dos lipossomas aplicados a *gene delivery* são compostos por uma combinação de lípidos carregados e lípidos neutros^{135,161}. As desvantagens enunciadas têm também levado ao estudo de outras alternativas, como o uso de lipossomas aniónicos como potenciais veículos para *gene delivery*¹⁶⁰. No entanto, o uso de lípidos aniónicos para tal efeito não tem demonstrado alta eficácia, principalmente por estes apresentarem uma baixa eficiência de encapsulamento de TNAs devido às forças de repulsão existentes entre a cadeia de fosfato dos oligonucleótidos e as cabeças aniónicas dos lípidos. De modo a facilitar o processo de formação de lipoplexos aniónicos, catiões divalentes têm sido aplicados na mitigação das forças de repulsão eletrostática mencionadas com o intuito de possibilitar o encapsulamento de TNAs.

Plataformas nanotecnológicas com uma base lipídica sólida têm também sido desenvolvidas para a entrega sistémica de oligonucleótidos, como SNALPs (*stable nucleic acid-lipid particles*) e SLNs (*solid lipid nanoparticles*)^{135,161}. Os SNALPs consistem numa bicamada lipídica contendo uma mistura de lípidos catiónicos e fusogénicos que permitem o *uptake* e a libertação endossomal de TNAs, com particular sucesso na entrega de siRNA. As SLNs são compostas por moléculas como éster de colesterol, triglicéridos, colesterol, DOPE (Dioleoil fosfatidiletanolamina), etc. Estes *carriers* possibilitam um silenciamento génico direcionado eficiente e uma maior estabilidade no soro com reduzida citotoxicidade, apesar de este obstáculo continuar a apresentar uma elevada importância.

Outro tipo de formulações como partículas lipóides e conjugados lipofílicos de siRNA têm sido desenvolvidos para uma entrega específica e mais eficiente de TNAs, com foco principal em siRNA^{162,163}.

Apesar das imensas vantagens associadas a grande parte dos tipos de formulações enumerados, certos desafios comuns como a toxicidade dos lipossomas ou a falta de estabilidade destes em arrecadação (seja por agregação dos mesmos, vazamento do agente terapêutico, etc.) precisam ainda de ser solucionados¹⁵⁸.

1.2.1.2. Nanopartículas de Ouro

Nanopartículas metálicas como NPs de óxido de ferro (IONs), NPs de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs), NPs de prata (AgNPs) e NPs de ouro (AuNPs) têm sido bastante usadas em múltiplas aplicações biomédicas devido às suas propriedades físico-químicas, que são fortemente dependentes do tamanho, morfologia, área de superfície, carácter anfipático e biocompatibilidade. Grande parte destas NPs são normalmente sintetizadas a partir de procedimentos relativamente simples, e podem ser facilmente funcionalizadas com uma ampla variedade de biomoléculas (como, ácidos nucleicos, proteínas, fármacos, etc.) de modo a apresentarem atividade biológica^{89,164,165}.

Nanopartículas magnéticas (MNPs) têm sido especialmente usadas como agentes de contraste com o objetivo de melhorar a resolução e acurácia de técnicas de MRI, melhoria esta que advém da capacidade de, após exposição a um campo magnético externo, as MNPs exibirem tempos de relaxamento distintos que contribuem para a discriminação das imagens obtidas dependendo dos tecidos envolventes. Adicionalmente, MNPs têm também sido usadas como *nano-carriers*, visto que o uso de um campo magnético pode resultar numa acumulação preferencial das NPs num local desejado do organismo. Ao aplicar campos magnéticos alternados, as MNPs podem atuar como “conversores de calor”, contribuindo para estratégias dependentes de hipertermia moderada, cuja aplicação tem demonstrado melhorias na eficiência de *gene delivery* em compartimentos celulares, melhorando assim os efeitos de silenciamento génico consequentes¹⁶⁶⁻¹⁶⁹.

De entre os diferentes tipos de NPs metálicas, as AuNPs têm mostrado promessa na sua aplicação em terapia genética, o que advém da sua capacidade como *carriers* específicos e eficientes para entrega de TNAs, o que é potenciado pela possibilidade de uma entrega combinatória de TNAs com por exemplo, fármacos ou anticorpos, e pela sua facilidade de síntese e funcionalização com diferentes moléculas, promovendo a possibilidade de terapia sinérgica e

combinada¹⁷⁰. A biocompatibilidade e as propriedades físico-químicas das AuNPs, com destaque às suas propriedades óticas derivadas do efeito localizado de SPR, contribuem fortemente para o uso das mesmas como sistemas de diagnóstico em cancro, sendo utilizadas atualmente em testes colorimétricos e terapias fototérmicas (PTT) para o tratamento do cancro, por exemplo⁹⁴.

Dependendo dos procedimentos e condições usados na síntese de AuNPs, estas podem apresentar várias morfologias e, conseqüentemente, diferentes características. Dentro dos diferentes tipos de AuNPs descritos, existem *nanospheres* (AuNSs), *nanorods* (AuNRs), *nanoshells* (AuNShs), *nanocages* (AuNCgs), *nanostars*(AuNSTs), *nanoboxes* (AuNbs), *nanocubes* (AuNCus), *nanoclusters* (AuNCIs), *nanocrystals* (AuNCrs) e *triangular bipyramids* (AuBps)^{94,170}.

As AuNSs têm sido descritas como vetores adequados para terapia genética, o que advém da sua fácil sintetização e funcionalização, da elevada razão entre área de superfície e volume das NPs, da alta eficiência de internalização por parte de células-alvo e escape endossomal e da sua usual baixa citotoxicidade e alta biocompatibilidade^{89,108}. Conseqüente de algumas propriedades das NPs, como a carga de superfície e polaridade das mesmas, o *uptake* celular ocorre por transporte ativo, principalmente por endocitose através das vias disponíveis – endocitose mediada por clatrina, calveolina ou independente de ambos¹⁷¹.

As AuNPs esféricas têm também sido descritas como potenciais ferramentas para o tratamento de cancro, apresentando múltiplos modos de ação como hipertermia, entrega de fármacos e TNAs, etc. Uma das principais vantagens das AuNSs é a sua capacidade de entregar TNAs de forma seletiva e eficiente a células-alvo, evitando a degradação destes por nucleases. No entanto, uma limitação comum da sua aplicação é a estabilidade do coloide, nomeadamente a agregação destes nanoconjugados após funcionalização com oligonucleótidos ou introdução em ambientes biológicos, visto que a agregação de AuNPs pode ser induzida a partir de componentes do meio, proteínas do soro ou pela formação de uma “coroa” proteica, o que por sua vez influencia fortemente a interação entre AuNPs e células, a concentração efetiva de AuNPs no organismo e a internalização por parte das células^{89,172,173}.

De modo a atenuar as limitações apresentadas por AuNPs esféricas usadas na entrega de TNAs, várias estratégias de funcionalização têm sido descritas. Dadas as propriedades de superfície das AuNPs e da facilidade existente na funcionalização da mesma, uma panóplia de moléculas pode ser conjugada à superfície das AuNPs para efeitos de entrega de TNAs com o âmbito de garantir uma maior eficiência de entrega e internalização por parte das células-alvo. Tipicamente, a funcionalização de AuNPs ocorre por adsorção das moléculas desejadas à superfície das AuNPs quer por ligações covalentes, sendo a ligação entre ouro-tiol a mais comum, quer por

interações eletrostáticas¹⁷⁴. Estas técnicas de estabilização incluem o uso de monocamadas de nucleótidos, polímeros, ou lípidos catiónicos^{175,176}.

Para efeito de silenciamento genético, moléculas de PEG, PEI e PG são as mais utilizadas, havendo um maior destaque no uso da primeira como estabilizador. Estas moléculas conferem uma carga de superfície mais neutra às AuNPs funcionalizadas com TNAs, efeito essencial para o aumento da biocompatibilidade, solubilidade e tempo de circulação em ambientes biológicos, consequente da diminuição da degradação enzimática, interação com proteínas do plasma e maior evasão de uma resposta imunitária no organismo¹⁷⁰.

A funcionalização de AuNPs com TNAs pode ser realizada de diferentes formas, podendo ocorrer por interações eletrostáticas^{89,177}, por exemplo, através da ligação de ácidos nucleicos carregados negativamente à superfície positivamente carregada das AuNPs, ou por funcionalização com oligonucleótidos tiolados, oligonucleótidos com um terminal alquiltiol, siRNAs com um terminal amina ou com miRNAs com um terminal cisteamina¹⁷⁸. A afinidade das AuNPs para ligação com oligonucleótidos ou outras biomoléculas que contendo grupos tiol contribui extensivamente para o uso destas NPs como veículos na entrega de TNAs, sendo estes sistemas usados numa variedade de aplicações de silenciamento genético e *tracing* de genes-alvo específicos como ferramenta de diagnóstico.

Como tal, o design AuNPs e a montagem dos ácidos nucleicos nas mesmas em nanoconjugados funcionais influenciam fortemente a entrega dos TNAs. Dentro da gama de estratégias existentes para a conjugação de TNAs em AuNPs, as abordagens mais usadas para aplicações de silenciamento genético têm por base ligações covalentes, em que a interação entre o enxofre presente em oligonucleótidos tiolados e o ouro presente na superfície das NPs (ligação S-Au) apresenta um papel fundamental, ou a montagem supramolecular de TNAs, visto que esta permite o uso de ácidos nucleicos não-modificados. Outras opções para o carregamento de TNAs em AuNPs incluem *mixed-monolayer-protected* AuNPs (MM-AuNPs)¹⁷⁹, *amino acid-functionalized* AuNPs (AA-AuNPs)¹⁸⁰, *layer-by-layer fabricated* AuNPs (LbL-AuNPs)¹⁸¹. Os diferentes métodos de síntese e funcionalização de AuNPs podem contribuir também para o desenvolvimento de estratégias que permitem a libertação controlada de ácidos nucleicos¹⁸². A libertação controlada e responsiva a estímulos de TNAs pode ser alcançada por diferentes processos, sendo que a maioria destas estratégias depende das condições da matriz extracelular do tecido-alvo, como o pH, temperatura, força iónica, atividade enzimática ou reatividade intracelular, como aqueles mediados por redução intracelular da ligação tiol (por exemplo, por glutatona e GSH)¹⁸³. Outros processos dependem da aplicação externa de estímulos, como irradiação num comprimento de onda

adequado, ultrassons, etc., que podem resultar na liberação controlada de TNAs num espaço e tempo desejados¹⁸⁴.

Com particular interesse para a terapia do cancro, diversas combinações sinérgicas com base em AuNPs têm sido desenvolvidas de modo a aumentar a eficiência do tratamento. O uso de AuNPs funcionalizadas com oligonucleótidos permite combinar a capacidade de silenciamento génico com outros aspetos terapêuticos, como a ação de fármacos, a ablação fototérmica direcionada ao ambiente tumoral, etc^{94,170}. Por exemplo, a utilização de fototerapia suave pode ser usada para aumentar a fluidez da membrana celular, facilitando assim o *uptake* celular e o escape endossomal por parte das AuNPs.

Apesar da potencialidade evidenciada para o tratamento de cancro por AuNPs como veículos para terapia genética e gene silencing, ainda existe a necessidade de realizar estudos toxicológicos para averiguar qual o impacto real destes vetores em sistemas biológicos.

1.2.2. Combinação de Lipossomas e Nanopartículas de Ouro

Como mencionado anteriormente, as AuNPs apresentam imensas potencialidades aplicáveis ao tratamento do cancro, que variam desde o seu uso em técnicas de imagem, terapia fototérmica, radioterapia ou como vetores para terapia genética⁹⁴. Ainda assim, a eficácia das terapias baseadas em AuNPs depende do sucesso na entrega destas partículas ao local tumoral e na internalização das mesmas por parte das células-alvo, sendo que ainda existem desafios significativos a este nível associados à estabilidade e agregação de AuNPs nuas (o que faz com que estas percam as suas propriedades óticas), tempo de circulação no organismo, interação com proteínas do soro, ativação de uma resposta imunitária, etc. Desta forma, modificações adequadas, como a complexação e funcionalização de AuNPs com moléculas biocompatíveis e bioativas, têm vindo a permitir o aumento da estabilidade das partículas e da sua capacidade de *targeting*, desenvolvendo este que tem sido fulcral no seu uso em aplicações biomédicas⁹⁴.

Devido à já estabelecida eficiência de entrega de várias cargas terapêuticas por parte de lipossomas, a combinação destes com AuNPs apresenta uma possível abordagem para a melhoria da estabilidade e do tempo de circulação das partículas *in vivo*, juntamente com um aumento da internalização de AuNPs por parte das células-alvo^{185,186}. Atualmente, existem três principais tipos de complexos formados pela combinação de AuNPs e lipossomas (Figura 1.3): o primeiro consiste na encapsulação de AuNPs hidrofílicas carregadas negativamente, em que as AuNPs se encontram presentes na fase aquosa dos lipossomas; o segundo é formado por lipossomas em que AuNPs com superfícies hidrofóbicas se encontram integrados na bicamada lipídica; e o terceiro é composto por lipossomas modificados, em que AuNPs são conjugados à superfície dos lipossomas via adsorção física. Estes complexos podem ser sintetizados usando diferentes tipos de lípidos, como lípidos catiónicos e lípidos modificados com PEG, que têm demonstrado contribuir de forma benéfica na entrega de fármacos e em aplicações de *gene delivery*¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Para além disso, a superfície destes complexos formados por lipossomas e AuNPs pode ser funcionalizada com moléculas bioativas capazes de promover o *targeting* de tecidos e populações celulares específicas. As características dos complexos formados estão dependentes, entre outros, do processo de sintetização, da razão entre lípidos e AuNPs e do tamanho destes últimos, que pode influenciar a integridade da membrana dos lipossomas e provocar vazamento indesejado dos mesmos.

Devido às propriedades intrínsecas dos lípidos e AuNPs constituintes dos complexos em questão, estratégias para a libertação controlada de AuNPs combinadas com lipossomas têm sido desenvolvidas. Uma destas estratégias tem por base a incidência de radiação como mediador da transferência de calor produzido consequentemente por parte das AuNPs, de forma localizada,

para os lípidos constituintes dos lipossomas, com o intuito de sensibilizar e destabilizar a membrana lipossomal permitindo assim o escape das AuNPs¹⁸⁸.

Com isto, diferentes tipos de complexos formados pela combinação de AuNPs e lipossomas têm sido propostos como ferramentas de teragnóstico com potenciais aplicações em biomedicina.

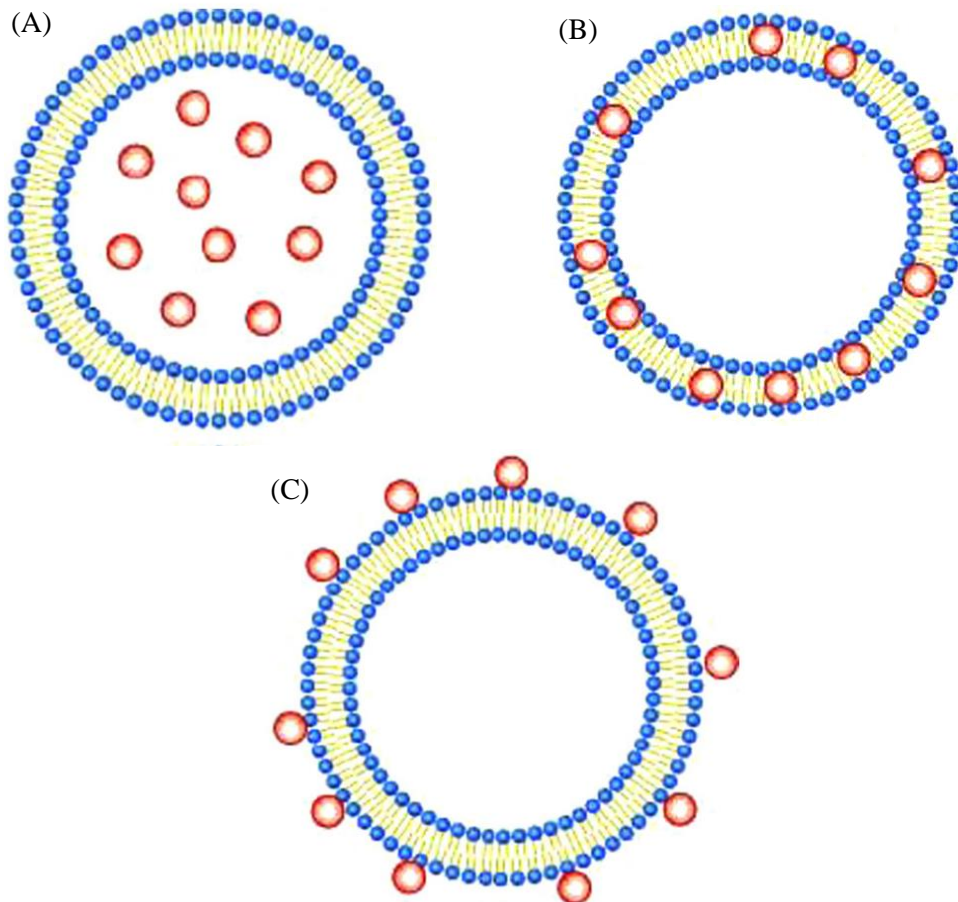


Figura 1.3 – Representação esquemática de diferentes tipos de complexos formados pela combinação de AuNPs e lipossomas. (A) Encapsulação de AuNPs em lipossomas; (B) Incorporação de AuNPs nas membranas dos lipossomas; (C) Conjugação de AuNPs na superfície dos lipossomas. (Adaptado de *Kojima et al. 2008*)¹⁸⁷.

1.3. Contexto e Objetivos

A utilização de lipossomas em *gene delivery* tem visto um grande desenvolvimento em anos recentes com a progressão da nanomedicina e da medicina de precisão. Neste contexto, formulações contendo diferentes proporções e tipos de lípidos têm sido desenvolvidas de modo a controlar a entrega da carga lipossomal consoante o local e tempo desejado. Algumas destas formulações têm sido combinadas com outros tipos de nanopartículas de modo a melhorar o efeito desejado, como por exemplo, nanopartículas de ouro.

Os oncogenes desempenham vários papéis importantes na progressão do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular. A sua sobreexpressão desregula a expressão de vários outros genes estando na origem de diversos tipos de tumores através de translocação cromossômica, amplificação e ativação de vias de sinalização e do aumento de estabilidade proteica. Mesmo quando não são diretamente responsáveis pela origem do tumor, estes genes estão normalmente envolvidos em vias regulatórias, muitas das quais são essências em medicina direcionada.

Diferentes sistemas à nano-escala têm demonstrado um elevado potencial para a vectorização de moléculas com aplicações em terapia genética (como RNAi, siRNA, ASOs, etc.) devido às propriedades intrínsecas dos nano-sistemas e da possibilidade de carregamento e *targeting* dos mesmos. A avaliação da capacidade de silenciamento e do seu impacto na viabilidade das células tumorais, sozinho ou em combinação com terapias tradicionais e/ou novos agentes terapêuticos, são passos fundamentais no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Este projeto tem como objetivos a síntese e caracterização de nanoconjugados de ouro, diferentes formulações lipossomais e de complexos formados pela combinação de ambos, e o silenciamento do oncogene *c-MYC* na linhagem celular HCT116, usando as nanopartículas de ouro funcionalizadas com ssDNA, isoladas e/ou em combinação com as diferentes formulações lipossomais de modo a avaliar a eficácia das mesmas contra células da linhagem tumoral indicada.

2. Materiais e Métodos

2.1. Síntese e Caracterização dos Nanoconjugados de Ouro

2.1.1. Síntese de Nanopartículas de Ouro

Nanopartículas de ouro com aproximadamente 14 nm de diâmetro foram sintetizadas usando o método de redução por citrato^{189,190}. Este método possibilita uma produção simples e em grande quantidade de AuNPs esféricas, monodispersas e hidrofílicas, compatíveis com passos de funcionalização subsequentes, com a vantagem adicional da possível modificação do diâmetro das AuNPs sintetizadas, até certo ponto, via modulação da razão entre o citrato e os sais de ouro usados.

As AuNPs foram preparadas numa *hotte* e o material de vidro usado na síntese foi lavado com *aqua regia* (3:1 HCl:HNO₃) de modo evitar a contaminação por parte de outros metais. A *aqua regia* foi então removida e o material lavado com água MiliQ. 225 mL de uma solução a 1mM de H₂AuCl₄ foram inseridos dentro de um balão de fundo redondo de dois pescoços, juntamente com um magneto. Um condensador foi ligado a um dos pescoços e tampa foi posta no pescoço restante para evitar perdas de volume. O sistema foi então colocado em cima de um agitador magnético com aquecimento. Quando refluxo foi iniciado, 25 mL de uma solução de citrato de sódio a 38.8 mM foram rapidamente adicionados e a mudança de cor da solução de amarelo pálido a vermelho escuro foi observada. O sistema foi mantido em refluxo durante aproximadamente mais 30 minutos. Posteriormente, foi desligado o aquecimento e o sistema foi arrefecido a temperatura ambiente em agitação, protegido da luz. Por fim, a solução coloidal de AuNPs obtida foi filtrada para tubos Falcon de 50 mL usando filtros de 0.1 µm.

2.1.2. Funcionalização das Nanopartículas de Ouro

As AuNPs produzidas foram primeiramente funcionalizadas com PEG modificado com um grupo tiol na posição 5' ($C_{15}H_{32}O_7S$, 356,48 Da) (AuNP@PEG), de modo a saturar 30% da superfície das nanopartículas¹⁹⁰. AuNP@PEG foram obtidas ao preparar 30 mL de uma solução aquosa de SDS (0.028%) contendo 10 nM (concentração final) de AuNPs sintetizadas como anteriormente descritas e 0.003 mg/mL (concentração final) de PEG. Esta mistura foi incubada durante aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, foi adicionada uma solução de NaOH até alcançar uma concentração final de 25 mM e a mistura foi incubada durante 16 horas a temperatura ambiente com agitação suave e protegida da luz. Finalmente, a solução foi distribuída por tubos de centrífuga, sendo estes centrifugados a $21460\times g$ durante 30 min a 4°C e retirado o sobrenadante. As AuNP@PEG foram lavadas ressuspensando o precipitado oleoso em água MilliQ e realizando uma nova centrifugação de modo a obter uma solução mais concentrada.

Parte das AuNP@PEG foram subsequentemente funcionalizadas com o oligonucleótido tiolado: 5' – GCGCCCATTTCTTCCAGATATCCTCGCTGGGCGC – 3' (sequência palindrômica sublinhada; a sequência para targeting de mRNA de *c-MYC* foi retirada de GenBank NM_002467.5) (AuNP@PEG@MYC). Uma sequência palindrômica foi adicionada de modo a permitir a formação de uma estrutura *stem-loop* e a sequência de ssDNA final foi analisada usando o software NUPACK.

Os oligonucleótidos tiolados foram misturados com DTT (concentração final 0.1 M) e incubados durante aproximadamente 2 horas a 4°C. Um volume da mistura foi extraído com dois volumes de acetato de etilo, sendo a solução resultante centrifugada por 3 minutos a $10000\times g$ e a fase orgânica descartada (este processo foi realizado 3 vezes). A fase aquosa resultante foi purificada usando uma coluna NAP-5 dessalinizante de acordo com as instruções de fabrico, utilizando como eluente uma solução de tampão fosfato a 10 mM (pH 8). Os oligonucleótidos purificados obtidos foram então quantificados através de espectrofotometria UV-Visível, aplicando a lei de Lambert-Beer e o coeficiente de extinção molar do oligonucleótido a 260 nm.

A funcionalização das AuNP@PEG com os oligonucleótidos preparados foi realizada usando o método de *salt-aging*¹⁹¹, que consiste no uso de NaCl para modelação das forças eletrostáticas existentes entre as partículas de ouro, o citrato e os oligonucleótidos, com a finalidade de obter AuNPs estáveis funcionalizadas com uma elevada densidade de oligonucleótidos.

Assim, os oligonucleótidos purificados foram misturados com as AuNPs@PEG preparadas anteriormente numa proporção de 1:100 (AuNP@PEG:Oligonucleótido). Foi então adicionada solução AGE I até atingir uma concentração final de tampão fosfato de 10 mM (pH 8) e 0.01%

(w/v) de SDS, e a solução resultante ficou a incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A força iónica da solução foi sequencialmente aumentada ao adicionar volumes apropriados de solução AGE II até uma concentração final de 10 mM tampão fosfato (pH 8), 0.05 M NaCl e 0.01% (w/v) de SDS, incubando a mistura durante 20 minutos. O passo anterior foi repetido para concentrações finais de NaCl de 0.1 M, 0.2M e 0.3 M. Após a última adição de AGE II, a solução ficou a incubar durante 16 horas a temperatura ambiente, com agitação leve e protegida de luz. A solução contendo AuNP@PEG@MYC resultantes foi distribuída por tubos de centrífuga e centrifugada a 21460×g durante 30 minutos, o sobrenadante foi removido e guardado o precipitado oleoso ressuspenso com água tratada com DEPC. As AuNP@PEG@MYC foram lavadas desta forma por um total de três vezes.

O número de oligonucleótidos à superfície de cada AuNP@PEG@MYC foi determinado ao elaborar uma reta de calibração usando soluções nas mesmas condições (10 mM de tampão fosfato a pH 8, 0.01% SDS e 0.3 M NaCl) diferentes concentrações de oligonucleótido, e determinando a quantidade de oligonucleótidos presentes nos sobrenadantes armazenados. Subtraindo a quantidade de oligonucleótidos encontrados nos sobrenadantes à quantidade de oligonucleótidos inseridos inicialmente, foi possível determinar o número de oligonucleótidos à superfície de cada nanopartícula.

2.1.3. Caracterização dos Nanoconjugados de Ouro

Os diferentes nanoconjugados (AuNP, AuNP@PEG, AuNP@PEG@MYC) foram caracterizados através de espectrofotometria UV-Visível, DLS (*Dynamic Light Scattering*) e Potencial Zeta. Vários espectros de absorvância das nanopartículas de ouro com os diferentes níveis de funcionalização foram obtidos usando espectrofotometria UV-Visível, o que permitiu determinar aproximadamente qual o diâmetro das mesmas usando o método desenvolvido por Haiss *et al.*^{192,193} e, conseqüentemente, indicar a concentração de nanopartículas de ouro em solução através da aplicação da lei de Lambert-Beer. O diâmetro hidrodinâmico dos diferentes nanoconjugados foram determinados por DLS. Esta técnica também permitiu a confirmação do carácter monodisperso das populações de nanopartículas de ouro. A análise foi realizada a 25 °C, com um ângulo de dispersão de 90°, usando água como meio de dispersão. O mesmo aparelho foi utilizado para a determinação do potencial zeta dos diversos nanoconjugados, fornecendo assim uma medida de magnitude da repulsão ou atração eletrostática ou das cargas entre as partículas.

2.2. Síntese e Caracterização dos Nanoconjugados Lipídicos

A preparação e caracterização das formulações lipossomais e a combinação dos nanoconjugados de ouro com lipossomais foram realizadas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL) com a ajuda atenciosa da Doutora Manuela Colla Carvalheiro, a quem expresso os meus agradecimentos.

As formulações lipossomais a utilizar foram escolhidas com base num estudo preliminar elaborado por Patrícia Fraga, intitulado "Caracterização de formulações Lipossomais para *gene delivery*". De acordo com o estudo realizado, dentro das diversas formulações analisadas, as que apresentavam maior estabilidade e capacidade de retenção de nanopartículas de ouro eram as formulações J e M, utilizadas neste trabalho.

2.2.1. Combinação dos Nanoconjugados de Ouro com Lipossomas

Duas formulações lipídicas foram preparadas ao incorporar nanoconjugados de ouro (AuNP@PEG@MYC) em lipossomas de composições lipídicas diferentes, usando dois métodos distintos de preparação dos mesmos¹⁵⁹. Como controlo, foram também sintetizados lipossomas com as mesmas composições lipídicas usando os mesmos métodos de preparação, mas sem a incorporação de AuNP@PEG@MYC. Os componentes lipídicos respetivos a cada formulação foram adicionados a tubos de ensaio de vidro, dissolvidos num pequeno volume de clorofórmio (solvente orgânico) e homogeneizados com recurso ao vortex. Os tubos de ensaio contendo as misturas lipídicas foram colocados em banho-maria a uma temperatura de 37°C de modo a evitar a presença de clorofórmio nas misturas. Posteriormente, as misturas lipídicas foram secadas com um fluxo de azoto, com o intuito de remover possíveis vestígios do solvente orgânico.

A formulação J foi preparada usando os lípidos DPPC:DOPC:DSPE-PEG na proporção de 86:10:4, respetivamente. A formulação foi produzida por hidratação de um filme lipídico, este último obtido através da secagem da mistura lipídica mencionada contra as paredes do tubo de ensaio em que se encontrava inserida como descrito anteriormente. Foram preparados dois tipos de partículas lipídicas: J0, em que não foram usadas AuNP@PEG@MYC, e J1, em que ocorreu a incorporação dos nanoconjugados AuNP@PEG@MYC.

A formulação M foi preparada usando os lípidos DSPC:DOPC:DSPE-PEG na proporção de 86:10:4, respetivamente. A formulação foi produzida por reidratação da mistura lipídica mencionada após liofilização. O método de produção permitiu a síntese de DRVs (do inglês, *Dried Reconstituted Vesicles*). Foram preparados dois tipos de partículas lipídicas: M0, em que não

foram usadas AuNP@PEG@MYC, e M1, em que ocorreu a incorporação dos nanoconjugados AuNP@PEG@MYC.

Na produção de ambas as formulações que incluem AuNP@PEG@MYC, foi preparado um volume final de 1 mL de mistura de lípidos (20 mM de concentração final) e solução contendo AuNP@PEG@MYC (20 nM concentração final). Neste caso, foram usados aproximadamente 666 μ L de mistura lipídica e 333 μ L de solução coloidal de AuNP@PEG@MYC (de concentração inicial 60 nM). Após aplicado o método de produção respectivo, as partículas lipídicas produzidas foram sujeitas a um processo de extrusão manual a uma temperatura de 60°C, utilizando seringas de vidro, por uma membrana com 200 nm de diâmetro (as formulações contendo nanoconjugados) ou 100 nm de diâmetro (as formulações que não continham nanoconjugados), de modo a garantir monodispersão e unilameridade nas partículas lipídicas produzidas. Previamente ao processo de extrusão, o extrusor foi colocado em cima de uma placa de aquecimento até atingir a temperatura de 60°C com o intuito de apresentar temperaturas superiores às temperaturas de transição de fase dos fosfolípidos usados nas formulações, sendo estas iguais a 45°C para o DPPC e 58°C para o DSPC, respectivamente. Seguidamente, as formulações produzidas foram carregadas em colunas Sephadex G-50 previamente preparadas, e as diferentes fases aquando da eluição com tampão citrato (pH 8) (100 nM) foram separadas e armazenadas.

2.2.2. Caracterização dos Nanoconjugados Lipídicos

As formulações J0, J1, M0 e M1 foram caracterizadas com recurso a DLS de modo a verificar o tamanho médio das mesmas e o tipo de dispersão do tamanho das amostras. A concentração final de lípido após eluição foi determinada através da quantificação dos fosfolípidos usados na síntese presentes na fração final. O fator de diluição foi determinado tendo em conta o volume de preparação carregado na coluna e o volume final obtido. A concentração de nanoconjugados de ouro presente nas formulações em que estes foram incorporados foi determinada através de espectrofotometria UV-Vis, usando as formulações vazias correspondentes como branco, obtenção do espectro de absorvância e aplicação da lei de Lambert-Beer como na secção anterior. O número de partículas lipídicas existentes em solução foi calculado a partir do número total de lípidos por lipossoma e pela concentração de lípidos presente nas soluções. O número total de lípidos por lipossoma foi por sua vez calculado tendo em conta o tamanho médio das partículas lipídicas e um tamanho aproximado dos fosfolípidos utilizados. Obtendo a concentração de nanoconjugados de ouro presente nas formulações e a concentração de partículas lipídicas em solução, foi possível calcular o número de nanoconjugados de ouro por partícula lipídica.

2.3. Cultura Celular

Os ensaios seguintes foram realizados em células da linhagem celular HCT116 (células epiteliais provenientes de carcinoma retal), cuja cultura foi mantida em DMEM suplementado com 10% FBS a 37°C a 5% de CO₂ e 99% de humidade relativa numa estufa própria (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão).

O crescimento das células era realizado em frascos de cultura (*T flasks*) de 25 cm². De modo a manter as culturas celulares em monocamada e em fase de crescimento exponencial, semanalmente eram realizadas subculturas de células. Assim, quando o estado de confluência celular se aproximava dos 80-90%, era preparada uma subcultura como forma de evitar falta de nutrientes, excessiva acidificação do meio de cultura ou inibição de crescimento por contacto.

Na preparação de uma subcultura, primeiramente era analisado o estado de confluência das células através de um microscópio ótico invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments, Tóquio, Japão). Caso o estado de confluência celular estivesse próximo do desejado, o meio presente no frasco de cultura era retirado e 2 mL de TrypLE™ Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA) eram adicionados com o intuito de destacar as células por tripsinização, visto que as células da linhagem celular em questão têm a característica de ser aderentes. Após atuação deste composto por aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, o reagente era neutralizado ao adicionar ao frasco um igual volume de meio completo DMEM. De seguida, a solução era transferida para tubos de 2 mL, sendo estes centrifugados durante 5 minutos a 300×g. O sobrenadante era descartado e o *pellet* celular ressuspenso em 1 mL de meio completo DMEM. A contagem de células era realizada pelo método de exclusão com azul Trypan (Sigma, St. Louis, EUA). Assim, era preparada uma solução com 350 µL de meio completo DMEM, 100 µL de azul Trypan a 0,2 % (v/v) e 50 µL da suspensão celular, que era carregada num hemocitómetro (Hirschmann, Ebersstadt, Alemanha), sendo então utilizado o microscópio ótico invertido para realizar a contagem do número de células viáveis. A concentração celular (células/mL) é obtida multiplicando o número de células contadas pelo volume do hemocitómetro (10⁴ células/mL) e pelo fator de diluição (10) a dividir pelo número de quadrantes onde foram contadas células, como está representado na equação 1. Ao aplicar esta equação é possível estimar posteriormente o volume de suspensão celular e meio DMEM a introduzir num novo frasco de cultura de 25 cm² para 5 mL de solução final com o intuito de alcançar o estado de confluência desejado após uma semana de incubação.

Equação 1:

$$n^{\circ} \text{ de células viáveis/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ de células viáveis contadas} \times 10^4 \times 10}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contabilizados}}$$

2.4. Challenge com Diferentes Nanoconjugados

Para os ensaios *in vitro*, o *seeding* de células da linhagem HCT116 com o meio apropriado (DMEM com ou sem PhenolRed) era realizado a uma densidade de 1×10^5 células por poço em placas de 24 poços (volume final de 500 μL por poço) ou a uma densidade de 2×10^4 células por poço em placas de 96 poços (volume final de 100 μL por poço). Depois da introdução das células e do meio de cultura nos respectivos poços, estas eram incubadas por um período de 24h de modo a permitir a adesão das células ao fundo dos poços, sendo realizado o *challenge* após esse período.

O *challenge* - incubação dos nanoconjugados por um determinado período de tempo com as células presentes nos poços das placas - das células era realizado usando 0.6 nM de AuNP@PEG@MYC (correspondendo a 36 nM de oligonucleótido; Rácio de Au:oligonucleótido = 1:60), 1.7 nM de formulação J1 (correspondendo a 29.7 nM de oligonucleótido) e 1.2 nM de formulação M1 (correspondendo a 37.2 nM de oligonucleótido). Como controlo, as células foram expostas a 0.6 nM de AuNP@PEG. Na preparação das placas a usar, um volume de água superior ao volume de suspensão celular era adicionado aos poços mais exteriores da placa de modo a evitar perdas de volume nos poços de interesse, ou seja, nos poços usados para etapas de *seeding* e para execução do *challenge*. Eram adicionados 800 μL de água em cada poço externo das placas de 24 poços e 180 μL de água em cada poço externo das placas de 96 poços. Os passos de incubação foram realizados numa estufa de CO_2 (SANYO CO_2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) com atmosfera controlada a 37° C, 5% de CO_2 e 99% de humidade relativa.

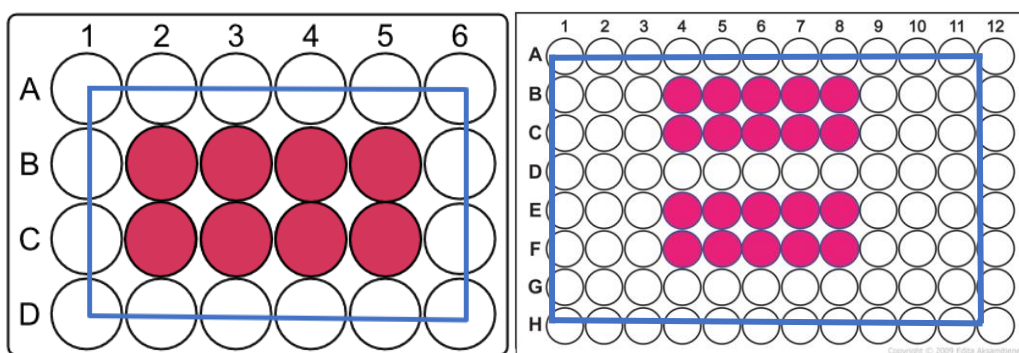


Figura 2.1 – Exemplo de distribuição do *seeding* das células da linhagem HCT116 em placas de 24 poços (à esquerda) (volume final de 500 μL por poço) e em placas de 96 poços (à direita) (volume final de 100 μL por poço). Os círculos vermelhos representam poços contendo células e meio cultura (DMEM) e as linhas azuis representam poços que contém água, para evitar perda de volume nos poços primários.

2.5. Análise da Expressão Genética

As células da linhagem celular HCT116 foram incubadas com os diferentes nanoconjugados (AuNP@PEG, AuNP@PEG@MYC, formulação J1 e formulação M1) em placas de 24 poços conforme as condições mencionadas e recolhidas em diferentes *time-points* passado o respetivo tempo de incubação (2, 4 e 6 horas). As células foram centrifugadas a 300×g durante 5 minutos a temperatura ambiente e o RNA total foi extraído a partir do *pellet* celular usando TRIsure (Bio-line, Taunton, MA, USA) de acordo com as indicações do fabricante. O RNA (100 ng) foi sujeito a transcrição reversa usando o kit “NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis kit” (NZYTech, Lisboa, Portugal). A amplificação de cDNA por qPCR foi realizada num termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Alemanha) usando NZYqPCR Green Master Mix (2x) (NZY-Tech, Lisboa, Portugal). A mistura de reação foi preparada para um volume final de 20 µL com 1 µL de cDNA e os primers seguintes, a uma concentração de 200 nM cada: *c-MYC forward* (5' – GCTCATTCTGAAGAGGACTTGT – 3') e *c-MYC reverse* (5' – AGGCAGTTTACATTATGGCTAAATC – 3'); *18S forward* (5'- GTAACCCGTTGAACCCCAT – 3') e *18S reverse* (5' – CCATCCAATCGGTAGTAGCG – 3'). As condições de qPCR incluem um tempo inicial de desnaturação a 95°C de 5 minutos e 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos.

Os dados de qPCR foram analisados pelo método de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)¹⁹⁴, em que o nível de expressão genética relativa é dado através da quantificação do gene de interesse (*c-MYC*) relativamente ao gene de controlo (*18S*), normalizado à condição controlo (células expostas a AuNP@PEG):

Equação 2:

$$\Delta Ct = Ct_{c-MYC} - Ct_{18S}$$

Equação 3:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{nanoconjugado} - \Delta Ct_{AuNP@PEG}$$

2.6. Verificação do *Uptake* Celular dos Diferentes Nanoconjugados e Formulações

2.6.1. Fracionamento por Espectroscopia UV-Visível

A quantidade de nanoconjugados internalizados pelas células após *challenge* com os nanoconjugados foi determinada indiretamente por fracionamento por espectroscopia UV-Visível. Para tal, foi realizado o *seeding* das células da linhagem HCT116 numa placa de 24 poços e realizado o *challenge* com os diferentes nanoconjugados e formulações (AuNP@PEG, AuNP@PEG@MYC, formulação J1 e formulação M1) como descrito anteriormente, por um período de incubação de 6 horas numa estufa de CO₂ (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) com atmosfera controlada a 37° C, 5% de CO₂ e 99% de humidade relativa. Passado o período de incubação (6h) a placa foi retirada da estufa e o meio de cultura DMEM presente em cada poço respetivo à incubação com um dos diferentes nanoconjugados e formulações (500 µL) foi recolhido em tubos de 2 mL para posterior análise. Aos tubos em questão foi adicionado um igual volume de PBS usado na lavagem dos poços de modo a tentar recolher o máximo de amostra possível.

As soluções compostas por meio de cultura DMEM e PBS foram analisadas por espectroscopia de UV-Visível (espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240, Quioto, Japão) com o intuito de quantificar as AuNPs presentes em solução, permitindo assim uma extrapolação da quantidade de AuNPs internalizadas ao fazer a diferença entre a quantidade de AuNPs introduzidas para realização do *challenge* e a quantidade de AuNPs em solução passado o período de incubação.

2.6.2. Quantificação de Ouro por ICP-MS

Com o objetivo de estudar e quantificar a internalização de AuNPs por parte das células em estudo, a técnica de ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) foi aplicada. Assim, foi realizado o *seeding* das células da linhagem HCT116 numa placa de 24 poços e realizado o *challenge* com os diferentes nanoconjugados e formulações (AuNP@PEG, AuNP@PEG@MYC, formulação J1 e formulação M1) como descrito anteriormente, por um período de incubação de 6 horas numa estufa de CO₂ (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) com atmosfera controlada a 37° C, 5% de CO₂ e 99% de humidade relativa. Passado o período de incubação, o meio de cultura DMEM presente nos poços respetivos às células HCT116 foi retirado e guardado em tubos *falcon* de 15 ml (SPL Life Sciences, Coreia do Sul). Os poços foram lavados com 500 µL de PBS por poço, que foram seguidamente adicionados aos tubos contendo o meio usado na incubação das células com os diferentes nanoconjugados e formulações. As células presentes nos poços foram então tripsinizadas usando e 250 µL de TrypLE™ Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA) por poço. Este processo ocorreu a temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. As células foram então colecionadas em tubos de 2 mL e centrifugadas a 300×g durante 5 minutos. O sobrenadante foi adicionado aos tubos *falcon* de 15 ml contendo meio de cultura DMEM usado na incubação e o PBS usado na lavagem dos poços. O *pellet* celular correspondente a cada poço, ou seja, a cada incubação com um tipo de nanoconjugados ou formulação diferente, foi ressuspenso em 500 µL de meio de cultura DMEM e 500 µL de PBS, sendo este volume posteriormente transferido para tubos *falcon* de 15 ml. Foi então adicionada *aqua regia* preparada de fresco aos tubos *falcon* até perfazer um volume final de 5 mL, sendo preparados também tubos *falcon* de 15 ml apenas com *aqua regia* para serem usados como controlo. Os tubos foram armazenados a 4°C até quantificação do ouro presente nas amostras por ICP-MS.

A quantificação do ouro presente nas amostras foi realizada usando o serviço de espectroscopia de emissão atómica por parte do Laboratório de Análises da Rede REQUIMTE, FCT-UNL.

2.7. Avaliação da Viabilidade Celular

Para avaliação da viabilidade celular foram realizados ensaios de MTS com recurso ao *Kit CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS, Promega, Madison, WI, USA), que é composto por dois reagentes: o MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] e o PES (etossulfato de fenazina). Este método baseia-se no princípio de que nas células viáveis, o reagente de MTS, de coloração amarela, vai ser reduzido pelo PES, levando à formação de formazano nas mitocôndrias das células. Esta substância apresenta uma coloração acastanhada e absorve a 490 nm, podendo ser quantificada através da medição da absorbância nesse comprimento de onda. Esse valor será diretamente proporcional ao metabolismo mitocondrial, sendo em seguida transposto para viabilidade celular (método indireto)¹⁹⁵.

Como tal, células da linhagem celular HCT116 foram incubadas por um período de 6h com os diferentes nanoconjugados e complexos lipídicos (AuNP@PEG, AuNP@PEG@MYC, formulação J1 e formulação M1) em placas de 96 poços como descrito anteriormente. Passado o tempo de incubação, o meio celular foi retirado e foram adicionados 80 µL de meio DMEM (sem Phenol-Red) e 20 µL de reagente de MTS – *Kit CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (MTS, Promega, Madison, WI, USA) - aos poços contendo células, seguido de 45 minutos de incubação numa estufa de CO₂ (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) com atmosfera controlada a 37° C, 5% de CO₂ e 99% de humidade relativa. A absorbância a 490 nm foi medida num leitor de microplacas Tecan Infinite M200 microplate reader (Männedorf, Switzerland) e os valores obtidos foram corrigidos relativamente às condições de controlo (poços sem células contendo a mistura de DMEM e reagente MTS). O cálculo da viabilidade celular foi assim executado de acordo com a equação 4.

Equação 4:

Viabilidade celular (%) =

$$= (\text{Abs da amostra (490 nm)} - \text{Abs do controlo (490nm)}) \times 100$$

3. Resultados e Discussão

O silenciamento genético pode contribuir para a potenciação de diferentes abordagens no tratamento oncológico. Por exemplo, os oligonucleótidos de ssDNA usados em silenciamento conseguem reconhecer um produto genético específico, inibindo a produção de proteínas associadas ao desenvolvimento do cancro, ao ativar RNase H que cliva híbridos de DNA/RNA; através do bloqueio estérico da tradução; ou por modulação de *splicing* alternativo¹⁹⁶. Desta forma, as células que possuem o marcador genético selecionado serão alvo de um *targeting* seletivo, com o intuito de melhorar a eficácia da terapia. O silenciamento genético tem tirado proveito de estratégias de nanovetorização que prolongam o tempo de meia-vida de circulação de TNAs, enquanto simultaneamente promovem o aumento do *uptake* celular¹⁹⁷. Aqui foram usadas AuNPs - combinadas ou não com diferentes formulações lipossomais - como vetores para a entrega específica de oligonucleótidos para *targeting* da sequência de mRNA de *c-MYC* em células HCT116, em que a *silencing moiety* estava numa configuração *stem-loop* para melhor a seletividade e especificidade perante a sequência-alvo¹⁹⁸.

AuNPs com aproximadamente 14 nM de diâmetro foram sintetizadas e funcionalizadas com PEG (AuNP@PEG) e com um oligonucleótido ssDNA para *targeting* da sequência de mRNA de *c-MYC* (densidade de 60 oligonucleótidos por nanopartícula). A funcionalização com PEG é crucial no aumento da solubilidade dos nanoconjugados em sistemas *in vitro* e *in vivo*, na redução do uptake dos mesmos pelo sistema reticuloendotelial aumentando o tempo de circulação nos nanoconjugados e na diminuição destes com proteínas do soro e de tecidos¹⁹⁹.

3.1. Síntese e Caracterização de Nanoconjugados para Silenciamento Genético

As nanopartículas de ouro apresentam propriedades físicas e óticas distintas, dependentes do tamanho, morfologia, estrutura da superfície e estado de aglomeração das nanopartículas. Ao lidar com AuNPs, especialmente ao funcionalizar a superfície das mesmas com agentes químicos ou biomoléculas, a sua caracterização apresenta bastante importância, por exemplo, para avaliar o resultado da modificação de superfície. Algumas das técnicas de caracterização de nanopartículas de ouro foram utilizadas como descrito, nomeadamente, espectroscopia UV-Visível, DLS e Potencial Zeta. Durante a síntese e preparação das nanopartículas com diferente funcionalização de superfície (AuNPs, AuNPs@PEG e AuNPs@PEG@MYC), estas foram caracterizadas usando as técnicas mencionadas.

Foram recolhidos espectros de absorvância correspondentes ao intervalo de comprimento de onda da radiação incidente de 420 nm a 720 nm (Figura 3.1.A).

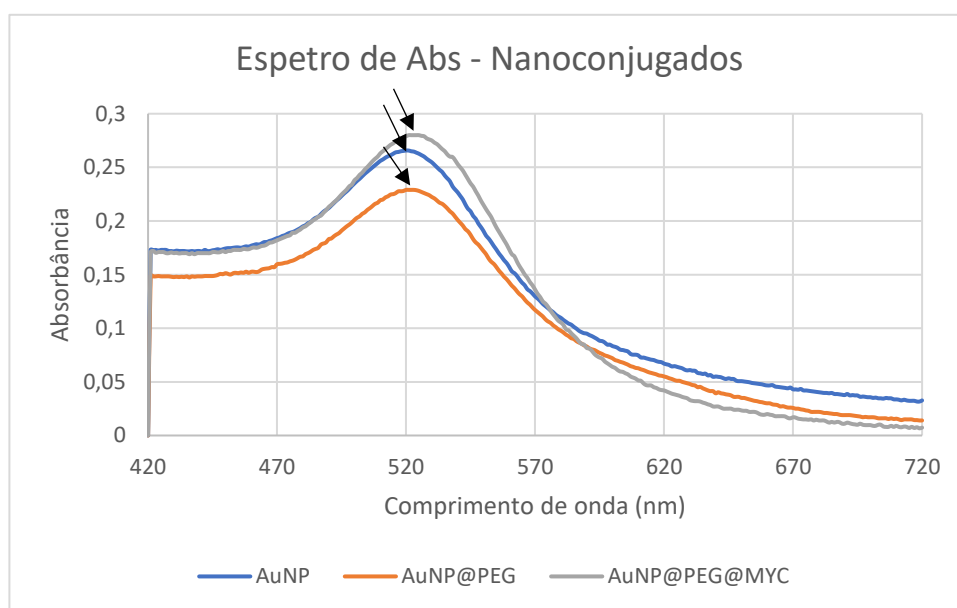


Figura 3.1.A - Espectros de absorvância em função do comprimento de onda da radiação incidente (nm) dos diferentes nanoconjugados. As setas indicam o pico de SPR das diferentes AuNPs, evidenciando o desvio existente.

Um tratamento mais cuidado dos dados obtidos permitiu detetar o comprimento de onda da radiação incidente correspondente com o pico de SPR das nanopartículas em diferentes níveis de funcionalização. Ao realizar a média móvel dos valores de absorbância em função do intervalo de comprimento de onda da radiação, de modo a suavizar flutuações curtas dos dados e destacar tendências a longo prazo, e derivar os valores resultantes da média móvel, foi possível determinar com precisão o comprimento de onda correspondente ao pico de SPR das diferentes nanopartículas de ouro (Figura 3.1.B). Como observável, ocorreu um desvio no pico de SPR, havendo um aumento do comprimento de onda da radiação responsável por este proporcional ao nível de funcionalização, ou seja, as AuNP apresentam o pico de SPR a um comprimento de onda menor que as AuNP@PEG, sendo que este é também, por sua vez, menor que nas AuNP@PEG@MYC (Tabela 3.1). Este desvio indica assim acerca do estado de funcionalização das nanopartículas, resultando de um aumento no índice refrativo local na superfície das mesmas, como consequência do PEG localizado na superfície das AuNP@PEG e do PEG e oligonucleótido nas AuNP@PEG@MYC.

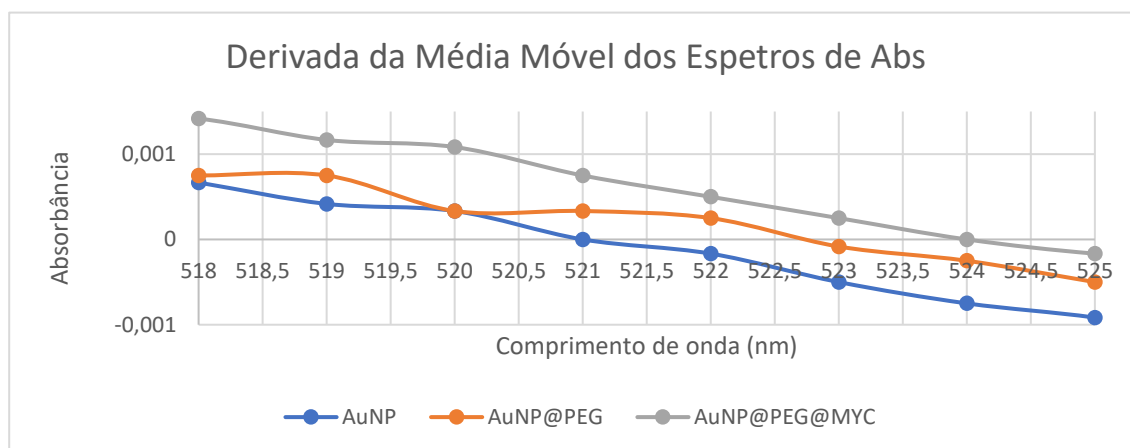


Figura 3.1.B - Representação gráfica da derivada da média móvel dos valores de absorbância em função do comprimento de onda da radiação incidente (nm) dos diferentes nanoconjugados.

Os espectros de absorbância (Figura 3.1.A) permitiram também o cálculo da concentração de nanopartículas de ouro em suspensão, juntamente com uma aproximação do tamanho (diâmetro) do núcleo das mesmas.

O diâmetro aproximado das nanopartículas foi extrapolado ao elaborar uma reta de calibração tendo em conta os dados teóricos e empíricos apresentados por Haiss *et al.* (Figura 3.2).

Foi então retirada a equação que relacionava o diâmetro das nanopartículas com a razão entre a absorvância no pico de SPR e a absorvância no comprimento de onda de 450 nm.

Equação 5:

$$\text{Diâmetro NP (nm)} = 0.112 \times e^{2.9986 \times ((\text{Abs SPR})/(\text{Abs 450 nm}))}$$

O diâmetro aproximado do núcleo de ouro dos diferentes nanoconjugados foi assim calculado através da aplicação da equação anterior (Tabela 3.1).

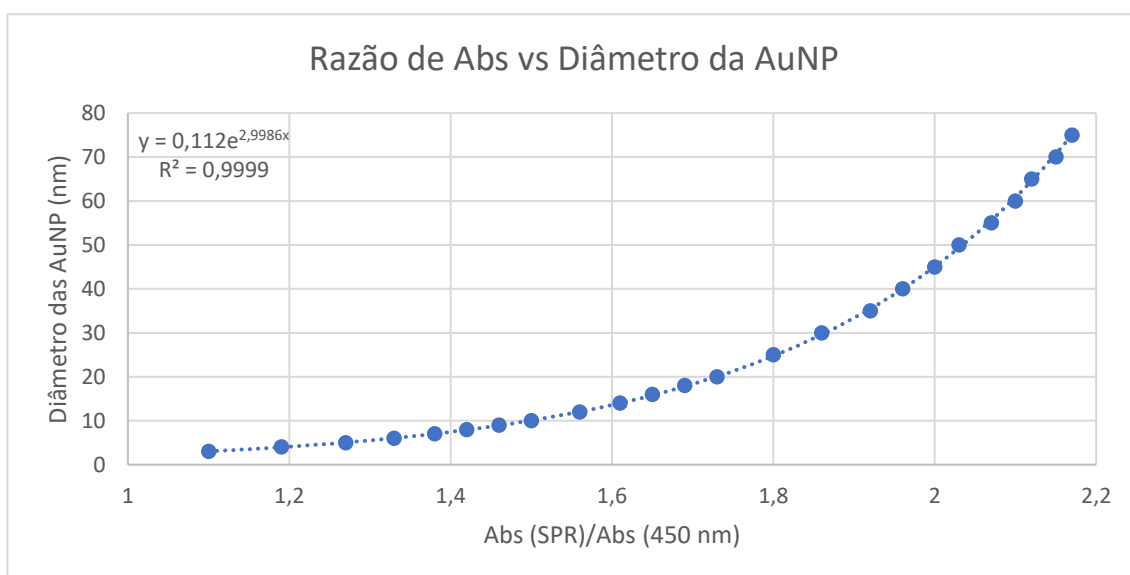


Figura 3.2 - Reta de calibração elaborada a partir de dados teóricos e empíricos apresentados por Haiss *et al.*, que relaciona o diâmetro de nanopartículas de ouro esféricas (nm) com a razão entre a absorvância das mesmas correspondente ao seu pico de SPR e a absorvância destas a 450 nm.

A concentração de nanopartículas de ouro em solução foi determinada através da aplicação direta da lei de Lambert-Beer, que dita que a absorvância de uma substância homogênea está influenciada de forma proporcionalmente direta pela concentração da mesma, de acordo com a seguinte fórmula:

Equação 6:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

Em que, A é a absorvância da substância, ϵ é o coeficiente de extinção molar para o comprimento de onda remetente a A , l é o comprimento do percurso ótico e C é a concentração da substância em solução.

Para nanopartículas de ouro de aproximadamente 14 nm de diâmetro, tamanho esperado ao utilizar o método de síntese referido, o pico de SPR ronda por volta de 520 nm de comprimento de onda de radiação incidente e o coeficiente de extinção molar correspondente é de $2.33 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Como evidenciado anteriormente, as nanopartículas de ouro sintetizadas exibem as características enunciadas.

Com isto, a concentração de nanopartículas de ouro em solução foi calculada usando o valor de absorvância referente ao pico de SPR correspondente a cada um dos diferentes nanoconjugados (AuNP, AuNP@PEG, AuNP@PEG@MYC) (Tabela 3.1). Em casos em que foram realizadas diluições para correta leitura dos espectros de absorvância, a concentração obtida foi multiplicada pelo fator de diluição de modo a indicar o valor de concentração na solução stock.

Tabela 3.1 - Valores de comprimento de onda correspondente ao pico de SPR, diâmetro aproximado e concentração em suspensão dos diferentes nanoconjugados.

	AuNP	AuNP@PEG	AuNP@PEG@MYC
Pico de SPR (nm)	521	523	524
Diâmetro aproximado do núcleo de ouro (nm)	14,42		
Concentração (nM)	57,01	49,14	60,09

As nanopartículas de ouro preparadas foram também caracterizadas por DLS. Esta técnica permite determinar qual o tamanho hidrodinâmico das nanopartículas, o que inclui o tamanho do núcleo das nanopartículas, as moléculas à superfície das mesmas e a esfera de solvatação. Assim sendo, a conjugação de moléculas como PEG e oligonucleótidos à superfície das nanopartículas de ouro aumenta o tamanho hidrodinâmicos das mesmas, como verificado pelo aumento de Z-average referente às nanopartículas nos diferentes estados de funcionalização (Tabela 3.2). A relação entre o diâmetro das partículas e a frequência deste na população foi representada graficamente (Figura 3.3), o que permite aferir acerca da monodispersividade das diferentes populações de nanoconjugados. As AuNP@PEG mostram um alargamento da curva, que pode estar associado a um baixo nível de agregação (Figura 3.3). Ao avaliar simultaneamente os

valores de índice de polidispersividade obtidos, os dados são indicativos de que as três populações de nanoconjugados têm uma distribuição monodispersa (Tabela 3.2).

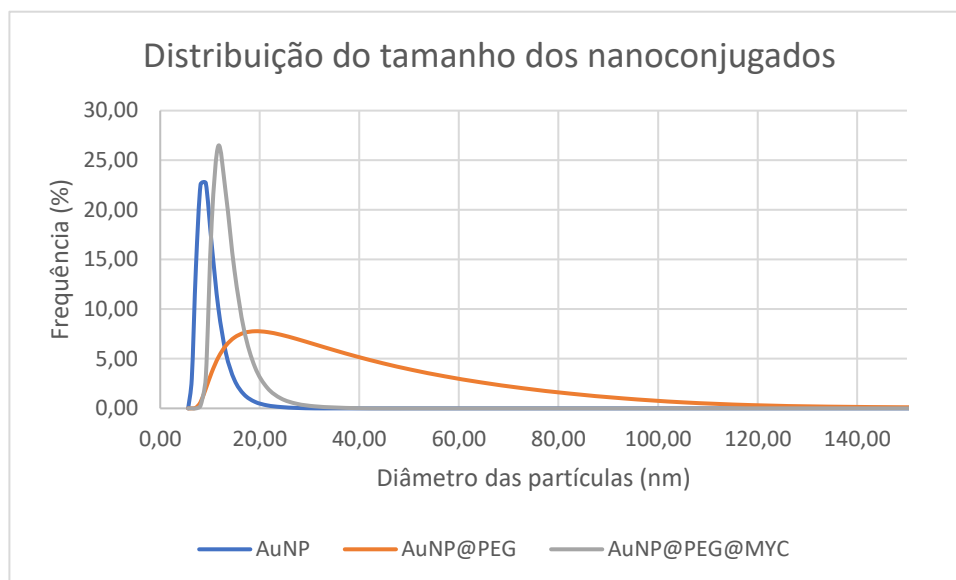


Figura 3.3 - Distribuição do tamanho dos vários nanoconjugados. Representação gráfica da frequência de nanopartículas observadas (em porcentagem) em função do diâmetro das mesmas (nm).

Foram também medidos os valores de potencial zeta dos diferentes nanoconjugados (Tabela 3.2). O potencial zeta mede a magnitude de repulsão/atração eletrostática/de carga entre partículas, o que afeta a sua estabilidade e estado de dispersão/agregação. A ligação de PEG à superfície das AuNPs induz um desvio do potencial zeta para valores mais neutros, enquanto que, tendo em conta a carga negativa das moléculas de ssDNA, a funcionalização com oligonucleótidos induziu um desvio para valores mais negativos, como demonstrado (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Valores de Z-average (nm), índice de polidispersividade (PI) e Potencial Zeta referentes aos diferentes nanoconjugados. Os valores representados foram calculados fazendo a média de pelo menos três medições independentes e o respetivo desvio-padrão (com exceção da medição de Potencial Zeta que apenas foi possível ser realizada uma vez).

	AuNP	AuNP@PEG	AuNP@PEG@MYC
Z-average (nm)	16,46 ± 0,80	20,60 ± 0,66	23,18 ± 0,69
PI	0,29 ± 0,09	0,30 ± 0,11	0,29 ± 0,17
Potencial Zeta (mV)	-36	-27	-42

3.2. Incorporação de Nanoconjugados em Lipossomas e Caracterização das Formulações

A escolha das formulações lipossomais a utilizar nesta secção teve por base um estudo preliminar realizado por Patrícia Fraga, intitulado "Caracterização de formulações Lipossomais para *gene delivery*". De acordo com o estudo realizado, dentro das diversas formulações analisadas, as formulações lipossomais que apresentavam maior estabilidade e capacidade de retenção de AuNPs eram as formulações J e M, utilizadas neste trabalho. As formulações J e M, vazias e combinadas com os nanoconjugados de ouro, foram preparadas em colaboração com a Doutora Manuela Colla na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Após a preparação das formulações lipossomais mencionadas, a concentração final de lípido, o tamanho dos lipossomas e o tipo de dispersão destes foi determinado (Tabela 3.3). Tendo em conta os valores de PI obtidos, todas as formulações apresentavam populações monodispersas.

Tabela 3.3 - Valores de concentração final de lípido ($\mu\text{mol/mL}$), diâmetro médio das partículas (nm) e índice de polidispersividade (PI) das populações analisadas referentes às diferentes formulações lipossomais, vazias e conjugadas com nanoconjugados de ouro.

Formulações	[Lípido] _{final} ($\mu\text{mol/mL}$)	Diâmetro médio (nm)	PI
J0	7,37	99,72	0,033
J1	5,53	197,30	0,075
M0	3,04	115,00	0,035
M1	2,94	170,53	0,053

Tendo em conta os métodos usados na preparação das formulações, foi então assumido que os lipossomas são unilamelares e feito um cálculo teórico do possível número de lipossomas em solução a partir da concentração de lípido final e do tamanho médio dos lipossomas (Tabela 3.4) usando a seguinte equação.

Equação 7:

$$N_{total} = \frac{\left[4\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi\left(\frac{d}{2}-h\right)^2 \right]}{a}$$

Em que $4\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2$ é a área de superfície de uma das monocamadas do lipossoma, sendo d o diâmetro do lipossoma, h a espessura da bicamada lipídica (aproximadamente 5 nm) e a a área da cabeça do fosfolípido (aproximadamente 0.71 nm² para fosfatidilcolinas). Na equação 7, a área de superfície de ambas as monocamadas num lipossoma unilamelar são somadas. Posteriormente, o total de área lipídica é dividida pela área da cabeça de uma molécula de lípido.

Sabendo a concentração de lípidos em solução, é possível determinar o número total de partículas lipídicas por volume de solução (Tabela 3.4). A equação seguinte foi usada para calcular o número de lipossomas por mililitro de solução:

Equação 8:

$$N_{lipossomas} = \frac{M_{lipido} \times N_A}{N_{total} \times 1000}$$

Em que M_{lipido} é a concentração molar de lípido, N_{total} é o número de lípidos por lipossoma e N_A é o número de Avogadro. Foi feita a conversão do número de partículas lipídicas por mililitro para a concentração das mesmas em solução (Tabela 3.4).

A concentração de AuNP@PEG@MYC presente em solução foi determinada a partir do pico de SPR obtido por espectrofotometria UV-Vis como explicado (Figura 3.4), usando o método desenvolvido por Haiss *et al.* e aplicado anteriormente. As formulações sem AuNP@PEG@MYC foram usadas como branco de modo a minimizar o efeito dos lípidos presentes em solução no espectro relativo aos nanoconjugados de ouro. A solução lipídica contendo a formulação J1 continha uma concentração de aproximadamente 4.94 nM de AuNP@PEG@MYC, enquanto que a solução lipídica contendo a formulação M1 continha uma concentração de aproximadamente 6.20 nM de AuNP@PEG@MYC (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Valores de número total de lípidos por lipossoma, número de partículas lipídicas por mL de suspensão, concentração de partículas lipídicas em suspensão, concentração de nanoconjugados de ouro e a proporção destes em relação ao número de partículas lipídicas referentes a cada formulação.

Formulações	Número total de lípidos por lipossoma	Número de partículas lipídicas por mL	Concentração de partículas lipídicas (nM)	Concentração de nanoconjugados de ouro (nM)	Proporção de nanoconjugados de ouro por partícula lipídica
J0	79571,80	$5,58 \times 10^{13}$	92,98	0	N/A
J1	327302,95	$1,02 \times 10^{13}$	16,96	4,94	1:3
M0	107245,63	$1,71 \times 10^{13}$	28,45	0	N/A
M1	243171,50	$7,28 \times 10^{12}$	12,14	6,20	1:2

Assumindo que todos os nanoconjugados estão incorporados, conjugados ou encapsulados nos lipossomas, a formulação J1 apresenta uma razão de 1:3 (nanoconjugados:lipossoma) e a formulação M1 apresenta uma razão aproximada de 1:2 (nanoconjugados:lipossoma). Apesar da formulação J1 apresentar uma maior concentração de partículas lipídicas, a formulação M1 continha um valor de concentração de AuNP@PEG@MYC superior. Considerando o número de nanoconjugados em comparação com o número de lipossomas, a formulação M1 apresenta vantagens na medida em que existe uma maior proporção de lipossomas com nanoconjugados, enquanto que a formulação J1 apresenta uma maior proporção de lipossomas vazios. Isto remete para uma maior eficiência de carregamento de lipossomas com AuNPs em lipossomas baseados na composição e método de preparação da formulação M.

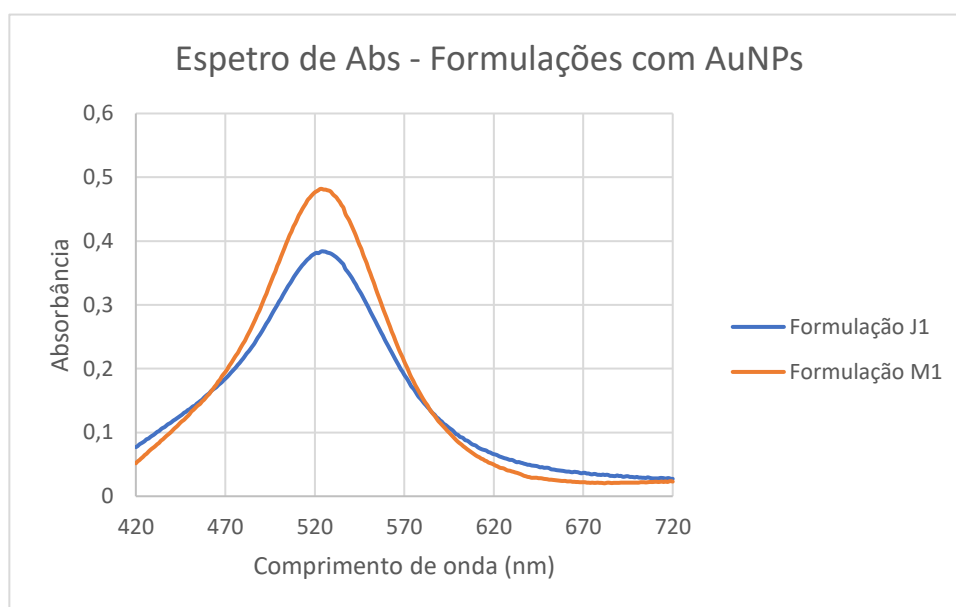


Figura 3.4 - Espectros de absorvância das formulações J1 e M1. As formulações J0 e M0 foram usadas como branco na medição dos espectros, respetivamente.

3.3. Avaliação da Expressão do Gene *c-MYC* em Células da Linhagem Celular HCT116 Incubadas na Presença de Diferentes Nanoconjugados

Os dados de qPCR obtidos foram analisados pelo método de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)¹⁹⁴, em que o nível de expressão genética relativa é dado através da quantificação do gene de interesse (*c-MYC*) relativamente ao gene de controlo (*18S*), normalizado à condição controlo (células expostas a AuNP@PEG). Assim sendo, o nível de expressão genética relativa para cada *time-point* é calculado através da aplicação das equações 2 e 3.

Equação 2:

$$\Delta Ct = Ct_{c-MYC} - Ct_{18S}$$

Equação 3:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{nanoconjugado} - \Delta Ct_{AuNP@PEG}$$

O *18S* rRNA foi usado como controlo interno na calibração dos níveis de expressão do gene-alvo (*c-MYC*) visto que este apresenta níveis de expressão constantes através das diferentes amostras e condições utilizadas, funcionando como um *housekeeping gene*. A condição controlo aplicada na análise enunciada remete para a exposição das células da linhagem HCT116 a AuNP@PEG na mesma concentração que a condição de interesse e durante o mesmo período de incubação, de modo a excluir o possível efeito silenciador intrínseco das próprias AuNPs funcionalizadas com PEG e analisar de forma focada o efeito silenciador que advém dos oligonucleótidos funcionalizados em AuNP@PEG@MYC.

A análise expressão genética de *c-MYC* através de qPCR em tempo real permite identificar algumas tendências acerca de como a incubação com os diferentes nanoconjugados durante vários períodos influenciam a expressão do gene alvo.

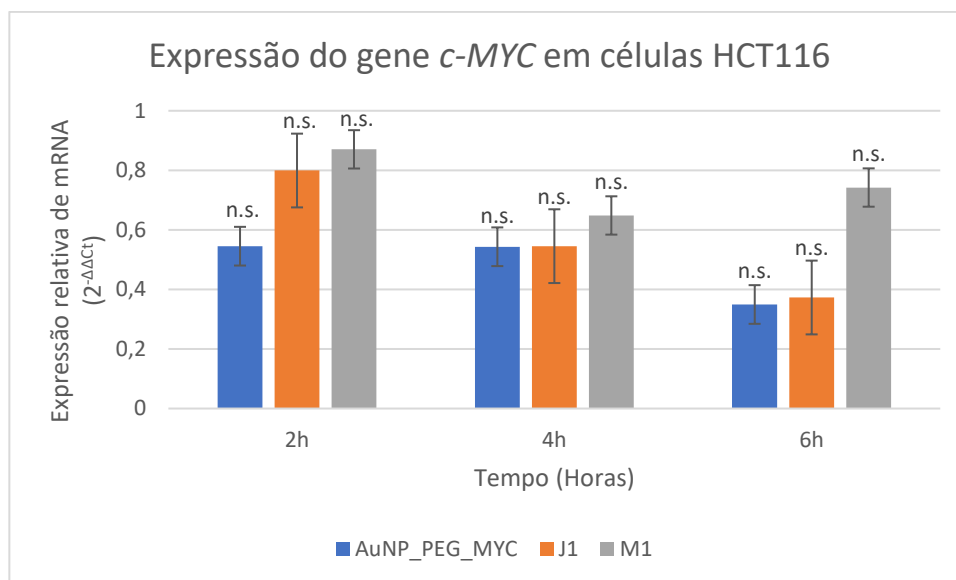


Figura 3.5 - Silenciamento gênico do gene *c-MYC* em células da linhagem celular HCT116. O gráfico representa a expressão relativa de mRNA após incubação das células HCT116 com 0.6 nM de AuNP@PEG@MYC (correspondendo a 36 nM de oligonucleótido), 1.7 nM de formulação J1 (correspondendo a 29.7 nM de oligonucleótido) e 1.2 nM de formulação M1 (correspondendo a 37.2 nM de oligonucleótido). Os dados foram normalizados ao gene de controlo 18S e depois às células expostas a AuNP@PEG. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão dos valores obtidos em três medições independentes de cada população correspondente a cada *time-point*. Não foram encontradas diferenças significativas entre as diferentes condições experimentais (Student's *t*-test, *p*-value > 0.05).

Com base na Figura 3.5, em termos gerais, o nível de silenciamento foi aumentando com o período de incubação, o que pode ser explicado pela internalização de um maior número de nanoconjugados ao longo do tempo e pelo tempo necessário à ação do agente silenciador. Para um período de incubação de 2h, as AuNP@PEG@MYC apresentaram maior capacidade de silenciamento (aproximadamente 45%) da expressão do gene *c-MYC*, comparando com o silenciamento provocado pelas formulações J1 e M1 (20% e 13% de silenciamento, respetivamente). No período de incubação de 4h, o nível de silenciamento provocado por AuNP@PEG@MYC permaneceu virtualmente igual. No entanto, houve do silenciamento induzido por parte das formulações J1 e M1, que para este período de incubação são semelhantes ao causado pelo nanoconjugados anterior (45% e 35%, respetivamente). Para o período de incubação de 6h, houve menor expressão do gene *c-MYC* por parte das células HCT116 incubadas com AuNP@PEG@MYC e com a formulação J1, que provocaram silenciamento do gene na ordem dos 65%. Contudo, houve uma regressão na eficiência de silenciamento por parte da formulação M1, que causou uma inibição de expressão do gene na ordem dos 25%, valor este inferior ao registado no período de incubação de 4h. No geral, os nanoconjugados indiciam um eficiente silenciamento genético do gene alvo.

3.4. Análise do *Uptake* de Nanoconjugados de Ouro

De modo a verificar a relação entre o silenciamento génico, o *uptake* de nanoconjugados de ouro por parte das células da linhagem HCT116 foi estudado, após *seeding* e *challenge* com os diferentes nanoconjugados e nanoformulações para um período de incubação de 6h, como descrito.

A análise de fracionamento com recurso a espectrofotometria UV-Visível permitiu a quantificação, como realizado anteriormente, da concentração de AuNPs em solução presente nos poços passado o tempo de incubação de 6 horas. A percentagem de internalização das AuNPs relativa ao *challenge* com os diferentes nanoconjugados e formulações encontra-se evidenciada na Figura 3.6.

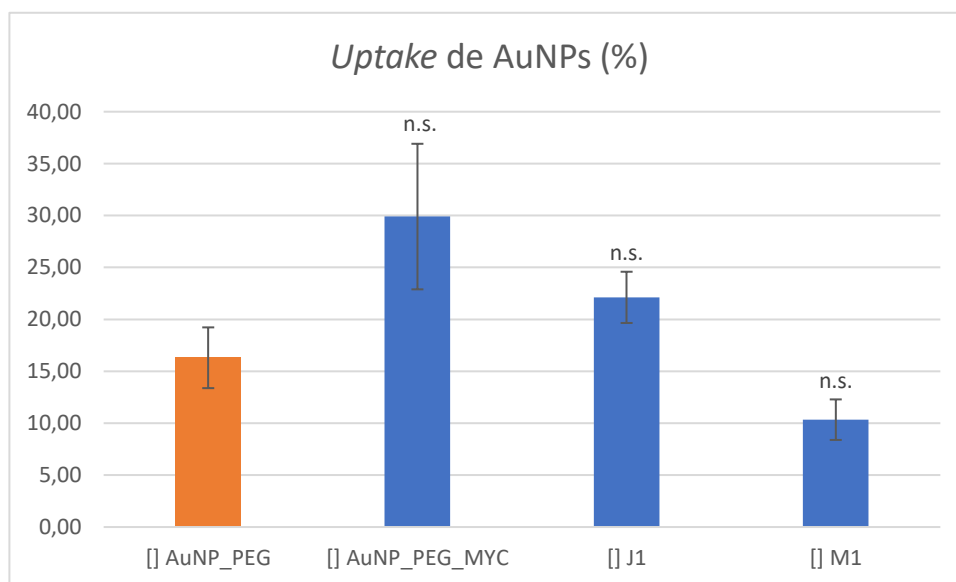


Figura 3.6. – Percentagem de AuNPs internalizadas por células da linhagem HCT116 após incubação com os diferentes nanoconjugados e formulações descritas por um período de 6h. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão dos valores obtidos em três medições independentes de cada população. Foi realizada a análise estatística dos dados obtidos por aplicação de Student's *t*-test entre as diferentes condições e o controlo (AuNP@PEG), sendo o *p-value* > 0.05 em todos os casos e, consequentemente, os resultados não são considerados estatisticamente significativos.

Os dados apresentados na Figura 3.6 corroboram as diferenças existentes na eficiência de silenciamento, sendo visível uma relação direta entre o aumento do *uptake* celular de AuNPs e o aumento do silenciamento génico resultante do *challenge*. Os valores de *uptake* celular de AuNPs apresentados na Figura 3.6 coincidem com os resultados obtidos por ICP-MS.

3.5. Avaliação da Viabilidade Celular

Estudos com recurso ao ensaio de MTS foram realizados de modo a verificar qual a influência do *challenge* realizado com os diferentes nanoconjugados e formulações na viabilidade celular. Como controlo foram usadas células da linhagem HCT116 incubadas em meio DMEM e na ausência de nanoconjugados durante um período de incubação de 6h, o que corresponde a 100% de viabilidade celular.

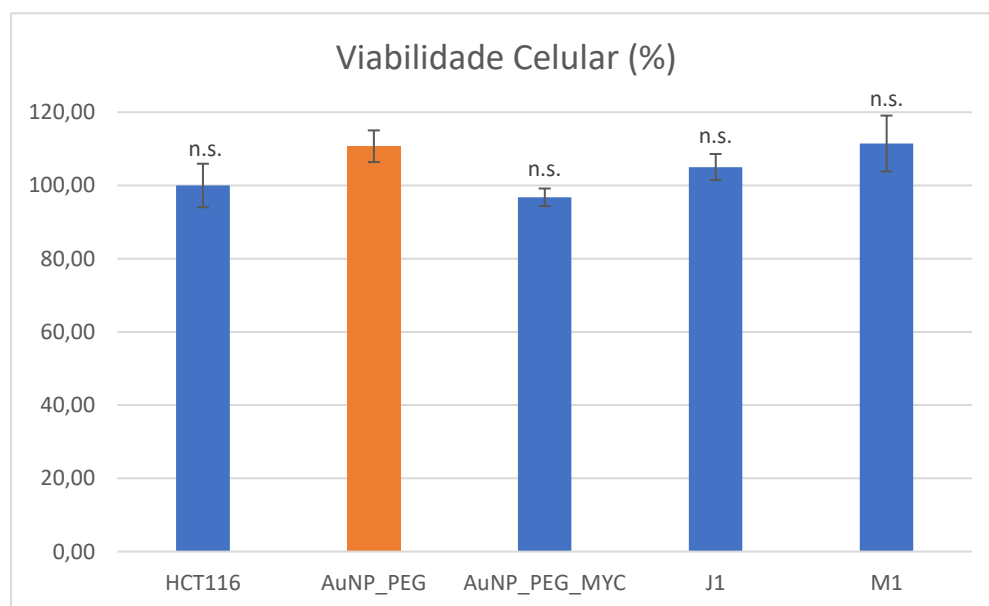


Figura 3.7 – Viabilidade celular, em percentagem, de células da linhagem HCT116 após realizado *challenge* com um tempo de incubação de 6h. Os dados apresentados correspondem à média e ao desvio-padrão dos valores obtidos em três medições independentes de cada população. Foi realizada a análise estatística dos dados obtidos através da aplicação de Student's *t*-test entre as diferentes condições e o controlo (AuNP@PEG), sendo o *p-value* > 0.05 em todos os casos e, consequentemente, os resultados não são considerados estatisticamente significativos.

A Figura 3.7 representa a viabilidade celular, em percentagem, após incubação de células da linhagem HCT116 como descrito, por um período de 6h, com as diferentes NPs. O gráfico de viabilidade celular obtido evidencia um aumento de viabilidade por volta de 10% quando comparando células incubadas com AuNP@PEG com células HCT116 que incubadas apenas em meio - este aumento poderá estar associado a um aumento de metabolismo já registado e células quando incubadas com AuNPs^{200,201}. O *challenge* realizado com AuNP@PEG@MYC resultou nos menores valores de viabilidade celular (um decréscimo de aproximadamente 15% em

comparação com os valores de viabilidade celular obtidos por incubação das células com AuNP@PEG). O *challenge* realizado com a formulação M1 provocou um aumento de viabilidade semelhante ao *challenge* realizado com AuNP@PEG. A incubação das células HCT116 com a formulação J1 resultou em valores de viabilidade celular menores que o *challenge* realizado com AuNP@PEG, no entanto, apresentou valores de viabilidade superiores comparativamente à incubação das células HCT116 com as AuNP@PEG@MYC, apesar de ambos estes nanoconjugados apresentarem níveis muito semelhantes de eficiência de silenciamento para o *time-point* de 6h, o que poderá indicar menor citotoxicidade por parte da formulação J1 em comparação com as AuNP@PEG@MYC.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Apesar da impactante evolução na área da oncologia, as atuais opções para o tratamento do cancro são principalmente baseadas em estratégias invasivas e/ou inespecíficas que têm a finalidade de lidar com o crescimento de células malignas e estabilizar a sua progressão. A maioria das estratégias terapêuticas aplicadas dependem do uso de diferentes fármacos, que exibem falta de uma desejada seletividade celular e molecular remetente à não-danificação de células e tecidos saudáveis aquando da danificação das células tumorais. Abordagens desenvolvidas mais recentemente têm como objetivo a entrega seletiva da carga terapêutica diretamente às células cancerígenas, com base na especificidade do seu perfil molecular. Este último tem sido um dos principais alvos da terapia genética, na qual ferramentas de edição genómica e abordagens baseadas em RNAi têm tomado a liderança na modelação e correção a nível molecular de variações por trás da origem de células cancerígenas. Atualmente, a capacidade de entrega de TNAs ao tecido alvo tem sido talvez uma das principais barreiras na eficiente aplicação deste tipo de estratégias.

A investigação na área da nanomedicina tem proporcionado o desenvolvimento de plataformas inovadoras capazes de superar os obstáculos existentes mencionados anteriormente. As propriedades físico-químicas intrínsecas das nanopartículas potenciam em si a probabilidade de sucesso terapêutico de diferentes estratégias aplicadas ao tratamento do cancro. De facto, as nanopartículas não funcionam apenas como plataformas para a vectorização de diferentes cargas terapêuticas (por exemplo, TNAs, fármacos, anticorpos, etc.), apresentando também aplicações como dispositivos de imagem médica, contribuindo assim para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico cada vez mais eficientes. A nanomedicina molecular aplicada à terapia do cancro depende principalmente da entrega específica da carga terapêutica em questão em células-alvo, sendo que, idealmente, os nanoconjugados são vetorizados para e com elevada eficiência de transfeção em células-alvo, apresentando simultaneamente uma baixa toxicidade para as células e tecidos saudáveis. Diferentes estratégias de terapia combinatória têm sido investigadas com a finalidade de potenciar a eficiência do tratamento.

Na área da nanomedicina, os lipossomas têm demonstrado ser vetores bastante eficientes para a entrega de diversos tipos de cargas terapêuticas, apresentando uma elevada capacidade de carregamento e baixa imunogenicidade e citotoxicidade. Os diferentes métodos de produção e as diferentes possíveis composições lipídicas dos lipossomas permitem a personalização dos mesmos consoante o objetivo final, carga terapêutica a entrega e células-alvo.

Recentemente, têm ocorrido avanços relativamente ao uso de AuNPs multifuncionais para a entrega celular de modeladores e silenciadores génicos como alternativa a agentes de transfeção convencionais, visto que as AuNPs apresentam várias vantagens em termos das suas propriedades de superfície, biodistribuição e possibilidade de combinação com diferentes agentes e estratégias terapêuticas. As AuNPs apresentam assim uma grande potencialidade como vetores para a entrega seletiva de TNAs em células cancerígenas.

Devido às propriedades das AuNPs e dos lipossomas, a formação de complexos entre os dois pode resultar em vantagens terapêuticas. Particularmente, a combinação de AuNPs (funcionalizadas com TNAs) com lipossomas apresenta a possibilidade de um efeito sinérgico, que poderá resultar numa maior eficácia de terapia genética.

Neste trabalho, AuNPs funcionalizadas com PEG e ssDNA foram combinadas com diferentes formulações lipossomais (formulação J e formulação M), com o intuito de estudar a capacidade de silenciamento do oncogene *c-MYC* por parte dos complexos obtidos em células da linhagem HCT116 (cancro colorretal), juntamente com o impacto que os diferentes nanoconjugados e complexos apresentam no *uptake* e na viabilidade celular. Os estudos realizados apontam a formulação J1 como tendo uma eficiente capacidade de silenciamento para um período de incubação de 6h, apesar de apresentar menores valores de uptake celular e menor impacto na viabilidade celular quando comparada com o uso de AuNP@PEG@MYC para o mesmo período de incubação.

Futuramente e na continuação deste projeto, existem vários aspetos que podem ser explorados. Nomeadamente: os diferentes estudos efetuados neste trabalho, ou seja, a avaliação da expressão genética do *c-MYC*, a análise da internalização de AuNPs@PEG@MYC por parte das células HCT116 e a avaliação da viabilidade celular deveriam ser realizados consoante mais períodos de incubação - 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h - de modo a desenhar o perfil de ação dos diversos nanoconjugados ao longo do tempo e do seu efeito nos parâmetros mencionados; previamente à realização dos estudos enumerados, a preparação de complexos Au-lipossoma com recurso a métodos mais precisos (como por microfluídica) e uma melhor caracterização dos diferentes complexos obtidos seria necessária, principalmente a verificação do potencial zeta das formulações obtidas, a quantificação mais precisa da concentração de AuNPs presentes nas formulações, a determinação da razão de AuNPs por lipossomas, a localização dos nanoconjugados de ouro nos lipossomas, etc.; deveriam também ser realizados ensaios de estabilidade dos complexos preparados e comparação dos resultados com as formulações que não conteriam nanoconjugados de ouro e com as outras variáveis presentes (composição lipídica, método de preparação, etc.); o

estudo da curva de crescimento das células da linhagem HCT116 com e sem *challenge* por parte dos nanoconjugados de ouro e formulações deveria ser efetuado, com o intuito de verificar qual o impacto dos mesmos no crescimento e progressão celular; deveriam ser realizados ensaios de apoptose das células da linhagem HCT116 com e sem *challenge* prévio por parte dos nanoconjugados de ouro e formulações; o estudo do tráfego intracelular dos complexos e comparação com as vias usadas pelas AuNPs e lipossomas seria de particular interesse; a combinação da terapia estudada com outras estratégias terapêuticas, como hipertermia ou quimioterapia, também apresenta possível interesse. Os estudos realizados e propostos deverão ter um número de replicados adequado de modo a garantir a robustez da análise estatística.

Após o estudo elaborado dos complexos e formulações sintetizadas, uma possibilidade futura encontra-se na translação das mesmas para aplicações clínicas. De momento, talvez os requisitos mais urgentes para uma eficiente translação de sistemas de terapia genética com base em nanotecnologia para a clínica são a possibilidade de *scale-up* da produção, a capacidade de caracterização extensa, precisa e reproduzível da nanotecnologia e o estudo extensivo de estudos de toxicidade em organismos humanos.

5. Bibliografia

1. WHO (World Health Organisation). Cancer. https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
2. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 7–30 (2020).
3. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
4. Greaves, M. & Maley, C. C. Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**, 306–313 (2012).
5. Tanaka, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J. Carcinog.* **8**, (2009).
6. Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. & Lee, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 2281–2285 (1973).
7. Peto, R. THE CAUSES OF CANCER : QUANTITATIVE ESTIMATES OF AVOIDABLE RISKS OF CANCER IN THE UNITED STATES TODAY My lecture spanned not only the hour allocated for it in the morning , but also the first half of the round table that afternoon , where it acted as an i. 587–593 (1983).
8. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
9. Joyce, J. A. & Pollard, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **9**, (2009).
10. American Cancer Society. American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. *Phytochemicals* (2000).
11. Golub, A. T. R. *et al.* Molecular Classification of Cancer : Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2899325> Linked references are available on . **286**, 531–537 (1999).
12. Visvader, J. E. Cells of origin in cancer. *Nature* **469**, 314–322 (2011).
13. Cahill, D. P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Lengauer, C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 57–60 (1999).
14. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).
15. Hoeijmakers, J. H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366–374 (2001).
16. Croce, C. M. Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–11 (2008).
17. Lengauer, C., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643–649 (1998).
18. Li, N., Grivennikov, S. I. & Karin, M. The Unholy Trinity: Inflammation, Cytokines, and STAT3 Shape The Cancer Microenvironment. *Cancer Cell* **19**, 429–431 (2011).
19. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. & Berneman, Z. N. The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **36**, 131–149 (2003).
20. Ouyang, L. *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* **45**, 487–498 (2012).
21. Brown, J. M. & Attardi, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 231–237 (2005).

22. M., H., H., W., A., A., Y., O. & N., S. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–23 (2014).
23. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. & Adjei, A. A. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA. Cancer J. Clin.* **55**, 178–194 (2005).
24. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
25. Wang, S. Y., Yu, Q. J., Zhang, R. D. & Liu, B. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1263–1266 (2011).
26. White, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 401–410 (2012).
27. Balkwill, F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 361–371 (2009).
28. Kim, N. W. *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (80-.)*. **266**, 2011–2015 (1994).
29. Harley, C. B. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 167–179 (2008).
30. Reddel, R. R. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett.* **194**, 155–162 (2003).
31. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 795–803 (2002).
32. Grossfeld, G. D. *et al.* Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: Association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 219–227 (1997).
33. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. 249–257 (2000).
34. De Palma, M., Biziato, D. & Petrova, T. V. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 457–474 (2017).
35. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275–292 (2011).
36. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* **127**, 679–695 (2006).
37. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
38. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
39. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 362–374 (2003).
40. Sahai, E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 87–96 (2005).
41. Yilmaz, M. & Christofori, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 15–33 (2009).
42. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. & Segall, J. E. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **14**, 777–783 (2012).
43. Lämmermann, T. & Sixt, M. Mechanical modes of ‘amoeboid’ cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 636–644 (2009).
44. Wu, Y. & Zhou, B. P. TNF- α /NF κ -B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br. J. Cancer* **102**, 639–644 (2010).
45. Linde, N., Fluegen, G. & Aguirre-Ghiso, J. A. *The Relationship Between Dormant Cancer Cells and Their Microenvironment. Advances in Cancer Research* vol. 132 (Elsevier Inc., 2016).
46. Malladi, S. *et al.* Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT.

- Cell* **165**, 45–60 (2016).
47. Cairns, R. A., Harris, I. S. & Mak, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 85–95 (2011).
 48. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G. & Thompson, C. B. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* **7**, 11–20 (2008).
 49. Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703–707 (2008).
 50. Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* **13**, 472–482 (2008).
 51. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
 52. Gordan, J. D., Thompson, C. B. & Simon, M. C. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* **12**, 108–113 (2007).
 53. Feron, O. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother. Oncol.* **92**, 329–333 (2009).
 54. Vinay, D. S. *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **35**, S185–S198 (2015).
 55. Vinay, D. S. *et al.* Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **35**, S185–S198 (2015).
 56. National Cancer Institute. How Cancer Is Diagnosed. *National Cancer Institute at the National Institutes of Health* <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis> (2015).
 57. Fass, L. Imaging and cancer: A review. *Mol. Oncol.* **2**, 115–152 (2008).
 58. Mayo Clinic. Biopsy: Types of biopsy procedures used to diagnose cancer. *Mayo Clinic* (2019).
 59. Wu, L. & Qu, X. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 2963–2997 (2015).
 60. Golubnitschaja, O. & Flammer, J. What Are the Biomarkers for Glaucoma? *Surv. Ophthalmol.* **52**, 155–161 (2007).
 61. Sawyers, C. L. The cancer biomarker problem. *Nature* **452**, 548–552 (2008).
 62. Henry, N. L. & Hayes, D. F. Cancer biomarkers. *Mol. Oncol.* **6**, 140–146 (2012).
 63. Kazane, S. A. *et al.* Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3731–3736 (2012).
 64. De La Rica, R. & Stevens, M. M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 821–824 (2012).
 65. Lee, H., Park, J. E. & Nam, J. M. Bio-barcode gel assay for microRNA. *Nat. Commun.* **5**, 3367 (2014).
 66. Law, W. C., Yong, K. T., Baev, A. & Prasad, P. N. Sensitivity improved surface plasmon resonance biosensor for cancer biomarker detection based on plasmonic enhancement. *ACS Nano* **5**, 4858–4864 (2011).
 67. Li, M. *et al.* Three-dimensional hierarchical plasmonic nano-architecture enhanced surface-enhanced Raman scattering immunosensor for cancer biomarker detection in blood plasma. *ACS Nano* **7**, 4967–4976 (2013).
 68. Wang, J., Wu, L., Ren, J. & Qu, X. Visualizing human telomerase activity with primer-modified Au nanoparticles. *Small* **8**, 259–264 (2012).
 69. Chikkaveeraiah, B. V., Bhirde, A. A., Morgan, N. Y., Eden, H. S. & Chen, X. Electrochemical

- immunosensors for detection of cancer protein biomarkers. *ACS Nano* **6**, 6546–6561 (2012).
70. Mizusawa, K., Takaoka, Y. & Hamachi, I. Specific cell surface protein imaging by extended self-assembling fluorescent turn-on nanoprobe. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13386–13395 (2012).
 71. Wu, X. & Zhu, L. Next-Generation Novel Noninvasive Cancer Molecular Diagnostics Platforms Beyond Tissues. (2019).
 72. National Cancer Institute. Treatment for Cancer. 1 <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment> (2015).
 73. Lord, C. J. & Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287–294 (2012).
 74. Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* **432**, 294–297 (2004).
 75. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance : A Brief Review. *Tabriz Univ. Med. Sci.* **7**, 339–348 (2017).
 76. Rebutti, M. & Michiels, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 1219–1226 (2013).
 77. Good, B. M., Ainscough, B. J., McMichael, J. F., Su, A. I. & Griffith, O. L. Organizing knowledge to enable personalization of medicine in cancer. *Genome Biol.* **15**, 1–9 (2014).
 78. Amirovichene-Angelozzi, N., Swanton, C. & Bardelli, A. Tumor evolution as a therapeutic target. *Cancer Discov.* **7**, 805–817 (2017).
 79. Sounni, N. E. & Noel, A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin. Chem.* **59**, 85–93 (2013).
 80. Schwartz, G. K. & Shah, M. A. Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **23**, 9408–9421 (2005).
 81. Sparreboom, A., De Jonge, M. J. A. & Verweij, J. The use of oral cytotoxic and cytostatic drugs in cancer treatment. *Eur. J. Cancer* **38**, 18–22 (2002).
 82. Peer, D. *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. 751–760 (2007).
 83. Baxevanis, C. N., Perez, S. A. & Papamichail, M. Cancer immunotherapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **46**, 167–189 (2009).
 84. Amer, M. H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol. Cell. Ther.* **2**, 27 (2014).
 85. Jhaveri, A., Deshpande, P. & Torchilin, V. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy. *J. Control. Release* **190**, 352–370 (2014).
 86. Sharma, P. & Allison, J. P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential. *Cell* **161**, 205–214 (2015).
 87. Waehler, R., Russell, S. J. & Curiel, D. T. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 573–587 (2007).
 88. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
 89. Roma-rodrigues, C., Rivas-garcía, L., Baptista, P. V. & Fernandes, A. R. Gene therapy in cancer treatment: Why go nano? *Pharmaceutics* **12**, (2020).
 90. Heller, L. & Heller, R. Electroporation Gene Therapy Preclinical and Clinical Trials for Melanoma. *Curr. Gene Ther.* **10**, 312–317 (2010).
 91. Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y. & He, N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics* **4**, 240–255 (2014).
 92. Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J. & Wolchok, J. D. The future of cancer treatment:

- Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 273–290 (2016).
93. Hanna, E., Quick, J. & Libutti, S. K. The tumour microenvironment: A novel target for cancer therapy. *Oral Dis.* **15**, 8–17 (2009).
 94. Ferreira, D. *et al.* Gold Nanoparticles for Vectorization of Nucleic Acids for Cancer Therapeutics. *Molecules* **25**, (2020).
 95. Gupta, S. K. & Shukla, P. Gene editing for cell engineering: trends and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **37**, 672–684 (2017).
 96. Carroll, D. Genome Editing: Past, Present, and Future. *Yale J. Biol. Med.* **90**, 653–659 (2017).
 97. Li, H. *et al.* Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, (2020).
 98. Zhan, T., Rindtorff, N., Betge, J., Ebert, M. P. & Boutros, M. CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. *Semin. Cancer Biol.* **55**, 106–119 (2019).
 99. Wyman, J. *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPER/Cas System. *Science (80-.)*. 819–824 (2013).
 100. Joung, J. K. & Sander, J. D. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 49–55 (2013).
 101. Miller, J. C. *et al.* An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* **25**, 778–785 (2007).
 102. Silva, G. *et al.* Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* **11**, 11–27 (2011).
 103. Bennett, C. F. & Swayze, E. E. RNA targeting therapeutics: Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 259–293 (2010).
 104. Chery, J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc J.* **4**, (2016).
 105. Serganov, A. & Patel, D. J. Ribozymes, riboswitches and beyond: Regulation of gene expression without proteins. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 776–790 (2007).
 106. Kim, D. H. & Rossi, J. J. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* **44**, 613–616 (2008).
 107. Deng, Y. *et al.* Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies. *Gene* **538**, 217–227 (2014).
 108. Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Gene silencing using multifunctionalized gold nanoparticles for cancer therapy. *Methods Mol. Biol.* **1530**, 319–336 (2017).
 109. Lundstrom, K. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases* **6**, (2018).
 110. Ramamoorth, M. & Narvekar, A. Non viral vectors in gene therapy - An overview. *J. Clin. Diagnostic Res.* **9**, GE01–GE06 (2015).
 111. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
 112. Liu, C., Zhang, L., Liu, H. & Cheng, K. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J. Control. Release* **266**, 17–26 (2017).
 113. Stadtmauer, E. A. *et al.* CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science (80-.)*. **367**, (2020).
 114. Paschon, D. E. *et al.* Diversifying the structure of zinc finger nucleases for high-precision genome editing. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 115. Zheng, N., Li, L. & Wang, X. Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials

- of genome editing systems. *Clin. Transl. Med.* **10**, 412–426 (2020).
116. Kher, G., Trehan, S. & Misra, A. *Antisense Oligonucleotides and RNA Interference. Challenges in Delivery of Therapeutic Genomics and Proteomics* (Elsevier Inc., 2011). doi:10.1016/B978-0-12-384964-9.00007-4.
 117. Ryou, S. M. *et al.* Gold nanoparticle-assisted delivery of small, highly structured RNA into the nuclei of human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 178–183 (2011).
 118. Senapati, D. *et al.* Promising approaches of small interfering RNAs (siRNAs) mediated cancer gene therapy. *Gene* **719**, (2019).
 119. Kim, J. H. *et al.* Effective delivery of anti-miRNA DNA oligonucleotides by functionalized gold nanoparticles. *J. Biotechnol.* **155**, 287–292 (2011).
 120. Collin, R. W. J. & Garanto, A. Applications of antisense oligonucleotides for the treatment of inherited retinal diseases. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **28**, 260–266 (2017).
 121. Bozic, I. *et al.* Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *Elife* **2013**, 1–15 (2013).
 122. Baxevasis, C. N., Perez, S. A. & Papamichail, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 317–324 (2009).
 123. Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. & Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 20–37 (2017).
 124. Greish, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. in *Cancer Nanotechnology* vol. 4 25–37 (2010).
 125. Xu, X., Ho, W., Zhang, X., Bertrand, N. & Farokhzad, O. Cancer nanomedicine: From targeted delivery to combination therapy. *Trends Mol. Med.* **21**, 223–232 (2015).
 126. Lynch, I. & Dawson, K. A. Protein-nanoparticle interactions. *NanoToday* **3**, 40–47 (2008).
 127. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 16014 (2016).
 128. Owens, D. E. & Peppas, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **307**, 93–102 (2006).
 129. Li, H. J. *et al.* Stimuli-responsive clustered nanoparticles for improved tumor penetration and therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 4164–4169 (2016).
 130. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. & Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug. Chem.* **30**, 263–272 (2019).
 131. Mura, S., Nicolas, J. & Couvreur, P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nat. Mater.* **12**, 991–1003 (2013).
 132. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *J. Control. Release* **200**, 138–157 (2015).
 133. Ferrari, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 161–171 (2005).
 134. Sumer, B. & Gao, J. Theranostic nanomedicine for cancer. *Nanomedicine* **3**, 137–140 (2008).
 135. Riley, M. K. & Vermerris, W. Recent advances in nanomaterials for gene delivery—A review. *Nanomaterials* **7**, 1–19 (2017).
 136. Kesharwani, P. & Iyer, A. K. Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery. *Drug Discov. Today* **20**, 536–547 (2015).
 137. Abbasi, E. *et al.* Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 247 (2014).

138. Liu, C. *et al.* A boronic acid–rich dendrimer with robust and unprecedented efficiency for cytosolic protein delivery and CRISPR–Cas9 gene editing. *Sci. Adv.* **5**, (2019).
139. Bartsevich, V. Jantz, D. Smith, J. Nicholson, M. Treatment of Retinitis Pigmentosa Using Engineered Meganucleases. WO/2017/044649 (2017).
140. Pandey, H., Rani, R. & Agarwal, V. Liposome and their applications in cancer therapy. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **59**, (2016).
141. Celsion Corporation. ThermoDox. (2016).
142. Barba, A. A., Bochicchio, S., Dalmoro, A. & Lamberti, G. Lipid delivery systems for nucleic-acid-based-drugs: From production to clinical applications. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
143. Park, J. H. *et al.* Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 113–137 (2008).
144. Yadav, H. K. S., Almokdad, A. A., shaluf, S. I. M. & Debe, M. S. *Polymer-Based Nanomaterials for Drug-Delivery Carriers. Nanocarriers for Drug Delivery* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-814033-8.00017-5.
145. Jo, A. *et al.* Fabrication and characterization of PLGA nanoparticles encapsulating large CRISPR–Cas9 plasmid. *J. Nanobiotechnology* **18**, (2020).
146. Saleem, J., Wang, L. & Chen, C. Carbon-Based Nanomaterials for Cancer Therapy via Targeting Tumor Microenvironment. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1–30 (2018).
147. Ray, S. C. & Jana, N. R. *Application of Carbon-Based Nanomaterials as Drug and Gene Delivery Carrier. Carbon Nanomaterials for Biological and Medical Applications* (2017). doi:10.1016/b978-0-323-47906-6.00005-9.
148. Luo, T. Y. *et al.* Photoluminescent F-doped carbon dots prepared by ring-opening reaction for gene delivery and cell imaging. *RSC Adv.* **8**, 6053–6062 (2018).
149. Zhang, H., Yee, D. & Wang, C. Quantum dots for cancer diagnosis and therapy: Biological and clinical perspectives. *Nanomedicine* **3**, 83–91 (2008).
150. Wu, F.-G. *et al.* Quantum Dots for Cancer Therapy and Bioimaging. in 89–135 (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-89878-0_3.
151. Beik, J. *et al.* Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies. *Coord. Chem. Rev.* **387**, 299–324 (2019).
152. Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J. & Park, H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front. Chem.* **7**, (2019).
153. Lee, K. *et al.* Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 889–901 (2017).
154. Wang, P. *et al.* Thermo-triggered Release of CRISPR–Cas9 System by Lipid-Encapsulated Gold Nanoparticles for Tumor Therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **57**, 1491–1496 (2018).
155. Hervault, A. & Thanh, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* **6**, 11553–11573 (2014).
156. Wu, M. & Huang, S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment. *Mol. Clin. Oncol.* 738–746 (2017) doi:10.3892/mco.2017.1399.
157. Rohiwal, S. S. *et al.* Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
158. Bozzuto, G. & Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
159. Patil, Y. P. & Jadhav, S. Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids* **177**, 8–18 (2014).
160. Balazs, D. A. & Godbey, W. Liposomes for Use in Gene Delivery. *J. Drug Deliv.* **2011**, 1–12

- (2011).
161. Ozpolat, B., Sood, A. K. & Lopez-Berestein, G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **66**, 110–116 (2014).
 162. Wolfrum, C. *et al.* Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1149–1157 (2007).
 163. Akinc, A. *et al.* A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat. Biotechnol.* **26**, 561–569 (2008).
 164. Dulińska-Litewka, J. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications. *Materials (Basel)*. **12**, (2019).
 165. Chang, D. *et al.* Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Front. Pharmacol.* **9**, 831 (2018).
 166. Beola, L. *et al.* Dual Role of Magnetic Nanoparticles as Intracellular Hotspots and Extracellular Matrix Disruptors Triggered by Magnetic Hyperthermia in 3D Cell Culture Models. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 44301–44313 (2018).
 167. Cazares-Cortes, E. *et al.* Recent insights in magnetic hyperthermia: From the “hot-spot” effect for local delivery to combined magneto-photo-thermia using magneto-plasmonic hybrids. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 233–246 (2019).
 168. Mello, P. de A. *et al.* Hyperthermia and associated changes in membrane fluidity potentiate P2X7 activation to promote tumor cell death. *Oncotarget* **8**, 67254 (2017).
 169. Garanina, A. S. *et al.* Temperature-controlled magnetic nanoparticles hyperthermia inhibits primary tumor growth and metastases dissemination. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **25**, 102171 (2020).
 170. Mendes, R., Fernandes, A. R. & Baptista, P. V. Gold nanoparticle approach to the selective delivery of gene silencing in cancer-The case for combined delivery? *Genes (Basel)*. **8**, (2017).
 171. Foroozandeh, P. & Aziz, A. A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **13**, 1–12 (2018).
 172. Barnaby, S. N., Lee, A. & Mirkin, C. A. Probing the inherent stability of siRNA immobilized on nanoparticle constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9739–9744 (2014).
 173. Moore, T. L. *et al.* Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6287–6305 (2015).
 174. Remant Bahadur, K. C., Thapa, B. & Bhattarai, N. Gold nanoparticle-based gene delivery: Promises and challenges. *Nanotechnol. Rev.* **3**, 269–280 (2014).
 175. Kong, W. H., Bae, K. H., Jo, S. D., Kim, J. S. & Park, T. G. Cationic lipid-coated gold nanoparticles as efficient and non-cytotoxic intracellular siRNA delivery vehicles. *Pharm. Res.* **29**, 362–374 (2012).
 176. Li, P., Li, D., Zhang, L., Li, G. & Wang, E. Cationic lipid bilayer coated gold nanoparticles-mediated transfection of mammalian cells. *Biomaterials* **29**, 3617–3624 (2008).
 177. Baptista, P. V. Gold nanobeacons: A potential nanotheranostics platform. *Nanomedicine* **9**, 2247–2250 (2014).
 178. Kumar, S. *et al.* Functionalized gold nanostructures: Promising gene delivery vehicles in cancer treatment. *RSC Adv.* **9**, 23894–23907 (2019).
 179. McIntosh, C. M. *et al.* Inhibition of DNA transcription using cationic mixed monolayer protected gold clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7626–7629 (2001).
 180. Ghosh, P. S., Kim, C. K., Han, G., Forbes, N. S. & Rotello, V. M. Efficient gene delivery vectors by tuning the surface charge density of amino acid-functionalized gold nanoparticles. *ACS Nano* **2**, 2213–2218 (2008).

181. Elbakry, A. *et al.* Layer-by-layer assembled gold nanoparticles for sirna delivery. *Nano Lett.* **9**, 2059–2064 (2009).
182. Guo, S. *et al.* Enhanced gene delivery and siRNA silencing by gold nanoparticles coated with charge-reversal polyelectrolyte. *ACS Nano* **4**, 5505–5511 (2010).
183. Hong, R. *et al.* Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1078–1079 (2006).
184. Han, G. *et al.* Light-regulated release of DNA and its delivery to nuclei by means of photolabile gold nanoparticles. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **45**, 3165–3169 (2006).
185. Mady, M. M., Fathy, M. M., Youssef, T. & Khalil, W. M. Biophysical characterization of gold nanoparticles-loaded liposomes. *Phys. Medica* **28**, 288–295 (2012).
186. Chithrani, D. B., Dunne, M., Stewart, J., Allen, C. & Jaffray, D. A. Cellular uptake and transport of gold nanoparticles incorporated in a liposomal carrier. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **6**, 161–169 (2010).
187. Kojima, C., Hirano, Y., Yuba, E., Harada, A. & Kono, K. Preparation and characterization of complexes of liposomes with gold nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **66**, 246–252 (2008).
188. Paasonen, L. *et al.* Gold-embedded photosensitive liposomes for drug delivery: Triggering mechanism and intracellular release. *J. Control. Release* **147**, 136–143 (2010).
189. Kimling, J. *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15700–15707 (2006).
190. Baptista, P., Conde, J., Rosa, J. & Baptista, P. Gold-Nanobeacons as a theranostic system for the detection and inhibition of specific genes. *Protoc. Exch.* 1–50 (2013) doi:10.1038/protex.2013.088.
191. Liu, B. & Liu, J. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. *Anal. Methods* **9**, 2633–2643 (2017).
192. Approach, C. *et al.* Supporting Information. *Scan. Electron Microsc.* 1–7 (2007).
193. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–4221 (2007).
194. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
195. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* 1–25 (2004).
196. Watts, J. K. & Corey, D. R. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic. *J. Pathol.* **226**, 365–379 (2012).
197. Ding, Y. *et al.* Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. *Mol. Ther.* **22**, 1075–1083 (2014).
198. Cordeiro, M. *et al.* Gold nanobeacons for tracking gene silencing in zebrafish. *Nanomaterials* **7**, 1–8 (2017).
199. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. & Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* **6**, 715–728 (2011).
200. Ghosh, R., Singh, L. C., Shohet, J. M. & Gunaratne, P. H. A gold nanoparticle platform for the delivery of functional microRNAs into cancer cells. *Biomaterials* **34**, 807–816 (2013).
201. Kepsutlu, B. *et al.* Cells Undergo Major Changes in the Quantity of Cytoplasmic Organelles after Uptake of Gold Nanoparticles with Biologically Relevant Surface Coatings. *ACS Nano* **14**, 2248–2264 (2020).