

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Terapia Génica com Ondas Fotoacústicas

Evgheni Seletchi

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal orientada pelo Professor Doutor Luís Arnaut e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Agradecimentos

No fim de mais uma etapa do meu percurso académico, repleta de momentos marcantes e desafiantes, não posso deixar de agradecer às pessoas que foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e académico.

Ao Professor Dr. Luís Arnaut, agradeço pela disponibilidade, pelas palavras de motivação, por todo o conhecimento e por toda a ajuda que me permitiu crescer a nível académico e acima de tudo, como pessoa. Quero agradecer pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de investigadores, e realizar um projeto na minha área de interesse.

Ao Diogo Pereira, agradeço por toda a paciência e disponibilidade para o esclarecimento das minhas questões a nível científico. Agradeço por toda a ajuda que foi fundamental para o meu desenvolvimento, e para a concretização deste projeto.

To Daniele Vella, thank you for the opportunity to work and learn with you.

À LaserLeap Technologies, S.A. (Coimbra, Portugal), pelo fornecimento dos materiais piezofotónicos. Ao João e ao Celso, agradeço pela ajuda prestada e pela partilha de conhecimentos.

A todo o grupo, obrigado por me inserirem num ambiente fantástico, que me permitiu crescer a nível científico. Ao Doutor Fábio, por toda a ajuda no laser. À Doutora Lígia e à Mafalda pela ajuda na citometria de fluxo. À Maria Inês pelas advertências. À Anita pelos conselhos fornecidos. A todos por momentos inesquecíveis.

À Dr. Ana Mata por todo o apoio dado nos momentos de stress a nível informático.

À Joana Santos, pela amizade incontestável, pela ajuda em tantos momentos, por estar sempre disponível e por todas as conversas que partilhámos.

Ao José Precatado, pelos momentos especiais vividos, por todo o apoio emocional, pela ajuda nos momentos mais complicados, um irmão.

À Maria, não posso deixar de agradecer por estar presente quando mais necessito, pelo carinho e compreensão nos meus momentos de frustração. Obrigado por seres quem és.

Por fim, aos meus pais e à minha irmã, agradeço do fundo do coração por tudo o que fazem por mim, por toda a dedicação, presença e esforço realizado para eu seguir os meus

sonhos, por me fazerem sentir especial. Um orgulho imenso, impossível de expressar.
Tenha muita sorte em ter-vos na minha vida. Obrigado.

Resumo

A terapia genética consiste num processo que envolve a manipulação genética de células específicas com o uso de ácidos nucleicos, através da substituição ou correção de genes alterados com um objetivo terapêutico. A principal dificuldade dos métodos de terapia genética existentes é em permear a membrana celular para uma entrega segura do DNA.

O objetivo deste trabalho consistiu no uso de um método de transfeção não-viral mediado por ondas de pressão induzidas por laser. Os transdutores luz-pressão, conhecidos como materiais piezofotônicos são formados por um cromóforo com elevada capacidade de absorção de luz confinado num material com elevada expansão termoelástica. Pulsos de laser na ordem dos nanossegundos (8 ns) e picossegundos (30 ps), com comprimento de onda de 1064 nm, absorvidos pelo material piezofotônico fuligem-PDMS, com elevada eficiência de conversão da luz em pressão, originaram ondas fotoacústicas capazes de aumentar a permeabilidade da membrana celular facilitando a entrada do plasmídeo codificador da proteína verde fluorescente.

De forma a obter diferentes gradientes de pressão, usando fluências de laser relativamente baixas (60 mJ cm^{-2} e 100 mJ cm^{-2}) foi possível gerar ondas com pressões absolutas elevadas (60 bar e 100 bar), e larguras de banda de frequências relativamente baixas (10 MHz), em relação a outros materiais estudados pelo nosso grupo de investigação (MnTPP). Esta técnica mostrou ser segura, apresentando uma viabilidade celular superior a 95% mesmo após vários minutos de exposição às ondas fotoacústicas. Tal, é uma característica bastante vantajosa, além de que é possível expor os materiais a sucessivos pulsos de laser sem os danificar.

Os resultados da transfeção foram avaliados usando as técnicas de microscopia de fluorescência e de citometria de fluxo. Estes resultados demonstraram que o laser de nanossegundos com um pulso de 8 ns apresentou menor eficiência do que o laser de picossegundos com pulso de 30 ps, onde se obteve uma eficiência de transfeção de aproximadamente 5% em células da linha celular COS-7. Este resultado indica que a presença de maiores pressões, induzindo maiores gradientes de pressão, tem elevada relevância para a permeabilização da membrana celular.

Futuramente, espera-se que após algumas otimizações, esta técnica possa ser introduzida na prática clínica.

Abstract

Gene therapy involves a process that requires the genetic manipulation of specific cells using nucleic acids, through the replacement or correction of altered genes for a therapeutic purpose. The main difficulty with existing gene therapy methods is in permeating the cell membrane for safe DNA delivery.

The aim of this work was to use a non-viral transfection method mediated by laser-induced pressure waves. Light-pressure transducers, known as piezophotonic materials, are composed of a chromophore with a high light-absorption capacity confined in a material with high thermoelastic expansion. Laser pulses in the nanosecond range (8 ns) and picosecond range (30 ps), with a wavelength at 1064 nm, were absorbed by the piezophotonic material fuligem-PDMS, which exhibits a high efficiency in converting light into pressure, giving rise to photoacoustic waves capable of enhancing cell membrane permeability, facilitating the entry of the plasmid encoding the green fluorescent protein (gWizGFP).

In order to achieve different pressure gradients, low laser fluences (60 mJ cm⁻² and 100 mJ cm⁻²) were used, resulting in the generation of high absolute pressures (60 bar and 100 bar), and relatively low-frequency bandwidths (10 MHz), compared to other materials studied by our research group (MnTPP). This technique has proven to be safe, with cell viability exceeding 95% even after several minutes of exposure to photoacoustic waves. This is a highly advantageous feature, and it is also possible to expose the materials to successive laser pulses without damaging them.

Transfection results were evaluated using fluorescence microscopy and flow cytometry techniques. These results showed that the nanosecond laser with an 8 ns pulse had lower efficiency than the picosecond laser with a 30 ps pulse, achieving a transfection efficiency of approximately 5% in COS-7 cell line. This result indicates that the presence of higher pressures, inducing higher pressure gradients, is highly relevant for cell membrane permeabilization.

In the future, it is expected that after some optimizations, this technique can be introduced into clinical practice.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xv
Capítulo 1	1
Introdução.....	3
1.1 Terapia Genética.....	3
1.2 Membranas Biológicas.....	6
1.3 Transfeção Genética	7
1.3.1 Transfeção Viral.....	8
1.3.2 Transfeção Não-Viral	11
1.3.3 Combinação de Métodos de Transfeção “Viral” e “Não-Viral”	16
1.4 Ondas de pressão	17
1.4.1 Ondas ultrassónicas.....	17
1.4.2 Ondas de choque.....	18
1.4.3 Ondas fotoacústicas	19
1.5 Material Piezofotónico	25
1.6 As ondas fotoacústicas na permeabilização de membranas biológicas	26
Capítulo 2	29
Materiais e Métodos	31
1.7 Reagentes	31
1.8 Equipamento	32
1.9 Filmes Piezofotónicos	32

1.10	Cultura Celular	33
1.11	Espetro de Absorção	33
1.12	Caracterização das ondas Fotoacústicas	34
1.13	Viabilidade Celular	36
1.14	Transfeção <i>in vitro</i>	38
1.15	Microscopia de Fluorescência.....	39
1.16	Citometria de Fluxo.....	40
1.17	Análise estatística	41
Capítulo 3		43
Resultados		45
1.18	Caracterização das ondas fotoacústicas	45
1.19	Viabilidade Celular	49
1.20	Transfeção <i>in vitro</i>	51
1.21	Citometria de Fluxo.....	53
Capítulo 4		57
Discussão		59
Conclusão		63
Bibliografia		65
Referências.....		67
Material Suplementar		77

Lista de Figuras

- Figura 1:** Exemplo de um processo de terapia genética. Primeiramente é inserido parte do DNA de uma célula saudável no vetor viral, e de seguida, este entra na célula alvo através da fusão com a membrana celular, deslocando-se até ao núcleo onde será transcrito o DNA saudável. Retirado de ¹⁵4
- Figura 2:** Demonstração de alguns tipos de vírus com as suas respetivas diferenças. A) Representação da estrutura de um adenovírus; B) Representação da estrutura de um retrovírus; C) Representação da estrutura de um vírus adenoassociado. Adaptado de ⁴⁵.9
- Figura 3:** Representação esquemática de um vírus adenoassociado. Esquematização dos respetivos genes presentes na cadeia simples de DNA, característica deste tipo de vírus.....11
- Figura 4:** Representação esquemática de um processo de transfeção física, a eletroporação. A) Representação da célula antes da eletroporação; B) Representação da célula durante o processo de indução de campo magnético, formando poros para a entrada do DNA; C) Representação da célula após a eletroporação, onde a membrana recupera a sua integridade. Retirado de ⁵²12
- Figura 5:** Representação de alguns processos de transfeção química. A) Formação do complexo DNA-lipossomas catiónicos, através de ligações eletrostáticas; B) Ligação dos íons de cálcio com o DNA; C) Formação do complexo DNA-polímeros catiónicos. Estas ligações permitem a ligação aos recetores presentes na membrana celular facilitando a entrada do DNA. Retirado de ⁵²14
- Figura 6:** Imagem ilustrativa das variações de densidade que se propagam no material.17
- Figura 7:** Representação do efeito fotoacústico. Após irradiação do material, a energia é absorvida, resultando na sua expansão termoelástica, gerando assim a onda acústica. Retirado de ⁷⁹20
- Figura 8:** Representação de uma onda de pressão em função do espaço. Na figura observa-se a zona de compressão, que representa os valores mais altos de pressão, e a zona de rarefação, representativa dos valores mais baixos de pressão. Adaptado da referência ⁸.....22
- Figura 9:** Representação esquemática da geração de ondas fotoacústicas, usando um material piezofotónico. Adaptado da referência ⁷⁹22

Figura 10: Diagrama de Jablonski. Representação dos vários eventos que podem ocorrer após a excitação do elétron. Retirado da referência ⁸⁷	23
Figura 11: Espectro de absorção do filme de fuligem.....	33
Figura 12: Imagem ilustrativa da montagem experimental usada para medir a pressão absoluta das ondas geradas pelos filmes de MnTPP. Retirado da referência ⁸³	35
Figura 13: Imagem ilustrativa da montagem experimental para medir a largura de banda das ondas geradas pelos filmes de fuligem. Adaptado da referência ⁸³	35
Figura 14: Imagem ilustrativa da montagem experimental para medir a pressão absoluta das ondas geradas pelos filmes de fuligem. Adaptado da referência ⁸³	36
Figura 15: Imagem ilustrativa da montagem utilizada para as experiências de viabilidade celular e de transfeção com o laser de picossegundos. A diferença para o laser de nanossegundos é o diâmetro do feixe de laser (0,8 cm).....	37
Figura 16: Esquema ilustrativo do protocolo utilizado para cálculo da viabilidade celular.....	37
Figura 17: Espectro de excitação e emissão de fluorescência da GFP.	39
Figura 18: Sinais fotoacústicos obtidos com o laser de 8 ns, com uma fluência de 60 mJ cm ⁻² a 1064 nm, mostrando a) a pressão absoluta registada pelo Hidrofone de 30 MHz e calibrada e b) a FFT da onda detetada com o Transdutor de 225 MHz, com as respetivas frequências.....	46
Figura 19: Sinais fotoacústicos obtidos com o laser de 30 ps, com uma fluência de a) 60 mJ cm ⁻² e b) 100 mJ cm ⁻² a 1064 nm, mostrando (a e b) as pressões absolutas registadas pelo Hidrofone de 30 MHz e calibrada, c) a FFT da onda detetada com o Transdutor de 225 MHz, com as respetivas frequências, com uma fluência de 100 mJ cm ⁻²	47
Figura 20: Valores respetivos da viabilidade celular para as duas densidades avaliadas com exposição ao laser de nanossegundos com uma fluência de 60 mJ cm ⁻² , variando a frequência de disparo e o tempo de irradiação.	49
Figura 21: Valores respetivos da viabilidade celular para as duas densidades avaliadas com exposição ao laser de picossegundos usando duas fluências distintas (60 mJ cm ⁻² e 100 mJ cm ⁻²), alterando o tempo de irradiação.	50
Figura 22: Imagem representativa da transfeção de gWizGFP, usando uma concentração de 250 µg/mL 48 horas após a aplicação de ondas fotoacústicas por 10	

minutos na linha celular COS-7 com 100 mJ cm^{-2} de fluência de laser com 30 ps de duração do pulso.....52

Figura 23: Imagem representativa da transfeção de gWizGFP, usando uma concentração de $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 48 horas após a aplicação de ondas fotoacústicas por 10 minutos na linha celular COS-7 com 100 mJ cm^{-2} de fluência de laser com 30 ps de duração do pulso.....52

Figura 24: Expressão de GFP (à direita do traço a preto no gráfico) e luz de dispersão lateral das células (SSC), 48h após a transfeção. a) Controlo sem aplicação das ondas fotoacústicas, com adição de $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de plasmídeo; b) Transfeção com aplicação das ondas fotoacústicas durante 10 min usando pulsos de laser de 30 ps com uma fluência de 100 mJ cm^{-2} com concentração de plasmídeo igual a $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$53

Figura 25: Expressão de GFP (à direita do traço a preto no gráfico) e luz de dispersão lateral das células (SSC), 48h após a transfeção. a) Controlo sem aplicação das ondas fotoacústicas, com adição de $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$ de plasmídeo; b) Transfeção com aplicação das ondas fotoacústicas durante 10 min usando pulsos de laser de 8 ns, com uma frequência de 10 Hz e uma fluência de 60 mJ cm^{-2} com concentração de plasmídeo igual a $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$. c) Transfeção com aplicação das ondas fotoacústicas durante 10 min usando pulsos de laser de 8 ns, com uma frequência de 20 Hz e uma fluência de 60 mJ cm^{-2} com concentração de plasmídeo igual a $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$54

Lista de Tabelas

Tabela 1 : Características dos diferentes filmes e das respectivas ondas geradas.	48
Tabela 2 : Tabela referente ao resultado obtido da transfeção <i>in vitro</i> , usando filme de fuligem combinado com PDMS para a geração de ondas, com uma exposição de 10 min ao laser de picossegundos, com uma fluência de 100 mJ cm^{-2} , e ao laser de nanossegundos durante 10 min, usando duas frequências diferentes, com uma concentração de gWizGFP de $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$	55

Lista de abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ASGCT	Sociedade Americana de Terapia Genética e Celular
FDA	<i>“Food and Drug Administration”</i>
OCT	Deficiência da ornitina transcarbamilase
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas
ATP	Adenosina Trifosfato
RNAs	Ácidos ribonucleicos
ITRs	Repetições terminais invertidas
Rep	<i>“Replication”</i>
Cap	<i>“Capsid”</i>
AAP	<i>“Assembly”</i>
AuNPs	Nanopartículas de ouro
PEI	Polietilenoimina
SWT	Terapia usando ondas de choque
US	Ultrassom
PAT	Tomografia Fotoacústica
sO₂	Saturação de oxigênio da hemoglobina
CF	Nanofibras de carbono
CNTs	Nanotubos de carbono
CSNP	Nanopartículas de fuligem de carbono
PDMS	Polidimetilsiloxano
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes
TEWL	Perda de água trans epidérmica

MnTPP	Cloreto de manganésio (III) 5, 10, 15, 20- tetrafenilporfirinato
PS	Polistireno
GFP	Proteína verde fluorescente
MIT	<i>“Massachusetts Institute of Technology”</i>
DMEM	Meio de Cultura (do inglês, <i>Dubbelco’s Modified Eagle’s Medium</i>)
HEPES	Tampão de ácido de 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico
FBS	Soro fetal de bovino
PenStrep	Penicilina-estreptomicina
PBS	Solução de tampão fosfato-salino
COS-7	Linha celular de fibroblastos de macaco
FSC	Dispersão frontal (do inglês, <i>Forward Scatter</i>)
SSC	Dispersão lateral (do inglês, <i>Side Scatter</i>)
FFT	Transformada de Fourier
A	Absorvância
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
LISW	Ondas de stress induzidas por laser

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Introdução

1.1 Terapia Génica

Até aos anos 50, quando o bioquímico americano James Watson e o biofísico britânico Francis Crick desenvolveram o modelo revolucionário do ácido desoxirribonucleico (DNA) de dupla hélice, pouco se sabia sobre a natureza física e a origem dos genes. Genes são sequências de DNA que contém a informação necessária para a síntese de um produto biologicamente funcional, como proteínas, para além de codificar certas características genotípicas e fenotípicas.¹ Em 1970, foi descoberta uma série de enzimas, a DNA ligase e as endonucleases, que permitiam a separação dos genes em locais específicos ao longo da molécula de DNA e posteriormente a sua inserção de forma reprodutível. Estes avanços científicos permitiram o aparecimento da engenharia genética, que culminou, por volta dos anos 80, com o surgimento da expressão “Terapia Genética”.^{2,3}

A ideia de que um gene pode ser introduzido em células específicas, e sua expressão levar a uma terapia eficaz, melhorando bastante a qualidade de vida dos pacientes, foi originalmente introduzida por Theodore Friedmann. Mais tarde foi fortemente impulsionada e concretizada por George Stamatoyannopoulos, um dos membros fundadores da Sociedade Americana de Terapia Genética e Celular (ASGCT).^{4,5}

A terapia genética consiste num processo que envolve a manipulação genética de células específicas com o uso de ácidos nucleicos, através da substituição ou correção de genes alterados, ou modificando locais específicos, com um objetivo terapêutico.^{6,7} Esta é, na verdade, a diferença mais importante entre a terapia celular e a terapia genética: na terapia celular, as células não são geneticamente modificadas, mas sim submetidas a uma manipulação externa, envolvendo cultura celular, para uma posterior adição ao organismo, enquanto a terapia genética é mediada pela adição ou substituição de ácidos nucleicos.⁴

Esta terapia pretende alterar a qualidade de vida de pacientes que sofrem de doenças genéticas agressivas e que apresentam tratamentos bastante limitados, como a fibrose cística, a hemofilia ou doença de Huntington. Após décadas de pesquisa intensiva e centenas de ensaios clínicos, quatro terapias genéticas foram aprovadas pela “*Food and Drug Administration*” (FDA): Glybera® (uniQure B. V.) para a deficiência familiar da

lipoproteína lipase, Luxturna® (Spark Therapeutics) para distrofia retiniana, Imlygic® (Amgen) para melanoma e Strimvelis® (GlaxoSmithKline) para imunodeficiência combinada grave de adenosina desaminase.⁸

A terapia genética consiste na inserção do gene num vetor, que pode ser plasmidial, nano estruturado ou viral (como representado na figura 1), sendo o último o mais utilizado devido à sua eficácia em invadir células e introduzir o seu material genético nas células, que *in vitro* pode ultrapassar 90%.^{6,9} No entanto, os vetores virais apresentam algumas limitações como preocupações relacionadas com a mutagenese¹⁰ e imunogenicidade¹¹, e um potencial de empacotamento limitado¹², ou seja, a quantidade de material genético incorporado no vetor não pode ser muito elevada. Para além disso, há alguma dificuldade na produção de vetores virais¹³, além de apresentarem um custo elevado.¹⁴

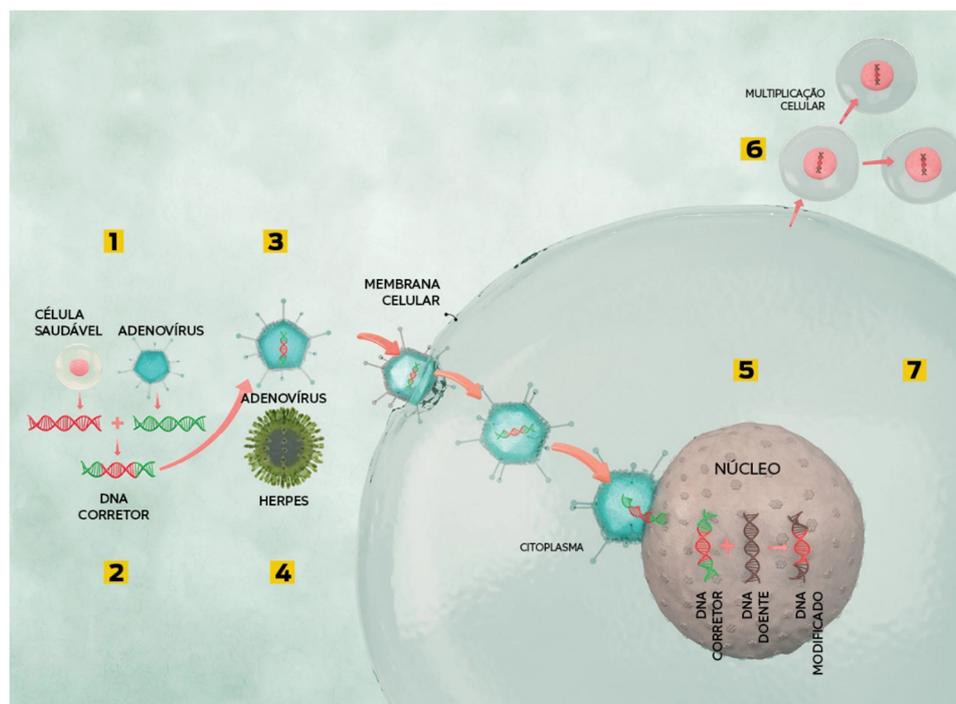


Figura 1: Exemplo de um processo de terapia genética. Primeiramente é inserido parte do DNA de uma célula saudável no vetor viral, e de seguida, este entra na célula alvo através da fusão com a membrana celular, deslocando-se até ao núcleo onde será transcrito o DNA saudável. Retirado de ¹⁵

Inicialmente, a terapia genética utilizou vetores virais de transgenes terapêuticos para tratamento de cancro e de doenças monogénicas.^{16,17} Embora os resultados iniciais tenham sido abaixo do ideal, a prova de conceito obtida levou vários ensaios

subsequentes de terapia genética a usar edição genética mediada por vírus. No entanto, isso originou alguns infortúnios importantes.¹⁸

Em 1999, Jesse Gelsinger, um jovem de 18 anos com uma forma leve de uma doença metabólica hereditária rara, “deficiência da ornitina transcarbamilase (OTC)”, que naquela altura estava controlada através de uma dieta restrita, participou num ensaio clínico onde lhe foi administrado um vetor viral, que neste caso era um adenovírus, contendo o gene codificador da enzima OTC normal. Infelizmente, Jesse faleceu 4 dias após o tratamento.¹⁹ O vetor viral desencadeou uma resposta imune muito mais forte em Jesse do que noutros pacientes, causando a falência em cadeia de múltiplos órgãos, que acabou por levar à sua morte.²⁰

As principais preocupações que envolvem a terapia genética viral consistem nos efeitos adversos desta técnica de tratamento, sendo as principais, a resposta imunitária ao vetor viral tornar-se tóxica, e a possibilidade do desenvolvimento de cancro.¹⁸ Outro entrave nesta terapia é o facto de não haver estudos suficientes que consigam relatar os efeitos a longo prazo que permitam entender as consequências em gerações futuras. E como em qualquer método de tratamento, a segurança é um dos fatores mais importantes a ter em conta.

Passados alguns anos após alguns casos indesejados, a terapia genética voltou aos ensaios clínicos com vírus modificados, concebidos para serem mais seguros. Com o objetivo de reduzir os efeitos secundários dos vetores virais, apareceram os vetores não virais como um método alternativo para entrega de genes, que têm imunogenicidade reduzida em comparação com os virais e, portanto, maior tolerância para administração repetida.^{18, 21} A preocupação principal no desenvolvimento destes métodos é a sua otimização de forma a atingir uma eficácia equivalente à da entrega de genes por vetores virais.²²

As abordagens clínicas atuais procuram modificar o gene anormal ao invés da inserção do gene normal. A técnica mais recente capaz de realizar a edição genómica, denomina-se de Repetições Palindrómicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas (CRISPR), que, em combinação com a proteína Cas9, uma nucleasa capaz de clivar o DNA, e com um RNA complementar à porção de DNA alvo, torna possível a alteração de apenas a porção de DNA desejada. Este sistema CRISPR-Cas9, pode ser entregue através de vetores de

adenovírus, ou com a ajuda de métodos físicos para permear a membrana celular, como por exemplo a eletroporação, e deste modo contornar o problema das possíveis reações imunitárias, para além das dificuldades existentes em ultrapassar as membranas celulares.^{23,24}

1.2 Membranas Biológicas

As membranas biológicas permitem a separação entre o interior e o exterior de um organismo, controlando as substâncias que entram e saem. Além disso, as membranas controlam a comunicação entre as células recebendo, enviando e processando informações na forma de sinais químicos e elétricos.²⁵

As membranas biológicas são constituídas por uma bicamada de moléculas lipídicas, mais conhecida como bicamada fosfolipídica. Além de vários tipos de lípidos que se encontram nas membranas biológicas, as proteínas e os açúcares da membrana também são membros importantes da estrutura.^{26,27} As proteínas da membrana desempenham um papel vital nas membranas biológicas, pois ajudam a manter a integridade estrutural, a organização e o fluxo de material através das membranas. Na ausência destas proteínas, a membrana fosfolipídica apresentaria uma barreira inerte e pouco permeável. As células seriam incapazes de comunicar umas com as outras, transportar nutrientes para dentro da célula ou libertar-se de algo não desejado, ou até, responder a estímulos externos.²⁵

Como se sabe as membranas biológicas são impermeáveis a macromoléculas, à maioria das moléculas polares e às moléculas com carga, no entanto são permeáveis a compostos apolares, isto devido à sua estrutura. Como o principal objetivo da terapia genética é fazer chegar o material genético à célula alvo, este tem de passar a membrana. Sendo o DNA uma macromolécula com carga negativa, por si só não conseguirá chegar ao seu destino, e para além da necessidade de proteção, é necessário desenvolver um transportador capaz de entregar o DNA.²⁸

O transporte através das membranas celulares é essencial para o equilíbrio e a regulação das substâncias dentro e fora da célula. Há diferentes mecanismos pelos quais as moléculas podem atravessar a membrana.²⁹

A difusão simples, é o movimento passivo de moléculas através da membrana, do local de maior concentração para o de menor concentração (a favor do gradiente de concentração), sem a necessidade de proteínas transportadoras. A difusão facilitada, é outro tipo de difusão passiva, mas ocorre com a ajuda de proteínas transportadoras. O transporte ativo, requer energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) para mover moléculas contra o gradiente de concentração, que é realizado por proteínas transportadoras específicas e permite que as células acumulem substâncias desejadas em concentrações mais altas.³⁰

A endocitose e exocitose são processos de transporte que envolvem a formação de vesículas. Na endocitose, a célula captura substâncias do meio externo através da invaginação da membrana, formando uma vesícula que é internalizada na célula. Na exocitose, vesículas contendo substâncias são libertadas para o meio externo através da fusão com a membrana celular.²⁹

O estudo das membranas biológicas é fundamental para a compreensão dos processos celulares e para o desenvolvimento de terapias e tratamentos em várias áreas, incluindo medicina, biologia celular e bioquímica.

1.3 Transfeção Genética

A transfeção é um processo pelo qual ácidos nucleicos são introduzidos numa célula eucariótica para modificar a composição genética da célula hospedeira.³¹ Nos últimos anos, a transfeção ganhou bastante importância devido à sua ampla aplicação para estudar processos celulares e mecanismos moleculares de certas doenças.^{32,33} A compreensão da via molecular da doença permite a descoberta de biomarcadores específicos que podem ser aplicados para diagnosticar doenças.³⁴ Além disto, a transfeção pode ser usada como uma estratégia de terapia genética para tratar doenças genéticas hereditárias incuráveis, doenças autoimunes e outros tipos de doenças como o cancro.³⁵ Hoje, o avanço da tecnologia, permite que diferentes tipos de ácidos nucleicos sejam transfetados para células de mamíferos, e estes incluem ácidos desoxirribonucleicos (DNAs), ácidos ribonucleicos (RNAs), bem como pequenos RNAs não codificantes.^{32,36}

A transfeção pode ser classificada em dois tipos: transfeção estável e transitória.³¹ A transfeção estável refere-se à expressão a longo prazo de um transgene integrando o DNA no genoma da célula hospedeira ou mantendo um vetor episomal (plasmidial) no núcleo como um elemento extra cromossómico. Assim sendo, o transgene pode então ser expresso aquando da replicação das células.³⁷

Por outro lado, a transfeção transitória não necessita da integração de ácidos nucleicos no genoma da célula hospedeira, onde os ácidos nucleicos podem ser transfetados na forma de um plasmídeo ou como oligonucleotidos.³² Portanto, a expressão do transgene poderá eventualmente ser perdida à medida que as células hospedeiras se irão replicando.³¹ A transfeção transitória é normalmente aplicada em experiências de curto prazo para investigar os efeitos do “*knock-in/down*” de um determinado gene. Já a transfeção estável é útil em estudos genéticos e farmacológicos com um longo prazo, nos quais é necessária uma vasta produção de proteínas.³⁸

Como referido anteriormente, é necessário um mecanismo para facilitar a transferência de ácidos nucleicos para as células. Existem vários métodos de transfeção capazes de realizar este processo, uns mais eficientes que outros, cada um com as suas particularidades e obviamente com diversas vantagens e desvantagens. Ainda não é possível determinar um que se possa concluir sendo o melhor, no entanto, a escolha do método a utilizar deve ter em conta a situação apresentada na altura do tratamento. Estes métodos diferenciam-se entre virais e não virais. Dentro dos métodos não virais, existem métodos físicos, como o uso de ondas de pressão, enquanto outros envolvem o uso de um veículo de entrega, que pode ser lipídico ou não lipídico, e desta forma melhorando o contacto entre o vetor e a membrana celular, facilitando assim a entrada do material genético nas células.^{32,39}

1.3.1 Transfeção Viral

Vírus são agentes infecciosos microscópicos formadas por sequências de DNA ou RNA envolvidos numa cápsula, que conseguem entrar com facilidade nas células hospedeiras por endocitose ou por fusão com a superfície celular, e desta forma introduzir o seu material genético viral.^{40,41}

A transfeção baseada em vírus, envolve o uso de um vetor viral (vírus), que apresenta proteínas de superfície próprias para facilitar o contacto e a comunicação com a célula alvo, para, assim, transportar uma sequência de ácido nucleico específica para dentro desta. Os vetores virais são adaptados para aplicações específicas, no entanto maioritariamente, devem partilhar entre si algumas propriedades, como a segurança. Os vetores virais são criados a partir de vírus patogénicos e, devem apresentar baixa toxicidade e elevada estabilidade e especificidade.^{21,42}

Os tipos de vetores virais mais comuns são os adenovírus, retrovírus, lentivírus, vírus do herpes e vírus adenoassociados (alguns destes exemplos estão presentes na figura 2). Os vírus adenoassociados provocam uma resposta inflamatória menor do que dos adenovírus.⁴³ Apesar disso, os adenovírus são dos mais utilizados em transfeção genética pois conseguem expressar eficazmente e a longo prazo o transgene em vários tipos de células.⁴⁴

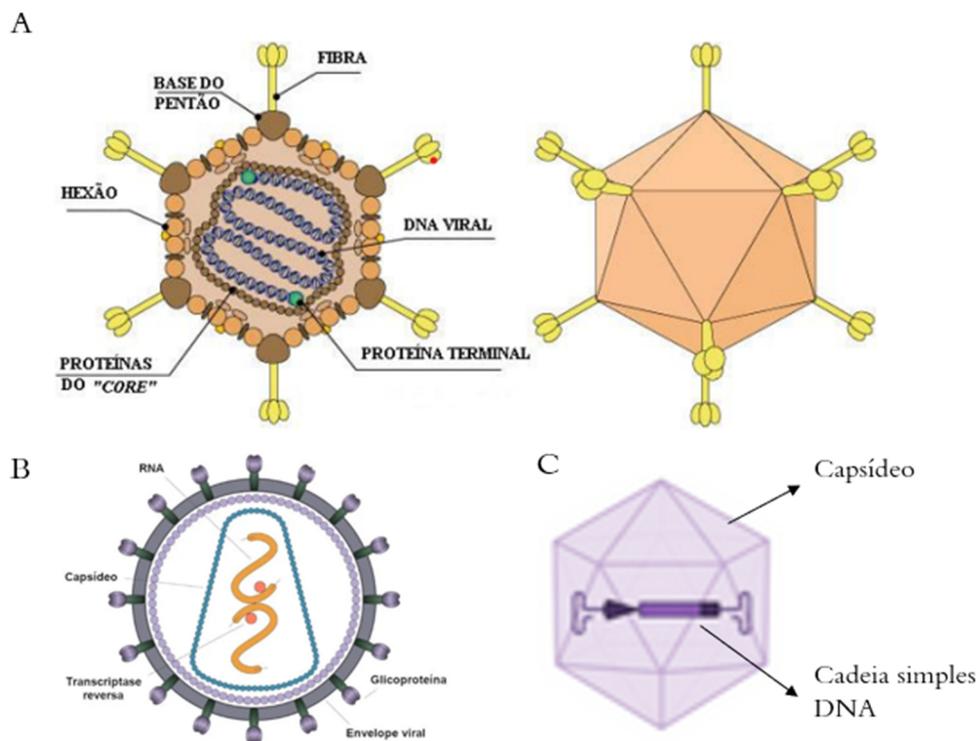


Figura 2: Demonstração de alguns tipos de vírus com as suas respetivas diferenças. A) Representação da estrutura de um adenovírus; B) Representação da estrutura de um retrovírus; C) Representação da estrutura de um vírus adenoassociado.

Adaptado de⁴⁵.

Os retrovírus, adenovírus, vírus adenoassociados e vírus do herpes são vetores virais frequentemente usados para transfeção estável, pois apresentam algumas limitações na transfeção transitória.^{21,46} Em comparação com a transfeção não viral, a transfeção viral é reconhecida como um método bastante eficaz para transfetar células difíceis de conseguir realizar este procedimento. Enquanto adenovírus e vírus do herpes podem ser usados para transfetar células que se encontram, ou não, em divisão, os retrovírus só podem ser usados para transfetar células em divisão. No entanto, a transfeção viral está associada a maior citotoxicidade e pode representar um risco de infecção viral.^{31,32}

Os materiais genéticos virais estão encapsulados no capsídeo viral, que ao entrar na célula hospedeira, irá libertar o material genético e este irá dirigir-se até ao núcleo da célula. Normalmente, os adenovírus carregam DNAs em dupla hélice, enquanto os retrovírus carregam RNAs, e estes apresentam uma enzima que facilita a integração de materiais genéticos no genoma da célula alvo. Os retrovírus que expressam o transgene de forma estável, apresentam menor probabilidade em desencadear uma inflamação do que os adenovírus, que geralmente produzem expressão transitória do transgene, mas desencadeiam uma inflamação na célula hospedeira. No entanto, o uso de retrovírus para transfeção está associado a um alto risco de mutação insercional e suspensão do gene. Enquanto os vírus que não induzem a transfeção estável do genoma têm um menor risco associado de desencadear mutações.^{21,31,32}

Em comparação com os adenovírus, os vírus adenoassociados, apresentam uma cadeia simples de DNA composta por três genes e duas repetições terminais invertidas (ITRs), o gene *Rep* (*Replication*) responsável pela replicação do genoma viral, o gene *Cap* (*Capsid*) que codifica as proteínas necessárias para a formação do capsídeo viral e desta forma proteger o genoma, e o gene *AAP* (*Assembly*) necessário para a junção das proteínas do capsídeo (demonstrado na figura 3).^{47,48} Ambos os vírus apresentam estrutura semelhante, no entanto os vírus adenoassociados são mais pequenos e provocam uma menor imunogenicidade e patogenicidade em humanos, o que os torna um vírus mais seguro para terapia genética. No entanto, o facto de apresentar uma pequena capacidade de empacotamento, limita as suas aplicações para fornecer genes terapêuticos de grandes dimensões, enquanto os adenovírus têm maiores capacidades de empacotamento e foram descritos como capazes de transfetar a maioria dos tipos de células. Dentro dos vários vírus usados para transfeção, os vírus do herpes são os que possuem a maior

capacidade de transporte, e além disso, é referido que o vírus do herpes tem forte associação a células neuronais e, portanto, o vírus do herpes tem grande potencial para ser utilizado no tratamento de doenças do sistema nervoso.^{21,44,49}

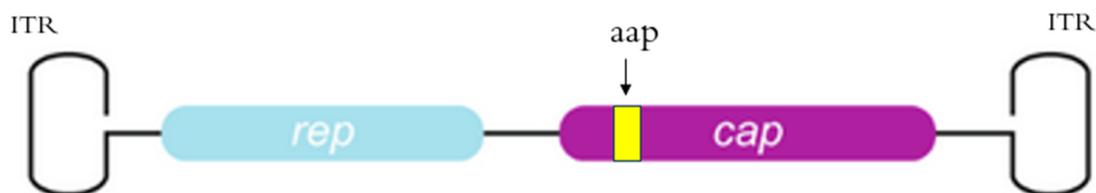


Figura 3: Representação esquemática de um vírus adenoassociado. Esquematização dos respectivos genes presentes na cadeia simples de DNA, característica deste tipo de vírus.

1.3.2 Transfeção Não-Viral

1.3.2.1 Transfeção física ou mecânica

A transfeção não viral pode ser repartida em métodos físicos/mecânicos e métodos químicos. Dentro dos métodos de transfeção físico/mecânica existe a eletroporação, sonoporação, magnetofeção, microinjeção de genes e irradiação a laser (optoporação), para além destes métodos, ultrassons, ondas de choque e ondas fotoacústicas têm sido usadas para aumentar a permeabilidade da membrana.⁵⁰

A eletroporação, representada esquematicamente na figura 4, é um método de transfeção física que consiste no uso de voltagem elétrica para aumentar temporariamente a permeabilidade da membrana celular, criando poros e permitindo a entrada do material genético. Este método é bastante utilizado para transfetar células difíceis de transfetar, como células-tronco e linfócitos B.⁵¹ No entanto, o uso de alta voltagem pode levar à morte celular por necrose e apoptose, ou provocar danos celulares permanentes.³²

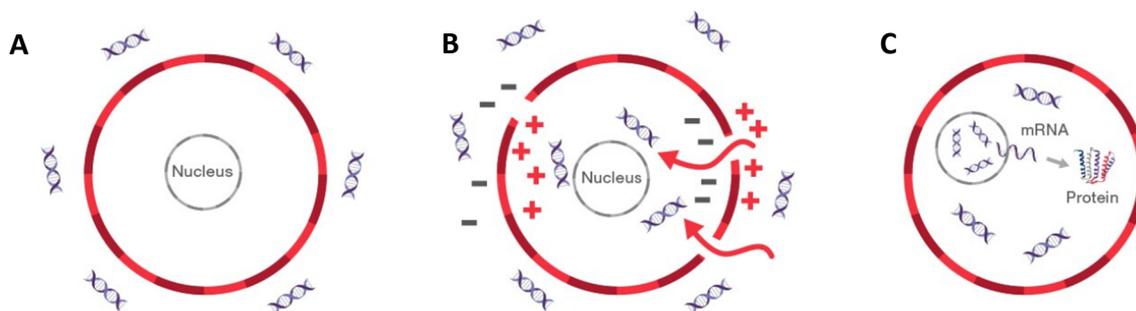


Figura 4: Representação esquemática de um processo de transfeção física, a eletroporação. A) Representação da célula antes da eletroporação; B) Representação da célula durante o processo de indução de campo magnético, formando poros para a entrada do DNA; C) Representação da célula após a eletroporação, onde a membrana recupera a sua integridade. Retirado de ⁵²

A optoporação é uma técnica que, usando a energia de um laser consegue aumentar a permeabilidade da membrana. Um exemplo dessa técnica foi realizado usando nanopartículas de ouro (AuNPs), pelo facto de estas apresentarem baixa citotoxicidade e imunogenicidade, foram sintetizadas camadas em forma de placa formadas por estas nanopartículas. O processo consistia na adesão destas placas à camada celular (neste caso foram usadas células HeLa, linha celular do cancro cervical), e posterior irradiação usando um laser de pulso contínuo CW 4 W 808 nm (Optronics, Rússia) com uma intensidade de 1 W/cm^2 . A energia do laser era absorvida pela camada de nanopartículas o que resultava no seu aquecimento e, desta forma, provocaria a formação de poros na membrana celular aumentando assim a permeabilidade da membrana. ⁵³

A sonoporação (transfeção usando ultrassons) recorre à técnica de cavitação de microbolhas, com o objetivo de criar canais na membrana celular para facilitar a transferência de material genético.^{31,32} Existem duas maneiras de produzir cavitação, a transitória e a estável, que ocorrem por processos diferentes. Quando as microbolhas são expostas a ultrassons de alta intensidade, elas crescem e de seguida colapsam, durante esta implosão, é libertada uma onda de choque, levando ao aumento da permeabilidade da membrana, daqui resulta a cavitação transitória. Já na cavitação estável, as microbolhas quando expostas a ultrassons de baixa intensidade, são forçadas a oscilar provocando a formação de poros. Outro tipo de transfeção que permite a passagem de macromoléculas através da deformação física da membrana, é a transfeção acústica que consiste no uso de pulsos acústicos, e apresenta vantagens sobre a sonoporação, usando

ultrassom de frequência alta, acima de 150 MHz, usando materiais piezoelétricos e pulsos de voltagem, podendo transfetar genes e proteínas diretamente no citoplasma através da geração de poros na membrana que se abrem e fecham rapidamente, o que permite a entrega intracelular controlada e local.⁵⁴

Contudo a eletroporação e a sonoporação apresentam riscos para a membrana celular, podendo danificá-la e levar à morte celular. Já a transfeção que recorre ao uso de íman, a magnetofecção, usa a força magnética para melhorar a transferência do material genético. Esta técnica consiste numa primeira fase de preparação de um complexo formado pelo ácido nucleico e por um reagente magnético, que sob o efeito do campo magnético externo, conseguem permear a membrana. Os reagentes magnéticos que apresentam maior eficácia, como $MnFe_2O_4$, são bastante tóxicos, o que impossibilita o uso destes em experiências in vivo.⁵⁰ Contudo, foi demonstrado que nanopartículas de óxido de ferro revestidas com quitosano, formando um reagente magnético, apresentaram uma eficácia de transfeção superior e não se observou toxicidade.⁵⁵ Apesar desta técnica parecer ser menos destrutiva para as células, em comparação com a eletroporação, apresenta um problema impeditivo para o seu uso na clínica, após a remoção do campo magnético, os reagentes magnéticos ficam aglomerados, o que se tornaria nocivo para um organismo.^{50,56}

A microinjeção de genes, recorre ao uso de uma agulha específica para perfurar a célula e, deste modo, injetar os ácidos nucleicos desejados na célula, mais concretamente no núcleo. No entanto, esta técnica requer tecnologia bastante avançada para poder realizar o procedimento com alta precisão evitando danos celulares e, portanto, apresenta um custo elevado, para além de que o procedimento é feito célula a célula, o que torna esta técnica pouco prática para evoluir para uma terapia.³²

Métodos acústicos são outro tipo de transfeção física com a vantagem de ser direcionável e compatível com aplicações repetidas. Além disso, como acontece noutros métodos físicos, estes evitam a endocitose e a retenção do material genético nos lisossomas, o que acontece em vários tipos transfeção química. Contudo, o uso de energia acústica isoladamente apresenta uma baixa eficácia de transfeção em comparação com os vetores virais e formulações químicas ideais.⁵⁷

1.3.2.2 Transfeção Química

A transfeção química (figura 5) pode ser caracterizada como sendo baseada em lipossomas ou não baseada em lipossomas. Exemplos de reagentes químicos de transfeção disponíveis comercialmente são por exemplo, a Lipofectamina, que tem como finalidade o transporte dos ácidos nucleicos até à célula alvo através de vesículas, os lipossomas.^{31 58}

A transfeção lipídica catiónica é um dos métodos mais utilizados, sendo bastante versátil, podendo obter alta eficácia. São, então, produtos químicos que permitem a formação de agregados lipídicos carregados positivamente que se podem fundir com a bicamada fosfolipídica da célula hospedeira permitindo a entrada do material genético por endocitose. Apesar de apresentar várias vantagens, como ser um processo de baixo custo e apresentar elevada eficácia de transfeção, apresenta maior toxicidade do que os vetores virais, o que torna impossível o uso em experiências *in vivo*. No entanto, pode ser usado *in vitro* para controlos positivos de transfeção *in vitro*.^{31 32}

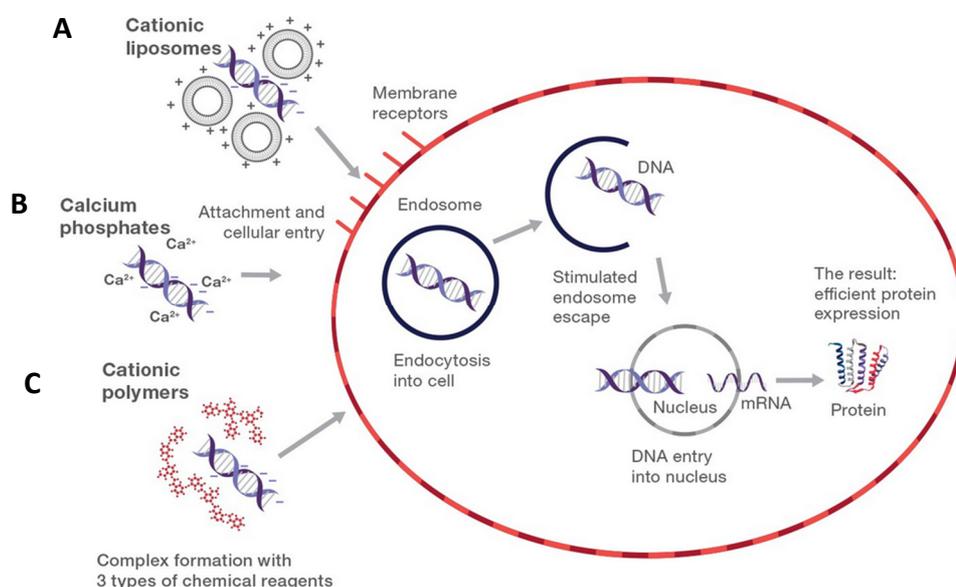


Figura 5: Representação de alguns processos de transfeção química. A) Formação do complexo DNA-lipossomas catiónicos, através de ligações eletrostáticas; B) Ligação dos íons de cálcio com o DNA; C) Formação do complexo DNA-polímeros catiónicos. Estas ligações permitem a ligação aos recetores presentes na membrana celular facilitando a entrada do DNA.

Retirado de ⁵²

Os reagentes de transfeção não lipossomais, podem ser divididos em várias classes, incluindo o uso de fosfato de cálcio, dendrímeros, polímeros e nanopartículas. O fosfato de cálcio é um produto químico facilmente adquirido, sendo dos mais baratos usados na transfeção, este método é baseado na ligação dos iões de cálcio carregados positivamente ao DNA carregado negativamente. Formado este complexo, os iões irão permitir a entrada do DNA na célula por endocitose. No entanto, a taxa de sucesso da transfeção por fosfato de cálcio é relativamente baixa e requer otimização prévia para alcançar alta eficácia.⁵⁹ Os dendrímeros, que são macromoléculas orgânicas tridimensionais altamente ramificadas, podem formar complexos com ácidos nucleicos superiores ao do fosfato de cálcio, sendo considerados como um reagente de transfeção não lipossomal alternativo, mas apresentam uma eficácia bastante reduzida.⁶⁰

A transfeção usando polímeros catiónicos forma também complexos com ácidos nucleicos, que ajudam na absorção do material genético pelas células por meio de endocitose. Um exemplo é o polímero polietilenoimina (PEI), considerado um dos polímeros com maior eficácia de transfeção. Esta técnica baseia-se na formação de poliplexos, onde os polímeros com carga positiva, através do estabelecimento de interações eletrostáticas, formam complexos nanométricos com os ácidos nucleicos, protegendo-os da degradação enzimática e favorecendo a sua captação celular.^{61,62}

Um dos métodos de transfeção química mais recentes, a transfeção com a molécula DEAE-dextran, que é um polímero catiónico carregado positivamente, baseia-se na formação de um complexo com o ácido nucleico, fundindo-se com a membrana celular permitindo a entrada na célula por choque osmótico. Contudo este método apresenta baixa eficácia e alguma toxicidade.^{31,61}

Recentemente, as nanopartículas foram propostas como uma opção alternativa na transfeção não lipossómica. Devido ao seu tamanho reduzido podem permear através da membrana usando recetores específicos, ou através da nucleolina que transporta a nanopartícula diretamente para o núcleo, contornando assim a degradação lipossomal, e desta forma aumentando a entrada de ácidos nucleicos na célula hospedeira.⁶³ Foi descrito que as nanopartículas, nomeadamente, nanopartículas inorgânicas, seja de metais, como o ouro, ou de sais de cálcio, causam pouca citotoxicidade nas células

transfetadas. No entanto são necessários mais estudos para avaliar pormenorizadamente a sua eficácia e segurança a longo prazo.^{14,32}

1.3.3 Combinação de Métodos de Transfecção “Viral” e “Não-Viral”

A combinação dos métodos de transfecção “viral” com “não-viral” é uma ideia bastante recente e não muito aprofundada, e é conhecida como uma abordagem híbrida. Basicamente consiste na combinação de polímeros lipídicos glicosilados, que representam os envelopes virais, com um polímero catiónico (como por exemplo o PEI). No entanto, este método é mais caro devido à necessidade de sintetizar artificialmente vetores semelhantes a vírus ligados a outros produtos químicos.⁶⁴

Nenhum método de transfecção pode ser aplicado a todos os tipos de células. Portanto, o método de transfecção ideal deve ser escolhido com base no tipo de célula e necessidades experimentais, pois há bastante variação no tamanho do material genético a ser transfetado e no tamanho da célula alvo. Em geral, o método de transfecção escolhido deve apresentar a maior eficácia possível, baixa toxicidade, efeitos reduzidos na fisiologia celular normal, ser de fácil manuseamento e ser reprodutível.

1.4 Ondas de pressão

Ondas de pressão resultam da vibração das partículas do meio no qual a onda se propaga com um padrão de alterações sucessivas na pressão, através de compressões (região de alta pressão) e rarefações (região de baixa pressão), ilustrado na figura 6.

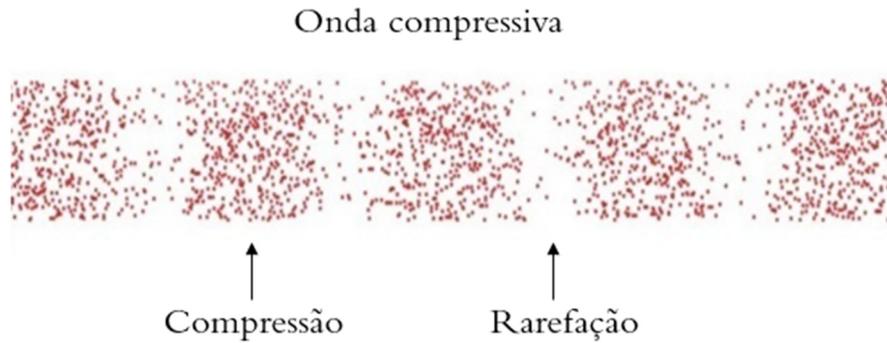


Figura 6: Imagem ilustrativa das variações de densidade que se propagam no material.

1.4.1 Ondas ultrassônicas

As ondas de ultrassom são ondas de pressão, em que a sua característica principal é a oscilação das partículas em torno da sua posição de equilíbrio. Estas ondas apresentam frequências acima do limite da audição humana, por volta dos 20 kHz. Uma onda é descrita por três parâmetros, a frequência (f), a velocidade (v) e o comprimento de onda (λ), que se encontram relacionados entre si ($v=f\lambda$), a velocidade nos tecidos é por volta de 1540 m/s.^{65,66} As ondas fotoacústicas são usadas com fins de diagnóstico e terapêutico. Como os tecidos humanos não são homogêneos relativamente à transmissão das ondas, a passagem destas pelo tecido leva à absorção, dispersão, reflexão e refração de energia. A absorção e a refração aumentam com a frequência, pelo que em diagnóstico são usadas frequências mais baixas pois estas são mais penetrantes, conseguindo chegar a tecidos mais profundos. Os ultrassons utilizados para fins terapêuticos têm como objetivo a interação com os tecidos do corpo de modo a modificá-los, como por exemplo, produzindo aquecimento de modo a diminuir a inflamação na zona irradiada. Podem também ser utilizados com a finalidade de aumentar entrega de fármacos através da membrana.^{67,68}

1.4.2 Ondas de choque

Ondas de choque são ondas de pressão produzidas por uma libertação repentina de muita energia, por exemplo, uma explosão. Elas são caracterizadas, principalmente por se propagarem a uma velocidade superior à velocidade do som nesse meio.⁶⁹ Na medicina, as ondas de choque são usadas há mais de 40 anos em litotripsia, nomeadamente para desintegrar pedras renais sem danificar tecidos. No início da década de 1980, foram realizados os primeiros estudos para avaliar o efeito do tratamento por ondas de choque (SWT) na consolidação óssea. Conseguiu-se assim obter resultados impressionantes numa melhor cicatrização de pseudartroses de ossos longos. Posteriormente, as indicações foram ampliadas para feridas de partes moles.^{70,71}

O que sabe sobre os efeitos das ondas de choque em cultura de células é que estas induzem o aumento da proliferação e aceleração da diferenciação celular, a alteração dos recetores da membrana celular e libertação de fatores de crescimento, bem como o aumento da migração celular.^{70,72}

Foi demonstrado que o uso de ondas de choque aumenta a permeabilidade da bicamada lipídica, permitindo a entrada de fármacos ou oligonucleotidos na célula.⁷³ Para além da alteração temporária da membrana lipídica, mostrou-se que as ondas de choque podem induzir o colapso de microbolhas por cavitação, o que é considerado um outro mecanismo de permeabilização da membrana.⁷⁴

Uma onda de choque é descrita pelo seu perfil de pressão, que pode ser caracterizado por duas características: a pressão de pico e a duração do pulso. Num estudo realizado por Kodama et al., comparando diferentes valores de pressão de ondas, propôs-se que uma onda de choque com um pico de pressão maior, mas com duração de pulso mais curto, provocava menor permeabilidade na membrana do que uma onda com menor pico de pressão, mas de maior duração. Neste estudo concluiu-se que era o impulso de pressão (que é definido como a integral da pressão ao longo de um intervalo de tempo), e não o pico de pressão da onda de choque, que facilita a permeação da membrana.^{69,75} Outro parâmetro que é bastante relevante para caracterizar as ondas, é o seu gradiente de pressão, que consiste na variação da pressão por unidade de tempo. Este parâmetro poderá ser relacionado com movimentos de compressão e descompressão membranares, e explicar o seu aumento de permeabilidade. No entanto, como não se conseguem

observar diretamente as interações, os mecanismos determinantes que causam a permeação da membrana permanecem de certa forma pouco claros.⁷⁶

1.4.3 Ondas fotoacústicas

O efeito fotoacústico foi relatado pela primeira vez em 1880 por Alexander Graham Bell, o cientista conhecido por inventar o telefone. Bell percebeu que ao iluminar uma membrana com um feixe de luz intermitente, era produzido um sinal acústico. Tendo descoberto este fenómeno, numerosos cientistas começaram a explorar este efeito que permite codificar o som em forma de luz modulada.⁷⁷

O efeito fotoacústico consiste no processo pelo qual são geradas ondas de pressão resultantes da incidência de luz sobre um material com propriedades específicas, como representado esquematicamente na figura 7. A incidência de luz sobre o material aumenta a temperatura local e, como resultado, há uma expansão termoelástica. As sucessivas expansões e compressões geram ondas de ultrassom (US). Este fenómeno tem sido bastante utilizado com dois propósitos principais: construir um transmissor e um recetor de US altamente miniaturizados⁷⁸, e realizar imagens fotoacústicas (PAT). A primeira aplicação é bastante promissora para a imagiologia médica, que apresenta múltiplas vantagens, podendo ser usada como método de diagnóstico bem como ser usada em intervenções clínicas.⁷⁹

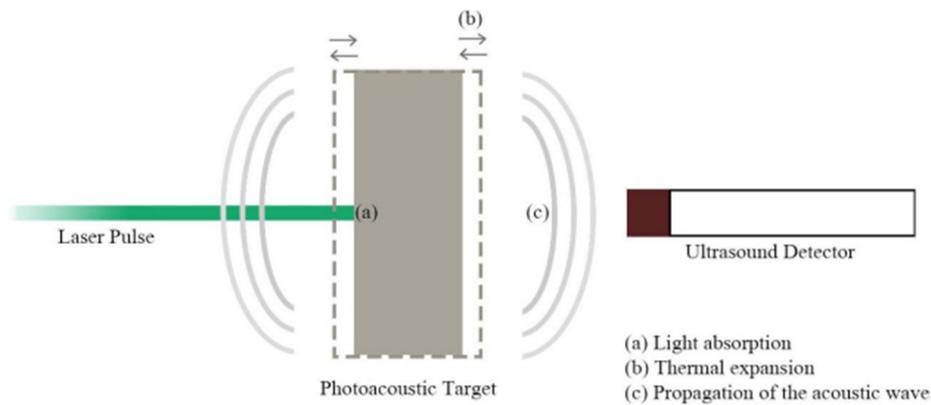


Figura 7: Representação do efeito fotoacústico. Após irradiação do material, a energia é absorvida, resultando na sua expansão termoelástica, gerando assim a onda acústica.
Retirado de⁷⁹

Com os recentes avanços na fotónica e na ótica, a imagem ótica desempenha um papel cada vez mais importante na clínica. Uma restrição comum às várias técnicas de imagem ótica é a difusão da luz, que limita a resolução de imagens de estruturas em tecidos profundos. Nos últimos anos, a tomografia fotoacústica (PAT) apareceu como uma técnica promissora que resolve parte dessa limitação.^{80,81} A PAT tem como princípio de funcionamento o efeito fotoacústico. As ondas acústicas sofrem menor difusão do que a luz no tecido, pelo que, a PAT pode gerar imagens de alta resolução, combinando o contraste das técnicas óticas com a profundidade de penetração e a resolução espacial das técnicas acústicas. Nesta técnica o sinal obtém-se através da absorção ótica, e pode ser descrito em três etapas: um agente absorve a luz, a energia ótica absorvida é convertida em calor e gera um aumento de temperatura e ocorre a expansão termoelástica, resultando na emissão de ondas acústicas. Esta técnica, servindo de diagnóstico, e aproveitando contrastes endógenos moleculares como a oxi e a desoxi-hemoglobina, consegue obter imagens de cavidades vasculares, perceber a saturação de oxigénio da hemoglobina (sO_2) e obter a velocidade do fluxo do sangue. Para além dos contrastes endógenos, a PAT, consegue obter imagens com o uso de agentes de contraste exógenos, como corantes orgânicos e nanopartículas.⁸² Esta técnica de imagem médica tem muito potencial, pelo facto de conseguir atingir tecidos mais profundos, obtendo melhor resolução. O laser utilizado apresenta um feixe de luz não ionizante, com comprimentos de onda entre 690 nm e 950 nm, e é uma técnica mais rápida e mais barata que, por exemplo, a ressonância magnética.⁷⁷

Nos últimos anos, o uso de lasers pulsados tem vindo a despertar grande interesse na área da conversão fotoacústica, dado que, usando materiais que eficientemente transformam luz em pressão, conseguem gerar ondas com picos de pressão elevados e grandes larguras de banda de frequências usando pulsos de laser com fluências a baixo de 100 mJ cm^{-2} . A combinação de altas frequências com pressões elevadas, possibilita a interação mecânica com estruturas biológicas, como células, que é a base para a permeabilização física das barreiras biológicas. Esta permeabilização encontra aplicações na entrega de fármacos e na realização de transfeção genética com maior segurança.⁸³

Um material piezofotónico é formado por um material capaz de absorver a energia proveniente de um laser, conseguir transformar essa energia em calor e ter uma expansão termoelástica elevada de modo a formar uma onda fotoacústica, ou seja, são materiais com elevada conversão luz-pressão.⁸ Normalmente, estes materiais são finos e devem absorver uma grande quantidade da luz incidente pois a espessura do material (h) é inversamente proporcional ao pico de pressão (p_0) e é proporcional à energia absorvida (ΔH_{th}) obtido pela expansão termoelástica, como visível na equação 1.^{83,84}

$$p_0 = \frac{\Gamma}{h} \Delta H_{th} \quad (1)$$

Um material piezofotónico, necessário para a produção destas ondas, deve consistir de um cromóforo com coeficiente de absorção elevado no comprimento de onda do laser, embutido num material com um grande coeficiente de expansão térmica, β (ou seja, um grande parâmetro Grüneisen:

$$\Gamma = c_s^2 \beta / C_p \quad (2)$$

onde c_s é a velocidade do som e C_p é o calor específico a pressão constante.⁸⁵

A geração de ondas de pressão através da expansão termoelástica aumenta quando o material que absorve a energia se encontra confinado por um material rígido.⁵³ Devido ao confinamento as ondas fotoacústicas tornam-se maioritariamente compressivas (Figura 8).

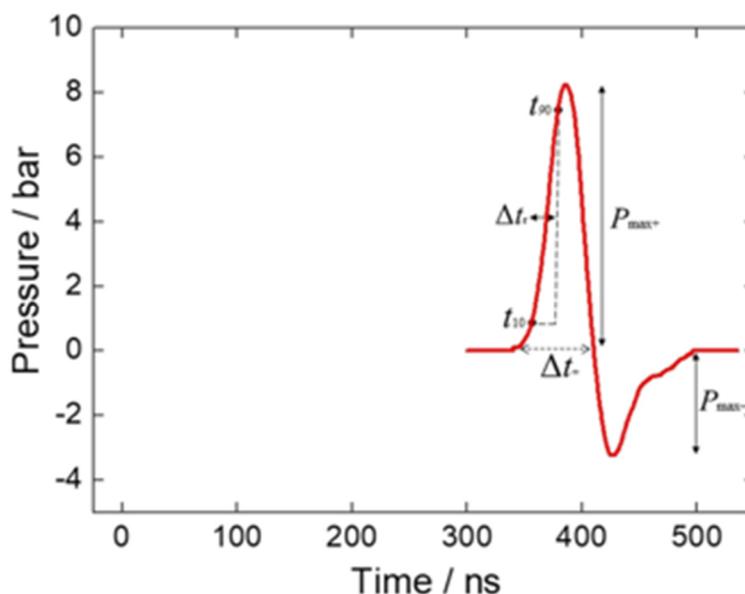


Figura 8: Representação de uma onda de pressão em função do espaço. Na figura observa-se a zona de compressão, que representa os valores mais altos de pressão, e a zona de rarefação, representativa dos valores mais baixos de pressão. Adaptado da referência ⁸

A geração destas ondas (representada na figura 9), baseia-se numa sequência de três processos muito rápidos. Imediatamente após a absorção da luz pulsada por um material piezofotônico, é alterada a distribuição eletrónica do cromóforo, passando do estado fundamental para o estado excitado (figura 10), e de seguida retorna ao estado fundamental, por processos ultrarrápidos não-radiativos, o que resulta numa rápida transferência de calor do cromóforo para o material confinado pelo cromóforo. Como consequência desta rápida libertação de calor, irá ocorrer uma expansão termoelástica do material para o qual ocorreu a transferência de calor, e por sua vez, gera-se uma onda fotoacústica.⁸³

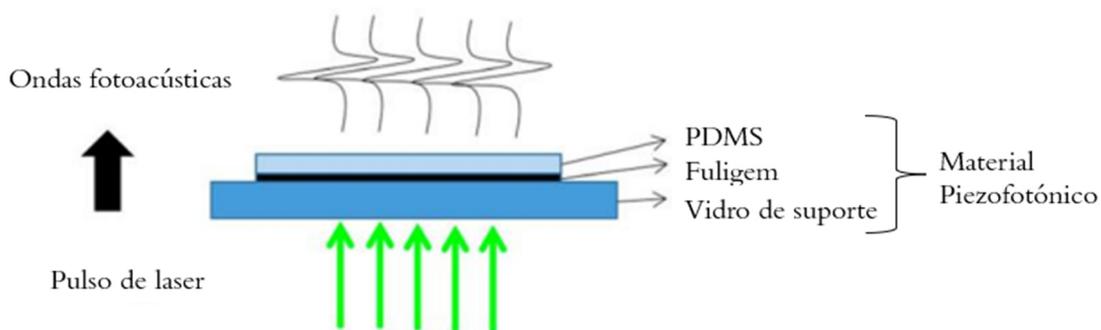


Figura 9: Representação esquemática da geração de ondas fotoacústicas, usando um material piezofotônico. Adaptado da referência ⁷⁹

Para que a conversão luz-pressão ocorra, usando luz pulsada, têm de ser cumpridas duas condições. Uma condição é o confinamento térmico, que implica o armazenamento total de calor no volume irradiado antes deste se difundir (tempo de difusão térmica, τ_{th}), maximizando a temperatura no local irradiado. A outra condição necessária, é a condição de confinamento de tensão, que requer que o aquecimento do material seja mais rápido que o seu tempo de expansão térmica (tempo de relaxamento, τ_s), ou seja o aquecimento ocorre praticamente sem aumento de volume, levando à acumulação de alta pressão termoelástica.^{83,86} Quando $\tau_L < \tau_{th}$ and $\tau_L < \tau_s$, está se perante um regime de pulso curto, onde τ_L é a duração do pulso, estas condições são expressas por duas equações:^{83,87}

$$\tau_s = \frac{1}{\mu_a \times c_s} \quad (3)$$

$$\tau_{th} = \frac{1}{\mu_a^2 \times \alpha_{th}} \quad (4)$$

Onde μ_a é o coeficiente de absorção linear, c_s é a velocidade do som no material (ms^{-1}) e α_{th} é a difusão térmica ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

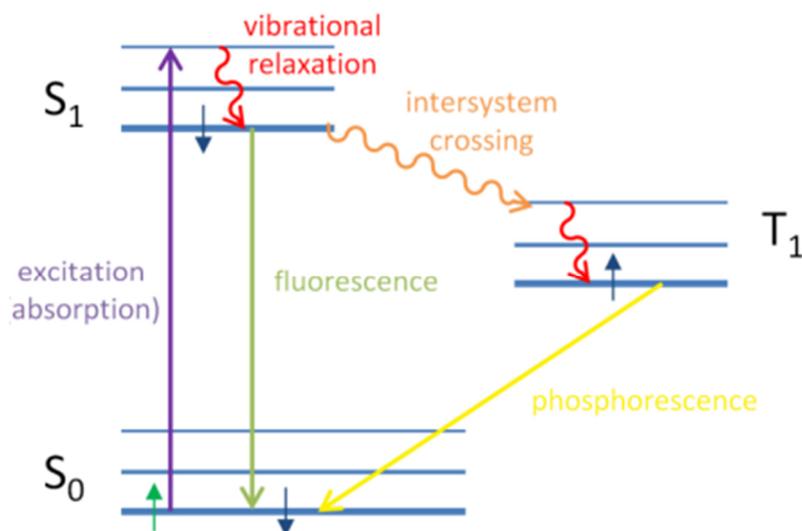


Figura 10: Diagrama de Jablonski. Representação dos vários eventos que podem ocorrer após a excitação do elétron. Retirado da referência ⁸⁸

A amplitude da pressão máxima de uma onda fotoacústica (p_0) depende da fluência do laser (E_L):

$$p_0 = \Gamma \times \mu_a \times E_L \times \eta_{th} \quad (5)$$

onde Γ é o parâmetro de Grüneisen, η_{th} é a fração de luz absorvida que é convertida em calor e μ_a é o coeficiente de absorção linear e $(\mu_a)^{-1}$ corresponde à espessura da região de absorção. As transições não radiativas muito rápidas do cromóforo garantem que o valor de η_{th} é muito próximo de 1 durante o pulso de laser, e quanto menor for a espessura do material maior será a pressão (p_0). A pressão absoluta da onda gerada é proporcional à energia absorvida e inversamente proporcional à espessura da região de absorção, representada como $(\mu_a)^{-1}$, ou seja, são necessários filmes finos com elevada absorção da energia.⁸³

As ondas de choque e as ondas fotoacústicas são ondas de pressão, mas diferem na maneira como são geradas. As ondas fotoacústicas são produzidas, como referido acima, através da absorção de luz de laser pulsado provocando apenas a expansão termoelástica de um material. Neste caso, a energia usada é inferior ao limite de ablação do material. Já as ondas de choque são produzidas quando existe a ablação de um material específico quando exposto a grandes energias, como por exemplo um laser focado, ou seja, a onda de choque requer a destruição do material para ser produzida. Isto é uma desvantagem relativamente às ondas fotoacústicas, que podem ser geradas por um número indefinido de vezes com vários pulsos de laser, sem destruição do material.⁸⁹ Considerando que no mecanismo de permeação da membrana celular são as sucessivas distensões e compressões que provocam a alteração da permeabilidade da membrana, permitindo a abertura de poros, há uma clara vantagem em utilizar ondas fotoacústicas para aumentar a permeabilidade da membrana celular.⁹⁰

1.5 Material Piezofotónico

O principal objetivo dos materiais fotoacústicos é conseguir gerar ondas fotoacústicas com pressões suficientemente altas para conseguir provocar a destabilização membranar e aumentar a permeabilidade das membranas biológicas durante um curto período de tempo, sem exceder limites que podem levar à rutura total da membrana e levar à morte celular. Para além da contribuição da pressão, tem de se ter em conta a largura de banda de frequências obtidas. A razão pela qual são necessárias frequências mais elevadas deve-se às forças mecânicas associadas às variações de pressão, compressiva (pico de pressão) e tênsil (pressão baixa), se exercerem à escala celular. Por exemplo, considerando a velocidade do som nos tecidos (1540 m/s) e a relação entre frequência, velocidade e comprimento de onda, uma onda com 100 MHz tem um comprimento de onda de 15 μm .

Nos últimos anos, têm-se estudado vários materiais capazes de gerar ondas fotoacústicas, com o objetivo de melhorar a eficiência da conversão da energia da luz em pressão, usando nomeadamente nanofibras de carbono (CF)⁹¹, nanotubos de carbono (CNTs)⁹², nanopartículas de fuligem de carbono (CSNP)⁹³ e nanopartículas de ouro⁹⁴. Nestes materiais, a camada do nanomaterial é tipicamente envolvida com polidimetilsiloxano (PDMS), que é o material responsável pela expansão térmica. O PDMS é bastante utilizado nestes materiais devido ao seu elevado coeficiente de expansão térmica. Um material mais recente, que mostrou ser promissor na criação de uma onda com uma boa relação entre a pressão e a largura de banda de frequências, foram nanoflocos de grafeno combinados com PDMS.⁹⁵

Nanopartículas de ouro demonstraram um grande coeficiente de absorção como também se mostraram adequadas para aplicações biomédicas, o que levou a várias experiências a serem desenvolvidas usando a combinação destas nanopartículas com PDMS. Deste modo obtêm-se filmes melhores que os filmes metálicos finos.^{79,96} Contudo, até agora, os filmes de carbono apresentam melhor desempenho que os filmes de metais finos e as nanopartículas de ouro.^{91,97}

1.6 As ondas fotoacústicas na permeabilização de membranas biológicas

Nos últimos anos, o nosso laboratório tem explorado o uso de ondas fotoacústicas para a permeabilização da pele⁸⁶ e de vesículas unilamelares gigantes (GUVs)⁸⁵, bem como na transfeção genética⁸. A geração destas ondas foi mediada pelo uso de vários tipos de laser e vários materiais piezofotónicos.

As ondas fotoacústicas mostram permeabilizar o estrato córneo, camada mais externa da pele, a grandes moléculas e proteínas. Com apenas dois minutos de exposição a estas ondas usando um laser com uma frequência de pulso de 20 Hz, a perda de água trans epidérmica (TEWL) da pele humana saudável aumenta por um fator de 2.5. Este resultado levou à conclusão de que estas ondas conseguem aumentar a permeabilidade da pele para a entrada de fármacos, sendo posteriormente testada, usando uma bacteroclorina - redaporfina (massa molar de 1135 g/mol), que por si só não poderia passar a membrana da pele, mas com uma exposição de ondas durante 25s conseguiu permear 35 μm .⁸⁶

Os GUVs são formados por uma bicamada fosfolipídica fina, simulando a bicamada fosfolipídica de uma membrana celular, sendo úteis como veículos de transporte de fármacos e modelos de bicamada lipídica. Um trabalho do nosso laboratório em colaboração com um laboratório do MIT demonstrou que as ondas fotoacústicas, geradas usando filmes de CNT embebidos em PDMS, conseguem promover a saída de 25% de FITC-dextran dos GUVs sem a alteração do seu tamanho nem sua destruição.⁸⁵

O mesmo processo de geração de ondas fotoacústicas, mas usando outro tipo de filmes, cloreto de manganésio (III) 5, 10, 15, 20- tetrafenilporfirinato (MnTPP) combinado com polistireno (PS) - permitiu obter um resultado promissor na área da transfeção genética. As ondas não apresentaram citotoxicidade celular e com uma exposição de 10 min conseguiu-se transfetar 5% de um plasmídeo codificante da proteína verde fluorescente (GFP) numa linha celular de fibroblasto de macaco COS-7. Neste trabalho foram utilizados dois lasers, um de nanossegundos e outro de picossegundos, ambos serviram para a geração de ondas fotoacústicas, no entanto, demonstrou-se que o pulso de laser a 532 nm do laser de picossegundos foi capaz de gerar ondas 5x mais intensas

que as geradas pelo laser de nanossegundos, devido à maior densidade de potencia ótica do laser de picossegundos, o que contribuiu para uma pressão absoluta maior da onda. ⁸

Este trabalho procura contribuir para o melhor entendimento do procedimento de transfeção, e aumentar a sua eficácia, usando outro tipo de filmes - fuligem com PDMS - e usando outro comprimento de onda - 1064 nm.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Métodos

1.7 Reagentes

Para a cultura celular de COS-7, o meio de cultura utilizado foi o Dubbelco's Modified Eagle's Medium (DMEM, fornecido pela Sigma-Aldrich) e as células foram mantidas numa atmosfera humidificada a 37°C com 5% de CO₂. O DMEM é formado por vermelho de fenol, glucose e L-glutamina numa concentração de 4500 mg/L, e foi adicionado tampão de ácido de 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES, fornecido pela Sigma-Aldrich) com uma concentração de 10 mM, bicarbonato de sódio numa concentração de 10 mM (fornecido pela Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal de bovino (FBS, fornecido pela Biowest) e 1% de penicilina-estreptomicina (PenStrep, fornecido pela Sigma Aldrich). A água Milli-Q usada para a preparar as soluções foi desionizada utilizando um sistema Millipore MilliQ de purificação de água. Para preparar a solução de tampão fosfato-salino (PBS) utilizou-se fosfato de sódio dibásico (0,43 mM), fosfato de potássio dibásico (0,14 mM), cloreto de sódio (13,7 mM) e cloreto de potássio (0,27 mM) (fornecidos pela Sigma-Aldrich) acertando-se de seguida o pH nos 7,4.

A resazurina foi obtida na Sigma Aldrich e foi preparada uma solução stock em PBS, com uma concentração de 0,1 mg/ml. A partir desta solução stock prepararam-se soluções para aplicar nas células, com uma diluição de 1:10, em conjunto com meio de cultura.

O plasmídeo que codifica a Proteína Verde Fluorescente (GFP), gWizGFP, fornecido pela Aldevron, com uma concentração de 5 mg/mL. As soluções preparadas para a adição às células, consistiam de DMEM sem soro fetal nem antibiótico.

1.8 Equipamento

Todos os procedimentos relacionados com culturas celulares, preparação do meio de cultura, da solução de PBS e solução de tripsina para aplicar nas células foram executados na câmara de fluxo laminar Thermo Scientific MSCAdvantage. As pesagens foram realizadas à temperatura ambiente numa balança analítica Kern ALJ 220-5DNM, previamente calibrada. Os frascos de cultura, tubos de centrifuga cónicos, placas de 12-poços, micropipetas utilizadas foram adquiridas à Orange Scientific. As pipetas de Pasteur de vidro e as pontas para os micropipetas foram adquiridas à Frilabo. O autoclave utilizado para esterilizar todo o material necessário para as culturas celulares é da marca AJC Uniclave 88. O microscópio utilizado para a observação das células foi um microscópio invertido Olympus CKX41 acoplado a uma lâmpada de fluorescência. Os lasers utilizados para a realização das experiências foram o laser M-NANO da montfort (8 ns de pulso), e o laser EKSPLA PL 2143 A (30 ps de pulso). O leitor de microplacas, utilizado para o ensaio da resazurina, é um Synergy HT™ da BioTek, EUA, com um conjunto de filtros para uma excitação a 560 nm e emissão a 590 nm.

1.9 Filmes Piezofotónicos

Os filmes de nanopartículas de carbono, mais concretamente de fuligem, utilizados para transformar luz em ondas de pressão, foram disponibilizados pela LaserLeap Technologies, S.A. (Coimbra, Portugal), empresa responsável pela sua produção. Neste momento não é possível divulgar o método de fabrico destes materiais. A espessura dos filmes foi medida com um micrómetro digital e as absorvâncias medidas com um espectrofotómetro Jasco V-630. Os outros filmes de carbono (grafeno) foram utilizados e testados através de uma colaboração, o que também impossibilita a divulgação do método de produção. Os filmes de MnTPP foram testados noutra trabalho realizado neste grupo de investigação, e desta forma, os resultados utilizados na sua caracterização foram utilizados para possíveis comparações.

1.10 Cultura Celular

Para a realização das experiências, a linha celular utilizada foi a COS-7 (células imortalizadas em monocamada de fibroblasto de macaco). A cultura celular foi mantida em DMEM, suplementado com 10% de FBS e 1% de PenStrep. As células permaneceram em frascos T75 estéreis com uma tampa com filtro, adquiridos na Thermo Scientific. A incubadora BB15 manteve-se à temperatura de 37°C, num ambiente humidificado, contendo 5% de CO₂. A cultura foi mantida durante 5 dias e, após este período, verificando-se uma confluência de cerca de 80% a 90%, procedia-se à passagem das células onde estas são lavadas com PBS e posteriormente destacadas com tripsina, descartando-se uma porção para permitir o crescimento de novas células.

1.11 Espectro de Absorção

Com o objetivo de obter o valor da absorvância do material piezofotónico utilizado neste trabalho, procedeu-se à realização do seu espectro de absorção, representado na figura 11. Como visível no gráfico abaixo, o valor da absorvância é 7, mantendo-se inalterado nos diferentes comprimentos de onda medidos. Este valor não é superior pois o espectrofotómetro não consegue ler absorvâncias mais altas, no entanto a principal razão, é que o filme absorve praticamente na totalidade (>99,99999%) a luz sobre ele irradiada, cumprindo assim uma das características necessárias de um material piezofotónico.

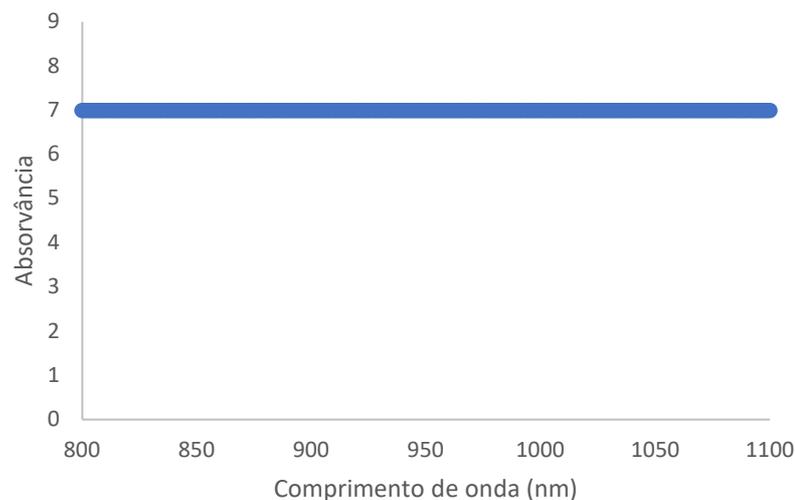


Figura 11: Espectro de absorção do filme de fuligem.

1.12 Caracterização das ondas Fotoacústicas

Neste trabalho foram utilizados dois lasers, um laser de nanossegundos (M-NANO, 8 ns de pulso, foram usadas frequências de repetição de 6 Hz, 10 Hz e 20 Hz) e um laser de picossegundos (EKSPLA PL 2143 A, 30 ps de pulso, 10 Hz) para gerar ondas fotoacústicas. As ondas foram registadas com um osciloscópio digital (DPO7254 Tektronix, que apresenta uma largura de banda de 2,5 GHz). Neste trabalho foram avaliados três filmes piezofotónicos diferentes, filmes de fuligem combinados com PDMS, filmes de cloreto de manganésio (III) 5, 10, 15, 20- tetrafenilporfirinato (MnTPP) combinado com polistireno (PS) e filmes de carbono.

Os filmes de MnTPP incorporados em polistireno foram avaliados a um comprimento de onda de 532 nm expostos ao laser de picossegundos com uma fluência de 100 mJ cm^{-2} . Neste caso o material foi confinado entre um vidro de quartzo e um espelho dielétrico ambos com 1 cm de espessura, com a finalidade de otimizar a geração das ondas. (Figura 12) Usando um transdutor de 225 MHz colocado em contacto, através de silicone, com o material e com uma posterior análise e obtenção da Transformada de Fourier, obtiveram-se os respetivos valores das frequências das ondas de pressão. A obtenção das pressões absolutas das ondas foi possível com o uso de um hidrofone de 20 MHz, com uma posterior calibração tendo em conta a sensibilidade do hidrofone.⁸ Os resultados da caracterização das ondas fotoacústicas geradas pelo filme MnTPP foram obtidos de uma experiência anteriormente realizada no grupo.

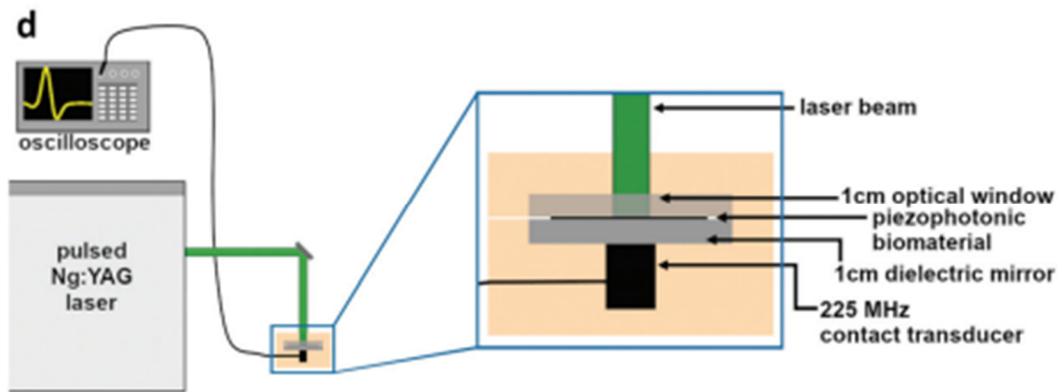


Figura 12: Imagem ilustrativa da montagem experimental usada para medir a pressão absoluta das ondas geradas pelos filmes de MnTPP. Retirado da referência ⁸³

Os filmes de fuligem combinados com PDMS, foram avaliados em ambos os lasers, no de nanossegundos foi utilizada uma fluência de 60 mJ cm^{-2} , já no laser de picossegundos utilizaram-se duas fluências, 60 mJ cm^{-2} e 100 mJ cm^{-2} . Com a finalidade de obter as frequências relativas, usou-se um transdutor de 225 MHz conforme ilustrado na figura 13, e posteriormente procedeu-se à obtenção da Transformada de Fourier (FFT).

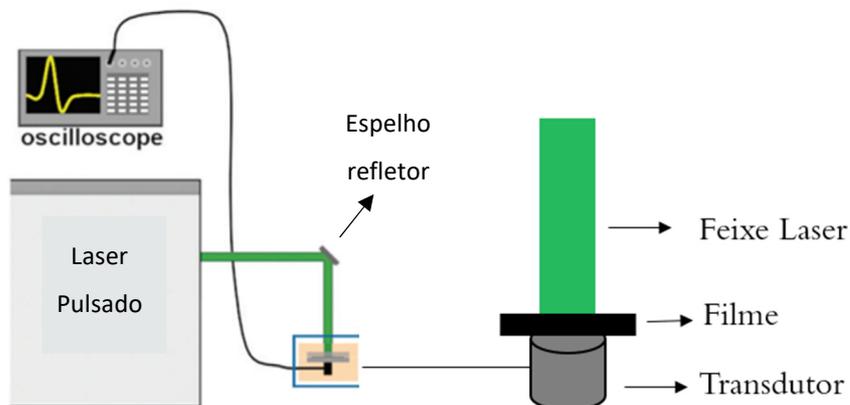


Figura 13: Imagem ilustrativa da montagem experimental para medir a largura de banda das ondas geradas pelos filmes de fuligem. Adaptado da referência ⁸³

Para calcular as pressões absolutas das ondas geradas, usou-se um Hidrofone de 30 MHz, mergulhado em água a cerca de 1 cm do material piezofotônico, onde este, era irradiado por baixo. Antes de chegar ao material piezofotônico, o feixe de laser passava

por um espelho, que reflete >99% da luz, e pelo plástico do recipiente com a água, e posteriormente irradiava o material. (figura 14) Os filmes de carbono foram avaliados nas mesmas condições que os filmes de fuligem.

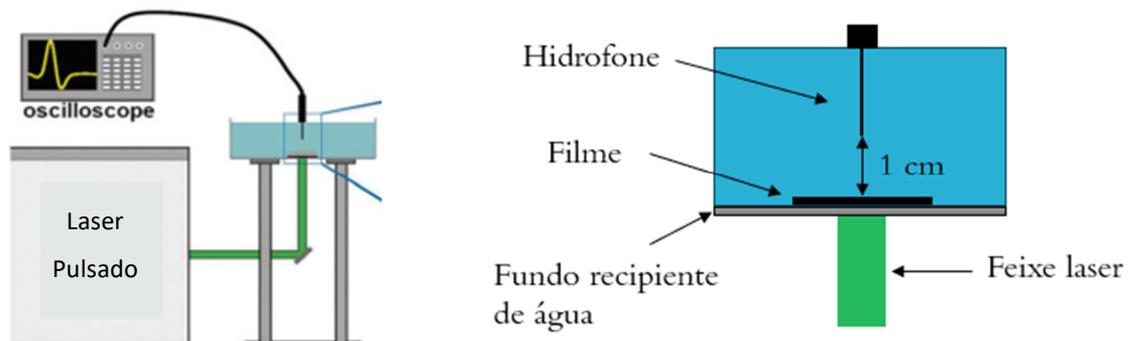


Figura 14: Imagem ilustrativa da montagem experimental para medir a pressão absoluta das ondas geradas pelos filmes de fuligem. Adaptado da referência ⁸³

1.13 Viabilidade Celular

A viabilidade celular da linha celular COS-7, foi avaliada *in vitro* após exposição das células a ondas fotoacústicas produzidas pelo material piezofotônico de fuligem com PDMS quando irradiado com laser pulsado de nanossegundos e de picossegundos. Foram estimadas viabilidades celulares após 5 min e 10 min de exposição. No laser de nanossegundos manteve-se a fluência igual a 60 mJ cm^{-2} , e alterou-se a frequência do laser entre 6 Hz e 20 Hz, já no laser de picossegundos procedeu-se a alterações na fluência do laser entre 60 mJ cm^{-2} e 100 mJ cm^{-2} , mantendo a frequência de 10 Hz. A montagem utilizada para a realização destas experiências encontra-se ilustrada na figura 15.

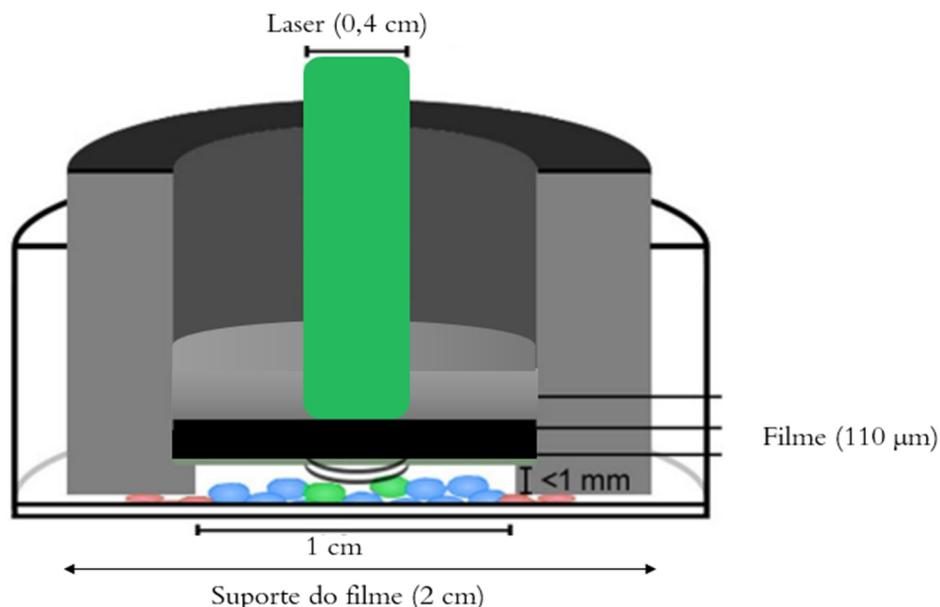


Figura 15: Imagem ilustrativa da montagem utilizada para as experiências de viabilidade celular e de transfeção com o laser de picossegundos. A diferença para o laser de nanossegundos é o diâmetro do feixe de laser (0,8 cm).

Este protocolo de viabilidade tem uma duração de 4 dias. As células são inicialmente plaqueadas com uma densidade celular de 30k e 40k em 1 mL de DMEM em placas de 12 poços, no dia seguinte o meio é trocado, no 3º dia procede-se à aplicação das ondas fotoacústicas, e no 4º dia 500 µL de meio de cultura contendo 10% de resazurina é adicionado às células. (Figura 16)

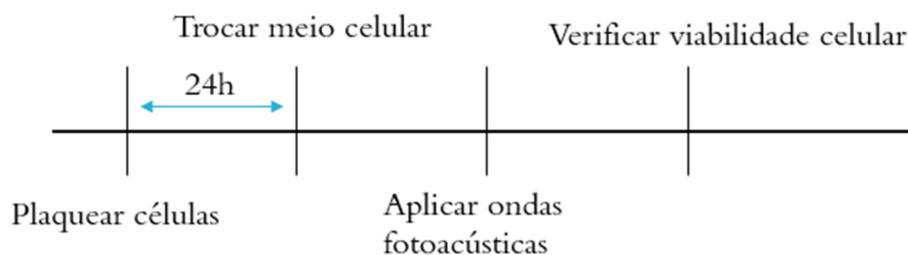


Figura 16: Esquema ilustrativo do protocolo utilizado para cálculo da viabilidade celular.

A resazurina é um corante não-fluorescente. No entanto, quando é reduzido pelas células metabolicamente ativas, ou seja, viáveis, dá origem à resorufina que é um

composto altamente fluorescente. Para obter a percentagem de viabilidade celular, a fluorescência do segundo composto é analisada por um leitor automático de microplacas (Synergy HT™ da BioTek).

1.14 Transfeção *in vitro*

Monocamadas da linha celular de fibroblastos de macaco COS-7 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina, numa incubadora com uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂ a 37°C. As soluções para a transfeção do DNA plasmidial que codifica a Proteína Verde Fluorescente (GFP) gWizGFP, foram preparadas em meio de crescimento (DMEM), sem soro ou antibióticos. Primeiramente, as células COS-7 foram semeadas em placas de 12 poços a uma densidade de 40.000 células/poço em 1 mL de meio de cultura. No dia seguinte o meio foi removido e adicionado novo. Após 24h o meio de cultura foi removido e 500 µL de solução de plasmídeo em meio de cultura foi adicionado sem soro e sem antibióticos. Em seguida, o material piezofotónico foi imerso no meio de cultura e aproximado da monocamada celular, sem entrar em contacto com as células. As células foram expostas às ondas fotoacústicas durante 10 min. Foram testadas concentrações de plasmídeo de 250 µg/mL e 500 µg/mL. Foram usados dois lasers, um laser de nanossegundos com a fluência de 60 mJ cm⁻², usando duas frequências de disparo de 10 Hz e 20 Hz, e um laser picossegundos com uma fluência de 100 mJ cm⁻², com uma frequência de repetição de 10 Hz. O processo de exposição das células às ondas foi efetuado fora da câmara de fluxo. Os controlos realizados foram mantidos nas mesmas condições das experiências efetuadas. A montagem utilizada para a realização destas experiências encontra-se ilustrada na figura 15.

1.15 Microscopia de Fluorescência

Antes de proceder à avaliação quantitativa das células transfetadas, a transfeção foi confirmada por microscopia de fluorescência utilizando um microscópio Olympus CKX41 com um sistema de fluorescência incorporado Olympus URF LT50. Este microscópio foi utilizado, além da aquisição de imagem de transmissão, usando filtros de excitação no azul (460-490nm). Como é visível na figura 17, onde estão presentes os espectros de excitação e emissão da GFP, percebemos que conseguimos excitar a proteína fluorescente verde usando o filtro de excitação no azul (460-490nm), o que nos permite visualizar a fluorescência da GFP que se encontra dentro das células, acredita-se que é maioritariamente expressa no reticulo endoplasmático, o que nos ajuda a concluir se ocorreu o processo de transfeção pretendido.

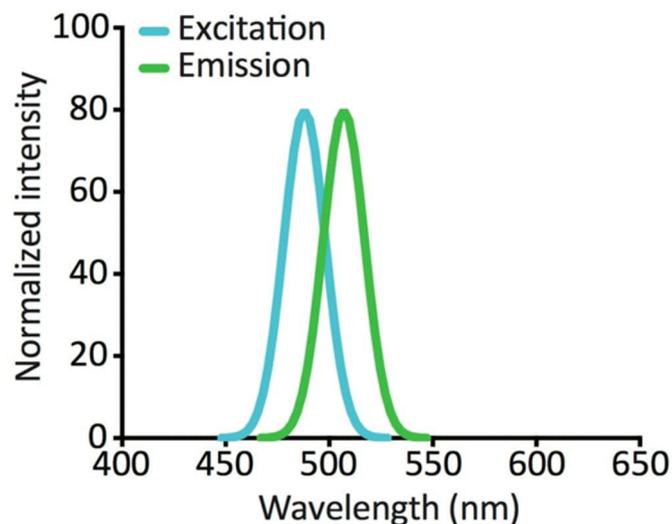


Figura 17: Espectro de excitação e emissão de fluorescência da GFP.

1.16 Citometria de Fluxo

O citómetro de fluxo é constituído por 3 partes importantes, o fluido responsável pelo transporte da amostra até ao ponto onde esta será analisada, lasers responsáveis pela irradiação da amostra e seus filtros, e o sistema eletrónico responsável pela conversão dos sinais dos detetores em sinais que podem ser lidos pelo computador.⁹⁸

A citometria de fluxo é uma tecnologia que analisa rapidamente e quantitativamente as características das células à medida que estas passam por lasers específicos enquanto suspensas numa solução tampão. Cada célula é analisada quanto à dispersão de luz e quanto à sua fluorescência. A dispersão de luz é medida em duas direções distintas, “*Forward Scatter*” (FSC), desta forma medindo o tamanho da célula, e “*Side Scatter*” (SSC) que indica a complexidade interna da célula. A fluorescência é medida através da expressão de proteínas fluorescentes existentes nas células. Desta forma a citometria de fluxo consegue distinguir várias populações de células numa amostra, por exemplo, distinguir células vivas de células mortas. Esta função presente nesta técnica, chamada de “*cell sorter*”, permite escolher as diferentes populações celulares que se pretende analisar, sendo bastante benéfico para uma maior credibilidade dos resultados obtidos.⁹⁸

Neste trabalho a citometria de fluxo foi utilizada para obter uma percentagem da eficácia do processo de transfeção. Após 48h da exposição às ondas fotoacústicas as células são colocadas numa solução de PBS de 300 µL e posteriormente lidas pelo citómetro. O citómetro foi programado para analisar 20000 células usando um laser de excitação de 488 nm e deteção de fluorescência verde. Nas experiências de citometria realizadas, foi imposto um “*gate*” com a finalidade de separar células vivas das mortas, pelo que os resultados obtidos da transfeção são relativos apenas às células vivas. Para cada amostra o protocolo foi mantido.

1.17 Análise estatística

Os valores medidos nas diferentes experiências são apresentados na forma de média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 8. Para além deste programa, outro foi utilizado para a avaliação das propriedades das ondas fotoacústicas geradas, OriginPro 2016, realizando a transformada de Fourier dos valores obtidos através do transdutor 225 MHz para obter a largura de banda, já a pressão absoluta foi obtida através do cálculo da transformada de Fourier e posterior calibração dos valores obtidos com o hidrofone de 30 MHz (protocolo na secção do material suplementar). A informação foi analisada com o teste One-way ANOVA. Cada condição tem um mínimo de três ensaios ($n=3$), sendo que cada um dos ensaios corresponde à média do triplicado.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Resultados

1.18 Caracterização das ondas fotoacústicas

As ondas fotoacústicas foram geradas utilizando dois tipos de laser, um laser de nanossegundos (M-NANO da montfort, com pulso de 8 ns) e um laser de picossegundos (EKSPLA PL 2143 A, com pulso de 30 ps, 10 Hz). Filmes de fuligem combinados com PDMS, foram investigados com excitações de laser pulsado a 1064 nm, para avaliar dois parâmetros: a pressão absoluta e a largura de banda. A pressão absoluta das ondas geradas foi medida através do uso de um Hidrofone de 30 MHz de *Precision Acoustics* (modelo NH0200) calibrado com um alcance de 1 a 30 MHz. A largura de banda de frequências foi obtida com o uso de um Transdutor de 225 MHz de *Panametrics/Olympus* (modelo V2113).

Na figura 18 observam-se os dois parâmetros das ondas calculados, usando o laser de nanossegundos. Neste caso, as ondas geradas obtiveram, a -6 dB, uma largura de banda de 10 MHz e uma pressão absoluta de 62,49 Bar.

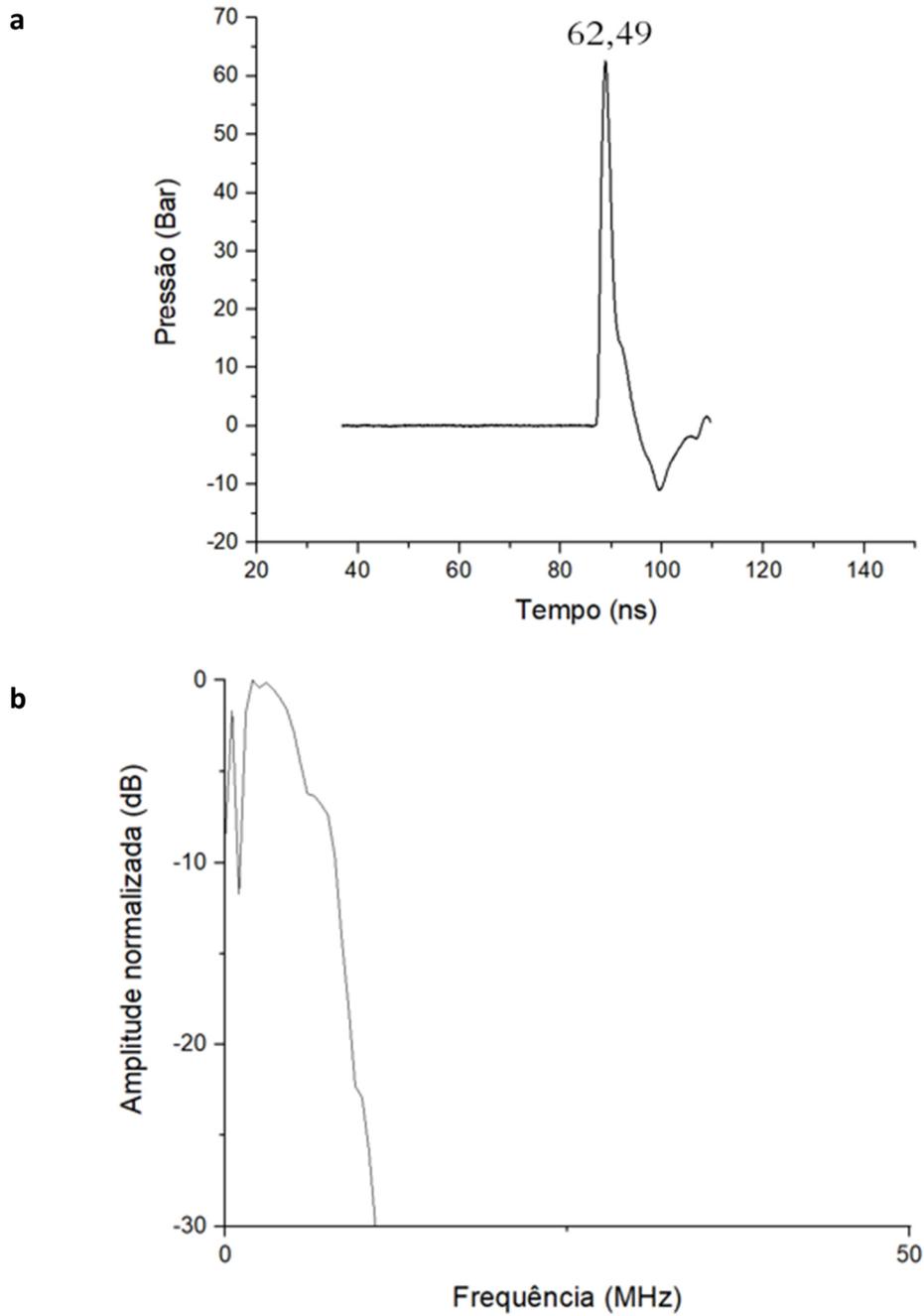


Figura 18: Sinais fotoacústicos obtidos com o laser de 8 ns, com uma fluência de 60 mJ cm^{-2} a 1064 nm, mostrando a) a pressão absoluta registada pelo Hidrofone de 30 MHz e calibrada e b) a FFT da onda detetada com o Transdutor de 225 MHz, com as respectivas frequências.

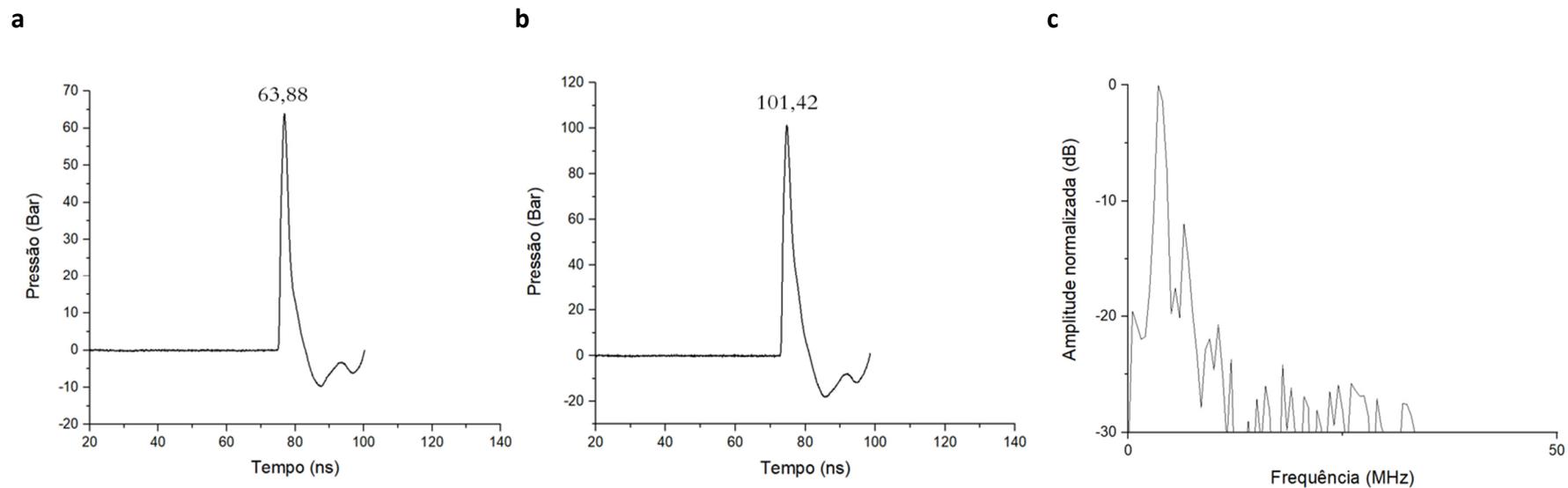


Figura 19: Sinais fotoacústicos obtidos com o laser de 30 ps, com uma fluência de a) 60 mJ cm^{-2} e b) 100 mJ cm^{-2} a 1064 nm , mostrando (a e b) as pressões absolutas registadas pelo Hidrofone de 30 MHz e calibrada, c) a FFT da onda detetada com o Transdutor de 225 MHz, com as respetivas frequências, com uma fluência de 100 mJ cm^{-2} .

Para o laser de picossegundos, as ondas fotoacústicas, apresentaram, a -6 dB, uma largura de banda de 8 MHz, e uma pressão absoluta de 64 bar (fluência de 60 mJ cm^{-2}) e 101 bar (100 mJ cm^{-2}). (Figura 19)

Para uma possível comparação entre três tipos de materiais piezofotônicos, foram utilizadas informações sobre as características dos materiais e das ondas geradas por estes, através de experiências efetuadas anteriormente no nosso grupo. As características mais relevantes dos filmes e das ondas por si geradas, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 : Características dos diferentes filmes e das respectivas ondas geradas.

Filmes	λ (nm)	A (Absorvância)	Espessura (μm)	μ_a (μm^{-1})	Pico de Pressão (Bar)		P_{max}/E_L **	Largura de banda a -6dB (MHz)		Pressão negativa (Bar)		Variação de pressão (Bar)	
					8 ns	30 ps *		8 ns	30 ps *	8 ns	30 ps *	8 ns	30 ps *
MnTPP	532	1,2	75	0,037	7	9	0,15	98	158	-	-	-	-
Carbono (Colab.)	1064	0,6	17	0,081	-	39	0,65	-	72	-	-9	-	81
Fuligem	1064	7	110	0,146	62	101	1	10	8	- 11	-20	73	121

* No filme carbono (colab.) a fluência utilizada para a caracterização das ondas foi 60 mJ cm^{-2} , já no filme de fuligem a fluência foi 100 mJ cm^{-2} .

** Para o cálculo da razão P_{max}/E_L foram utilizadas as pressões obtidas no laser de picossegundos.

1.19 Viabilidade Celular

Antes de proceder a qualquer experiência de transfeção, foram realizados testes de viabilidade celular para obter informações sobre o efeito das ondas fotoacústicas nas células. A viabilidade foi medida em duas densidades celulares, 30k e 40k, através da execução do teste *alamar blue*, avaliada 48h após a exposição às ondas. Foram realizadas várias condições de irradiação, tendo consistido no uso do laser de nanossegundos e de picossegundos. No laser de nanossegundos foi alterada a frequência de disparo do pulso de 6 Hz e 20 Hz, alterando também o tempo de exposição de 5 min e 10 min, mantendo a fluência de 60 mJ cm^{-2} . No laser de picossegundos foi alterada a fluência do laser entre 60 mJ cm^{-2} e 100 mJ cm^{-2} , com alteração também no tempo de exposição de 5 min e 10 min.

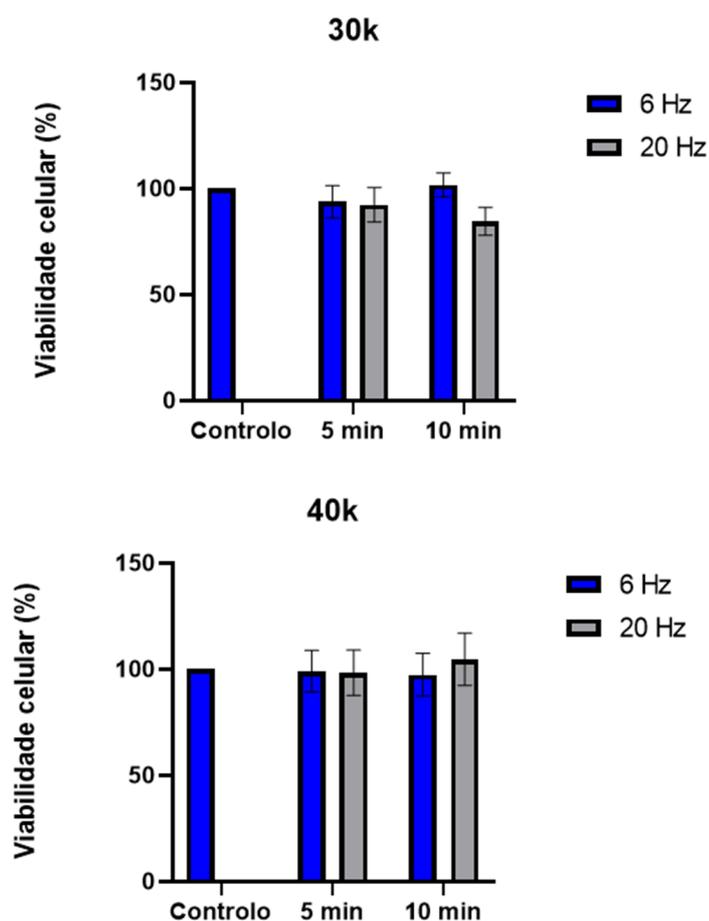


Figura 20: Valores respetivos da viabilidade celular para as duas densidades avaliadas com exposição ao laser de nanossegundos com uma fluência de 60 mJ cm^{-2} , variando a frequência de disparo e o tempo de irradiação.

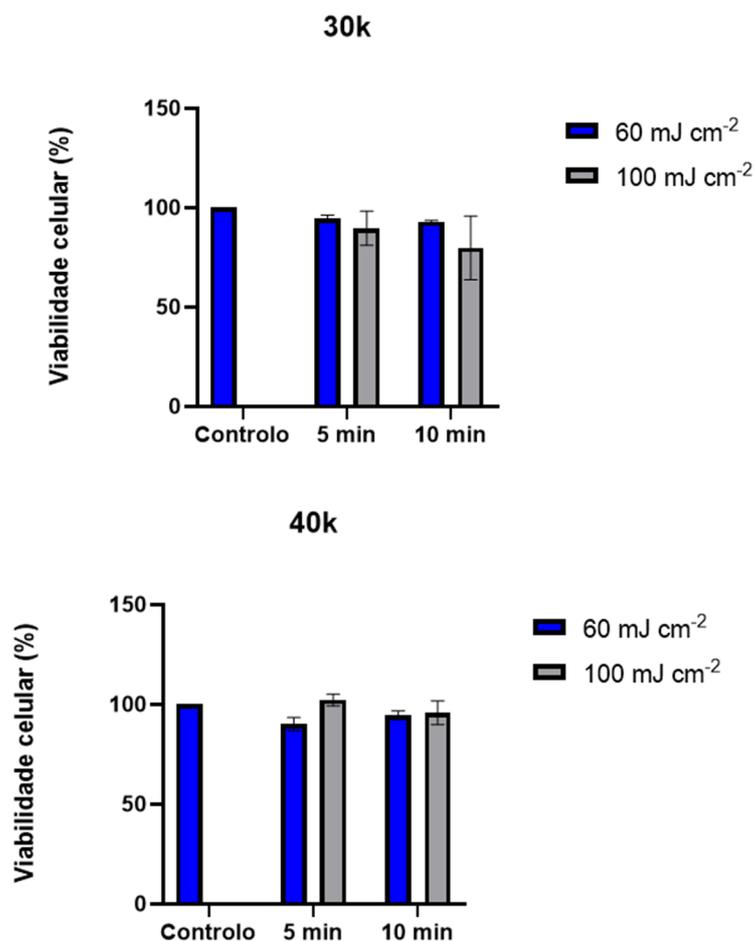


Figura 21: Valores respetivos da viabilidade celular para as duas densidades avaliadas com exposição ao laser de picossegundos usando duas fluências distintas (60 mJ cm^{-2} e 100 mJ cm^{-2}), alterando o tempo de irradiação.

Depois de várias experiências realizadas para obter uma conclusão fundamentada acerca do efeito das ondas fotoacústicas geradas usando filmes de fuligem na linha células COS-7, constatou-se então que as melhores condições a serem usadas para uma avaliação da transfeção seria usar uma densidade celular de 40000 células por poço, com uma irradiação de 10 min com uma fluência igual a 100 mJ cm^{-2} .

1.20 Transfeção *in vitro*

Após os resultados positivos relativos ao efeito das ondas fotoacústicas nas células, que nos possibilitaram concluir que as ondas não afetam a viabilidade celular, não provocando a sua morte, é possível usar as capacidades existentes e já conhecidas deste tipo de ondas no aumento da permeabilidade da membrana celular, possibilitando a entrada de compostos de interesse. Posto isto, procedeu-se à tentativa de transfeção de um plasmídeo que codifica a GFP, gWizGFP, em células da linha celular COS-7, estando plaqueadas com uma densidade celular de 40k, pois foi o valor de células que permitiu irradiar uma maior quantidade celular na zona central do poço.

Foram realizadas experiências usando lasers de nanossegundos e de picossegundos, com fluências de 60 mJ cm^{-2} e 100 mJ cm^{-2} , respetivamente, com um tempo de irradiação igual para os dois lasers (10 min). Para o laser de nanossegundos, foram utilizadas duas frequências de disparo, 10 Hz e 20 Hz, e a concentração de plasmídeo utilizada foi de $500 \mu\text{g/mL}$, já aquando do uso do laser de picossegundos, a frequência manteve-se nos 10 Hz, e foram utilizadas duas concentrações distintas, $250 \mu\text{g/mL}$ (figura 22) e $500 \mu\text{g/mL}$ (figura 23). Na experiência de transfeção usando o laser de nanossegundos não foi possível obter imagens relevantes ao microscópio, pois não se observou fluorescência suficiente para transpor digitalmente. Pelo que, os resultados estão descritos somente pela técnica de citometria de fluxo.



Figura 22: Imagem representativa da transfeção de gWizGFP, usando uma concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ 48 horas após a aplicação de ondas fotoacústicas por 10 minutos na linha celular COS-7 com 100 mJ cm^{-2} de fluência de laser com 30 ps de duração do pulso.

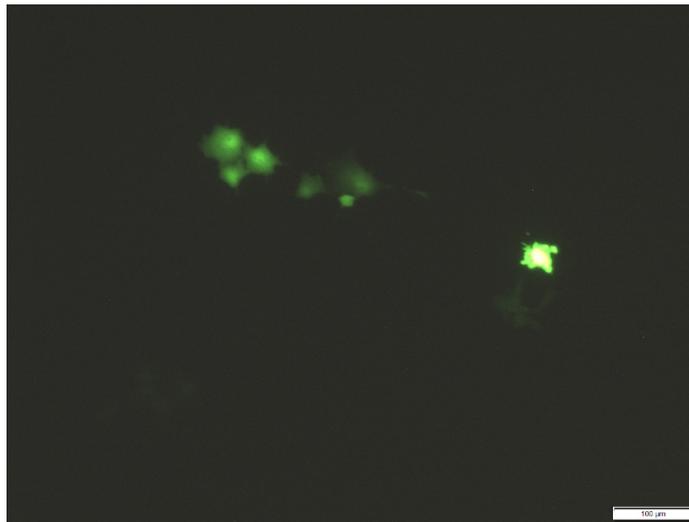


Figura 23: Imagem representativa da transfeção de gWizGFP, usando uma concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ 48 horas após a aplicação de ondas fotoacústicas por 10 minutos na linha celular COS-7 com 100 mJ cm^{-2} de fluência de laser com 30 ps de duração do pulso.

1.21 Citometria de Fluxo

Após uma etapa inicial de otimização usando o microscópio de fluorescência para determinar a eficácia do método qualitativamente, foi usada a citometria de fluxo com metodologia FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) nas células que foram submetidas a uma maior concentração de plasmídeo (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) após 48h de aplicação das ondas fotoacústicas, a fim de obter a eficácia da transfeção quantitativamente.

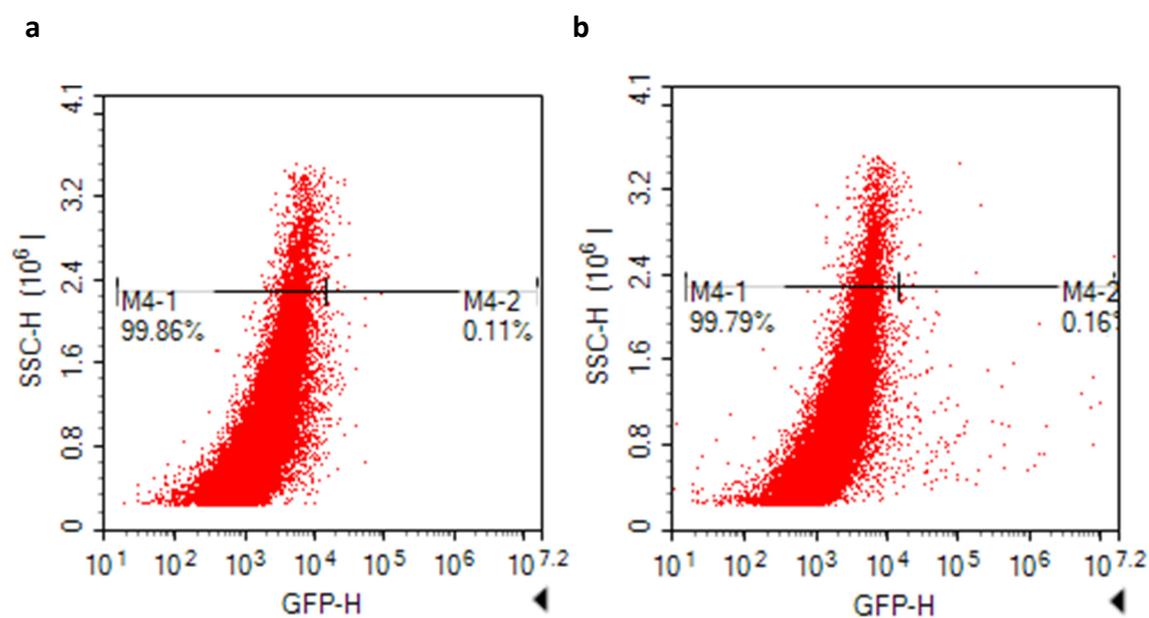


Figura 24: Expressão de GFP (à direita do traço a preto no gráfico) e luz de dispersão lateral das células (SSC), 48h após a transfeção. a) Controlo sem aplicação das ondas fotoacústicas, com adição de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasmídeo; b) Transfeção com aplicação das ondas fotoacústicas durante 10 min usando pulsos de laser de 30 ps com uma fluência de 100 mJ cm^{-2} com concentração de plasmídeo igual a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

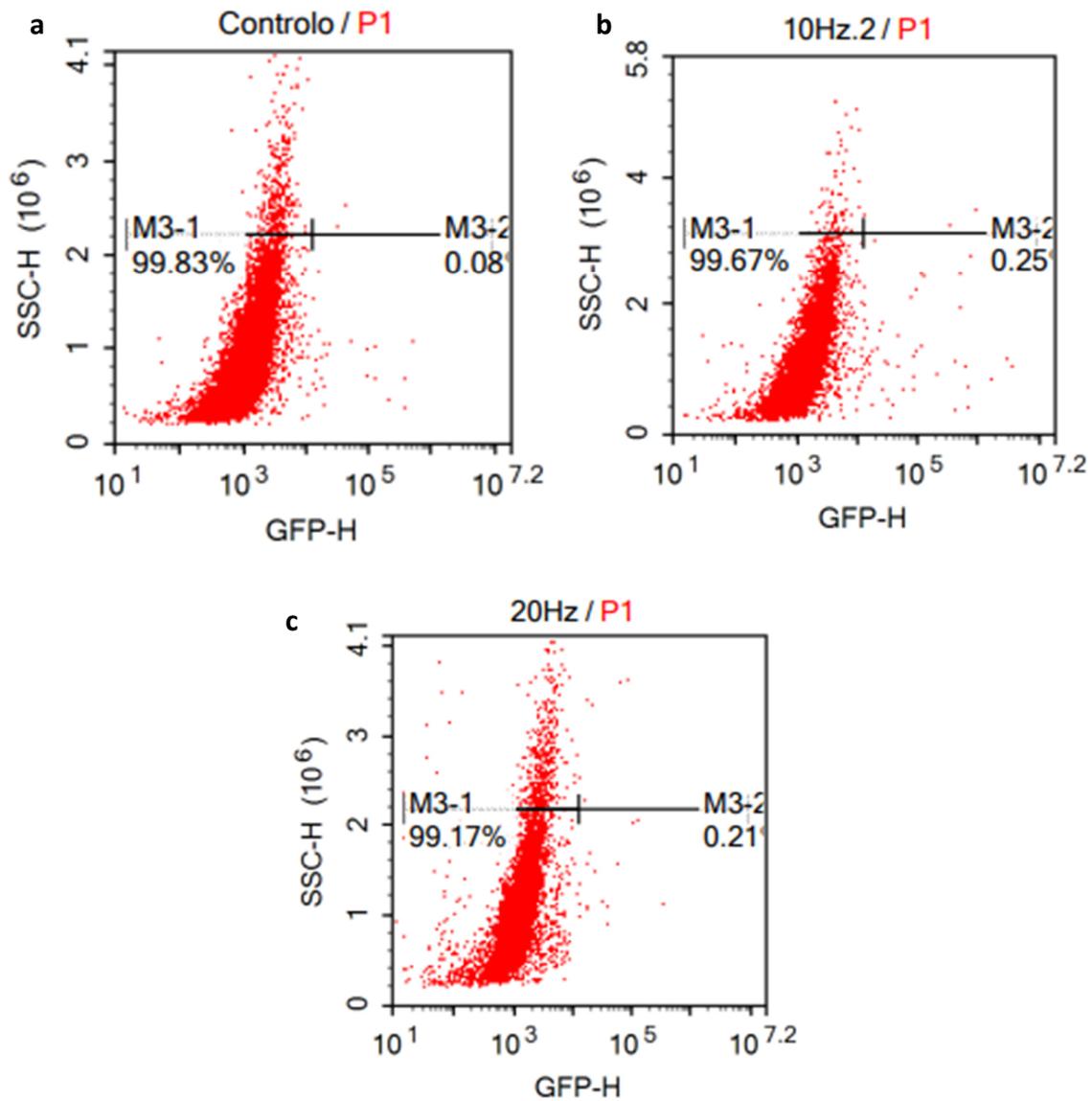


Figura 25: Expressão de GFP (à direita do traço a preto no gráfico) e luz de dispersão lateral das células (SSC), 48h após a transfeção. a) Controlo sem aplicação das ondas fotoacústicas, com adição de 500 µg/mL de plasmídeo; b) Transfeção com aplicação das ondas fotoacústicas durante 10 min usando pulsos de laser de 8 ns, com uma frequência de 10 Hz e uma fluência de 60 mJ cm⁻² com concentração de plasmídeo igual a 500 µg/mL. c) Transfeção com aplicação das ondas fotoacústicas durante 10 min usando pulsos de laser de 8 ns, com uma frequência de 20 Hz e uma fluência de 60 mJ cm⁻² com concentração de plasmídeo igual a 500 µg/mL.

Tabela 2: Tabela referente ao resultado obtido da transfeção *in vitro*, usando filme de fuligem combinado com PDMS para a geração de ondas, com uma exposição de 10 min ao laser de picossegundos, com uma fluência de 100 mJ cm^{-2} , e ao laser de nanossegundos durante 10 min, usando duas frequências diferentes, com uma concentração de gWizGFP de $500 \mu\text{g/mL}$.

Fuligem	Área poço (mm^2)	Área irradiada (mm^2)	Razão	Percentagem Citometria (%)	Percentagem Transfeção (%)
Picossegundos	380	13	30	0,16	4,8
Nanossegundos (10 Hz)	380	50	7,6	0,25	1,9
Nanossegundos (20 Hz)	380	50	7,6	0,21	1,6

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Discussão

Neste trabalho foram comparados três tipos de materiais piezofotônicos distintos, através da caracterização das ondas fotoacústicas por si geradas. Um material com a finalidade de transformar luz em ondas de pressão de forma eficiente, necessita de ter um coeficiente de absorção (μ_a) elevado, transições ultrarrápidas não radiativas e apresentar uma expansão térmica elevada.⁹⁹ Observando a figura 11, que representa o espectro de absorção do filme de fuligem, conclui-se que este material apresenta grande capacidade de absorção no comprimento de onda de interesse, 1064 nm. Esta elevada absorção é consequência do cromóforo existente na estrutura do filme e da sua espessura, que, para além desta capacidade, apresenta um decaimento não-radiativo na ordem dos picossegundos, o que provoca uma rápida transferência de calor para o PDMS e, desta forma, a sua expansão termoelástica resultando na libertação da onda de pressão. O pico de pressão compressiva (pressão positiva) é proporcional à energia absorvida abaixo do limite de ablação do material e ao coeficiente de absorção linear. Tendo em conta o observado nos resultados obtidos expressos na tabela 1, o filme com maior coeficiente de absorção (fuligem) conseguiu gerar a onda com o maior pico de pressão, o que seria expectável. No limite em que se aplica a equação 5, o que tem relevância para uma obtenção de maior pressão é a absorção de energia ótica por distância percorrida pela luz no material, que é representado como coeficiente de absorção linear (μ_a). Obviamente, o pico de pressão não depende apenas deste parâmetro, é preciso considerar a fluência do laser, o parâmetro de Grüneisen do polímero e a fração de luz absorvida que é convertida em calor, como demonstrado pela equação 5. Comparativamente ao polistireno, polímero usado no filme MnTPP, este apresenta um coeficiente de expansão térmica inferior ao do PDMS, e consequentemente o parâmetro de Grüneisen é inferior também, $\Gamma = c_s^2\beta/C_p$, (0,7 para polistireno e 0,9 para PDMS), apesar da velocidade de propagação do som no polistireno ser maior, 2400 m s⁻¹, enquanto que para o PDMS é 985 m s⁻¹.⁸³

Retornando ao coeficiente de absorção linear, e observando os valores de pressão obtidos, representados na tabela 1, é evidente que os filmes de fuligem apresentam pico de pressão maior que os outros dois, e tendo a maior absorvância ($A = 7$), terá maior

coeficiente de absorção linear pois estes se relacionam proporcionalmente, que é comprovado por esta equação $\mu_a = \ln(10) \frac{A}{h}$, onde A é a absorvância e h a espessura do material. Sabe-se que o uso progressivo de fluências mais altas, ou seja, mais energia é transferida para o material, leva a ondas de maiores intensidades, e olhando para o gráfico a) e b) da figura 19, podemos concluir que o uso de uma fluência de 100 mJ/cm² apresenta onda de maior intensidade em comparação à onda gerada usando a fluência de 60 mJ/cm², ou seja, podemos dizer que há uma certa linearidade entre fluência e pressão, como explicado pela equação 5. Para além disso, aquando do uso da mesma fluência em lasers diferentes, neste caso de 60 mJ/cm², observa-se que no laser de picossegundos a onda gerada tem uma amplitude ligeiramente maior em comparação ao laser de nanossegundos, isto acontece devido à densidade de potência (I_L) do laser, que é maior no laser de picossegundos levando a picos de pressão maiores, $P_{máx} = I_L \frac{\Gamma}{c_s} \cdot 100$

No entanto, ao observar os gráficos b) e c) na figura 18 e 19, respetivamente, verifica-se que as ondas geradas pelos filmes de fuligem apresentam frequências baixas e semelhantes entre os dois lasers. Já os outros dois filmes, apesar das baixas pressões que as ondas por si geradas apresentam, conseguem atingir frequências bem mais elevadas.

Sabendo, por trabalhos anteriores, que as ondas fotoacústicas são capazes de aumentar a permeabilidade celular através da perturbação da membrana devido a grandes gradientes de pressão, este trabalho teve como principal objetivo usar esta propriedade das ondas fotoacústicas como um método de transfeção genética em células COS-7, usando um plasmídeo que codifica a proteína GFP.

Antes de proceder a qualquer experiência de transfeção foi necessário assegurar que as ondas fotoacústicas não causavam toxicidade celular, pelo que, foram realizados vários testes de viabilidade celular, aquando do uso de ambos os lasers, com a finalidade de garantir segurança. Como visível nos gráficos das figuras 20 e 21, conclui-se que a exposição às ondas fotoacústicas durante 5 min e 10 min, usando lasers diferentes, não apresenta morte celular relevante o que permite o uso desta técnica em experiências de transfeção. A maioria dos resultados obtidos com a densidade celular de 40 000 de células por poço apresentam viabilidade a rondar os 98%, já quando a densidade era de 30 000, houve alguns desvios da viabilidade, no entanto, não são suficientes para afirmar que esta técnica é citotóxica. Adicionalmente, outros investigadores obtiveram resultados de

viabilidade de 100 % usando onda de choque com 320 bar¹⁰¹ e 90 % de viabilidade após 20 ondas de choque induzidas por laser (LISW) de 500 bar¹⁰². Para além disto, as ondas fotoacústicas geradas pelo filme de MnTPP, com pressão máxima de 10 bar, também não apresentou toxicidade.⁸ Posto isto, os resultados obtidos garantem que a exposição às ondas fotoacústicas é segura para as células.

Com a finalidade de demonstrar que a membrana celular das células COS-7 é impermeável ao plasmídeo de DNA, foram efetuados controlos negativos, e como demonstrado pelos gráficos a) das figuras 24 e 25, não houve, praticamente, entrada do plasmídeo nas células, comprovando a impermeabilidade da membrana.

As experiências de transfeção consistiram num protocolo de 5 dias, onde a adição do plasmídeo, e posterior exposição celular às ondas fotoacústicas ocorria no 3º dia, ou seja, a citometria foi realizada 48h após a experiência de transfeção. O que se verificou, observando ao microscópio a fluorescência da GFP, e comparando as células vistas no 4º dia e 5º dia, revelou-se bastante interessante. À medida que o tempo de encubação foi aumentando, maior era o número de células expressando a GFP. Este resultado confirma que as células se mantêm viáveis durante um longo período de tempo, e conseguem expressar a proteína GFP, mesmo após várias divisões celulares.

As experiências de citometria de fluxo foram realizadas apenas nas melhores condições avaliadas pela microscopia de fluorescência, usando uma concentração de 500 µg/mL de plasmídeo com exposição de 10 min às ondas fotoacústicas. Os resultados da citometria de fluxo apresentados têm por base todas as células presentes no poço, menos as mortas através da função “gating”, pelo que é importante referir que só a parte central do poço foi exposta às ondas, como se pode observar na tabela 2, através do cálculo da área irradiada em comparação com a área do poço. Comparando os resultados obtidos entre os dois lasers, conclui-se que o laser de picossegundos apresenta maior percentagem de transfeção obtida. Acredita-se que este desfecho é consequência das diferenças de pressão das ondas obtidas, onde o pico de pressão da onda do picossegundos é bastante superior (100 bar), pois a largura de banda das frequências obtidas é semelhante nas ondas obtidas pelos dois lasers. O melhor resultado de transfeção obtido usando o nosso protocolo foi de 4,84% de eficácia, efetuado à temperatura ambiente (25 °C). Terakawa *et al*^{103,104}, usando a linha celular NIH 3T3, obtiveram uma percentagem de transfeção de

2%, a 37 °C, usando 500 µg/mL de plasmídeo. Esta experiência consistia no uso da técnica de indução de uma onda de choque usando um laser (LISW), neste caso o laser utilizado apresentava uma fluência de 1,5 J/cm², obtendo um pico de pressão de 500 bar, o que limita o seu uso. A desvantagem deste método em comparação ao nosso, é que nós conseguimos gerar um número elevado de ondas fotoacústicas sem danificar o material piezofotônico, já Terakawa *et al* está limitado a poucos pulsos de laser com energias tão elevadas.

Um trabalho anteriormente realizado no nosso grupo de investigação, usando outro material piezofotônico, um filme de MnTPP para a geração das ondas, obteve um resultado próximo de 5% de eficácia, nas mesmas condições por nós usadas. As diferenças das ondas geradas pelos dois filmes, é que o filme de fuligem é capaz de gerar ondas com pressões 10 vezes mais elevadas que o filme de MnTPP, no entanto a largura de banda de frequências é muito superior no filme MnTPP. Isto leva-nos a concluir que a eficiência na permeabilização da membrana, vai depender da pressão aplicada e do tempo que a onda demora a atingir o pico de pressão, ou seja, são necessárias ondas com picos de pressão elevados e ondas com distribuição de frequências mais amplas, produzindo maiores gradientes de pressão e, desta forma, perturbar as membranas.

Conclusão

Na literatura científica estão descritas várias técnicas de transfeção genética, cada uma com as suas vantagens e desvantagens. Acredita-se que a terapia genética seja o futuro dos tratamentos de doenças genéticas, e mesmo oncológicas, no entanto são necessários muitos esforços e estudos para que este tipo de tratamento consiga maior translação para o mundo clínico. As principais preocupações consistem na toxicidade de alguns métodos já existentes, na segurança a longo prazo e obviamente na eficiência.

Neste trabalho foi demonstrado que o uso de ondas fotoacústicas, geradas por um material piezofotónico irradiado com pulsos de laser na ordem dos nanossegundos e picossegundos, em células COS-7, é capaz de aumentar a permeabilidade celular e desta forma permitir a entrada do plasmídeo de DNA codificante da proteína GFP. Comparando este método com outros métodos de transfeção não viral, referidos ao longo do texto, apresenta maior segurança, com viabilidade celular muito próxima de 100%. Apesar de apresentar uma eficiência relativamente baixa, de 5%, é um resultado bastante interessante para ser futuramente explorado, podendo ter a capacidade de um dia chegar a aplicações clínicas. Serão necessárias algumas otimizações do protocolo, como expor a maioria das células presentes no poço às ondas, tentar realizar a experiência com as células em suspensão, aumentar a temperatura, tentar fabricar um material que seja capaz de conciliar os dois parâmetros fundamentais necessários para uma transfeção eficiente, obtendo pressões elevadas como o filme de fuligem e larguras de banda de frequências na ordem das obtidas pelo filme de MnTPP. Estes são vários exemplos de possíveis melhorias, com a finalidade de potencializar o uso de ondas fotoacústicas na terapia genética.

BIBLIOGRAFIA

Referências

1. Cox, D. L. N. and M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (2017).
2. Friedmann, T. A brief history of gene therapy. *Nat. Genet.* **2**, 93–97 (1998).
3. Verma, I. M. & Weitzman, M. D. Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 711–738 (2005).
4. Papanikolaou, E. & Bosio, A. The Promise and the Hope of Gene Therapy. *Front. Genome Ed.* **3**, 1–14 (2021).
5. Linden, R. Gene therapy: what it is, what it is not and what it will be. *Estud. Avançados* **24**, 31–69 (2010).
6. Gonçalves, G. A. R. & Paiva, R. de M. A. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. **15**, 369–375 (2017).
7. Humbert, O., Davis, L. & Maizels, N. Targeted gene therapies: Tools, applications, optimization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 264–281 (2012).
8. Silva, A. D., Serpa, C. & Arnaut, L. G. Photoacoustic transfection of DNA encoding GFP. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
9. Naldini, L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* **526**, 351–360 (2015).
10. Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z. & Fehse, B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* **17**, 253–263 (2006).
11. Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M. C. Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* **11**, S10–S17 (2004).
12. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–358 (2003).
13. Bouard, D., Alazard-Dany, N. & Cosset, F. L. Viral vectors: From virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 153–165 (2009).

14. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
15. Como é feita a terapia genética. <https://super.abril.com.br/mundo-estranho/como-e-feita-a-terapia-genetica>. (acedido em 2023-05-06)
16. Prakash, V., Moore, M. & Yáñez-Muñoz, R. J. Current progress in therapeutic gene editing for monogenic diseases. *Mol. Ther.* **24**, 465–474 (2016).
17. Amer, M. H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol. Cell. Ther.* **2**, 27 (2014).
18. Uddin, F., Rudin, C. M. & Sen, T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front. Oncol.* **10**, (2020).
19. Sibbald, B. Death but one unintended consequence of gene-therapy trial. *C. Can. Med. Assoc. J. = J. l'Association medicale Can.* **164**, 1612 (2001).
20. Raper, S. E. *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**, 148–158 (2003).
21. Lee, C. S. *et al.* Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis.* **4**, 43–63 (2017).
22. Ramamoorth, M. & Narvekar, A. Non viral vectors in gene therapy - An overview. *J. Clin. Diagnostic Res.* **9**, GE01–GE06 (2015).
23. Cring, M. R. & Sheffield, V. C. Gene therapy and gene correction: targets, progress, and challenges for treating human diseases. *Gene Ther.* **29**, 3–12 (2022).
24. Mengstie, M. A. & Wondimu, B. Z. Mechanism and applications of crispr/ cas-9-mediated genome editing. *Biol. Targets Ther.* **15**, 353–361 (2021).
25. Watson, H. Biological membranes. *Essays Biochem.* **59**, 43–70 (2015).
26. Banfalvi, G. *Permeability of biological membranes. Permeability of Biological Membranes* (2016). doi:10.1007/978-3-319-28098-1.
27. Mladenov, I. M. & Hadzhilazova, M. Biological Membranes. *Forum Interdiscip.*

- Math.* **3**, 69–82 (2017).
28. Shtykalova, S., Deviatkin, D., Freund, S., Egorova, A. & Kiselev, A. Non-Viral Carriers for Nucleic Acids Delivery: Fundamentals and Current Applications. *Life* **13**, (2023).
 29. Stillwell, W. Membrane Transport. *An Introd. to Biol. Membr.* 423–451 (2016) doi:10.1016/b978-0-444-63772-7.00019-1.
 30. Cox, D. L. N. and M. M. *Biochemistry principles.* (2000).
 31. Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173–3178 (2010).
 32. Chong, Z. X., Yeap, S. K. & Ho, W. Y. Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ* **9**, 1–37 (2021).
 33. Ishida, M. & Selaru, F. M. miRNA-Based Therapeutic Strategies. *Curr. Pathobiol. Rep.* **1**, 63–70 (2013).
 34. Roser, A. E., Gomes, L. C., Schünemann, J., Maass, F. & Lingor, P. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for Parkinson’s disease. *Front. Neurosci.* **12**, 1–9 (2018).
 35. Yao, C. P., Zhang, Z. X., Rahmanzadeh, R. & Huettmann, G. Laser-based gene transfection and gene therapy. *IEEE Trans. Nanobioscience* **7**, 111–119 (2008).
 36. Shi, B. *et al.* An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **10**, 95–104 (2018).
 37. Lufino, M. M. P., Edser, P. A. H. & Wade-Martins, R. Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: Episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. *Mol. Ther.* **16**, 1525–1538 (2008).
 38. Elgundi, Z., Sifniotis, V., Reslan, M., Cruz, E. & Kayser, V. Laboratory scale production and purification of a therapeutic antibody. *J. Vis. Exp.* **2017**, 1–8 (2017).
 39. Balazs, D. A. & Godbey, W. Liposomes for Use in Gene Delivery. *J. Drug Deliv.* **2011**, 1–12 (2011).
 40. Taylor, M. W. Viruses and man: A history of interactions. *Viruses Man A Hist. Interact.* 1–430 (2015) doi:10.1007/978-3-319-07758-1.

41. Dimitrov, D. S. Virus entry: Molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 109–122 (2004).
42. Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L. & Gao, G. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target. Ther.* **6**, (2021).
43. Wang, A. Y., Peng, P. D., Ehrhardt, A., Storm, T. A. & Kay, M. A. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum. Gene Ther.* **15**, 405–413 (2004).
44. Ghosh, S., Brown, A. M., Jenkins, C. & Campbell, K. Viral Vector Systems for Gene Therapy: A Comprehensive Literature Review of Progress and Biosafety Challenges. *Appl. Biosaf.* **25**, 7–18 (2020).
45. Fernandes, P. D. M. dos S. Produção de vectores de adenovirus caninos: optimização do processo na perspectiva de aumento de escala. (Universidade de Lisboa, 2009).
46. Maginnis, M. S. Virus–Receptor Interactions: The Key to Cellular Invasion. *J. Mol. Biol.* **430**, 2590–2611 (2018).
47. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317–334 (2017).
48. Li, C. & Samulski, R. J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 255–272 (2020).
49. Robbins, P. D. & Ghivizzani, S. C. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* **80**, 35–47 (1998).
50. Du, X. *et al.* Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug Deliv.* **25**, 1516–1525 (2018).
51. Canoy, R. J. *et al.* Easy and robust electrotransfection protocol for efficient ectopic gene expression and genome editing in human B cells. *Gene Ther.* **30**, 167–171 (2023).
52. Fisher, T. Overview of Transfection Methods. <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/cell->

- culture/transfection/methods.html. (acedido em 2023-08-06)
53. Pylaev, T., Vanzha, E., Avdeeva, E., Khlebtsov, B. & Khlebtsov, N. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers. *J. Biophotonics* **12**, (2019).
 54. Yoon, S., Wang, P., Peng, Q., Wang, Y. & Shung, K. K. Acoustic-transfection for genomic manipulation of single-cells using high frequency ultrasound. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
 55. Sohrabijam, Z., Saeidifar, M. & Zamanian, A. Enhancement of magnetofection efficiency using chitosan coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calf thymus DNA. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **152**, 169–175 (2017).
 56. Wang, Y., Shang, S. & Li, C. Comparison of different kinds of nonviral vectors for gene delivery to human periodontal ligament stem cells. *J. Dent. Sci.* **10**, 414–422 (2015).
 57. Gao, X., Kim, K. & Liu, D. Critical Review Article. *Cambridge J. Educ.* **24**, 135–137 (1994).
 58. Cardarelli, F. *et al.* The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).
 59. Guo, L. *et al.* Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 622–629 (2017).
 60. Dufès, C., Uchegbu, I. F. & Schätzlein, A. G. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2177–2202 (2005).
 61. Fus-Kujawa, A. *et al.* An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 1–15 (2021).
 62. Loureiro, A. P. C. Vetores não virais com aplicação na terapia génica: Os poliplexos. (Universidade de Coimbra 2016).
 63. Al-Dosari, M. S. & Gao, X. Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent Progress. *AAPS J.* **11**, 671–681 (2009).
 64. Pinnapireddy, S. R., El Assy, M. R., Schlote, P. & Bakowsky, U. Glycosylated artificial

- virus-like hybrid vectors for advanced gene delivery. *Polymers (Basel)*. **11**, 1–9 (2019).
65. Carovac, A., Smajlovic, F. & Junuzovic, D. Application of Ultrasound in Medicine. *Acta Inform. Medica* **19**, 168 (2011).
 66. Humphrey, V. F. Ultrasound and matter-Physical interactions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 195–211 (2007).
 67. O'Brien, W. D. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **93**, 212–255 (2007).
 68. Pitt, W. G., Hussein, G. & Staples, B. J. Ultrasonic drug delivery - A general review. *Expert Opin. Drug Deliv.* **1**, 37–56 (2004).
 69. Kfoury, R., Marzban, B., Makki, E., Greenfield, M. L. & Yuan, H. Effect of pressure profile of shock waves on lipid membrane deformation. *PLoS One* **14**, 1–13 (2019).
 70. Holfeld, J. *et al.* Shock wave application to cell cultures. *J. Vis. Exp.* (2014) doi:10.3791/51076.
 71. Haupt, G., Haupt, A., Ekkernkamp, A., Gerety, B. & Chvapil, M. Influence of shock waves on fracture healing. *Urology* **39**, 529–532 (1992).
 72. Byron, C. R., Benson, B. M., Stewart, A. A. & Stewart, M. C. Effects of radial shock waves on membrane permeability and viability of chondrocytes and structure of articular cartilage in equine cartilage explants. *Am. J. Vet. Res.* **66**, 1757–1763 (2005).
 73. Rivera, A. L., Magaña-Ortíz, D., Gómez-Lim, M., Fernández, F. & Loske, A. M. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Phys. Life Rev.* **11**, 184–203 (2014).
 74. Ohl, C. D. & Ikink, R. Shock-Wave-Induced Jetting of Micron-Size Bubbles. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 4 (2003).
 75. Kodama, T., Hamblin, M. R. & Doukas, A. G. Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: Importance of impulse. *Biophys. J.* **79**, 1821–1832 (2000).
 76. Ito, Y. *et al.* Interferometric and fluorescence analysis of shock wave effects on cell

- membrane. *Commun. Phys.* **3**, 1–6 (2020).
77. Xia, J., Yao, J. & Wang, L. V. Photoacoustic tomography: Principles and advances. *Prog. Electromagn. Res.* **147**, 1–22 (2014).
 78. Colchester, R. J. *et al.* All-Optical Rotational Ultrasound Imaging. *Sci. Rep.* **9**, 1–8 (2019).
 79. Barbosa, R. C. S. & Mendes, P. M. A Comprehensive Review on Photoacoustic-Based Devices for Biomedical Applications. *Sensors* **22**, (2022).
 80. Potter, E. & NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
 81. Wang, L. V. & Hu, S. Photoacoustic tomography: In vivo imaging from organelles to organs. *Science (80-.)*. **335**, 1458–1462 (2012).
 82. Zhang, H. F., Maslov, K., Stoica, G. & Wang, L. V. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging. *Nat. Biotechnol.* **24**, 848–851 (2006).
 83. Silva, A. D. *et al.* Photoacoustic generation of intense and broadband ultrasound pulses with functionalized carbon nanotubes. *Nanoscale* **12**, 20831–20839 (2020).
 84. Arnaut, L. G., Caldwell, R. A., Elbert, J. E. & Melton, L. A. Recent advances in photoacoustic calorimetry: Theoretical basis and improvements in experimental design. *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 5381–5389 (1992).
 85. Pereira, D. A. *et al.* Imaging of photoacoustic-mediated permeabilization of giant unilamellar vesicles (GUVs). *Sci. Rep.* **11**, 1–12 (2021).
 86. Sá, G. F. F., Serpa, C. & Arnaut, L. G. Stratum corneum permeabilization with photoacoustic waves generated by piezophotonic materials. *J. Control. Release* **167**, 290–300 (2013).
 87. Zhou, Y., Yao, J. & Wang, L. V. Tutorial on photoacoustic tomography. *J. Biomed. Opt.* **21**, 061007 (2016).
 88. Eck, M. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Technischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau Performance enhancement of hybrid nanocrystal / polymer bulk heterojunction solar cells : aspects of device

- efficiency , reproducibili. *Dissertation* 1–217 (2017).
89. López-Marín, L. M., Rivera, A. L., Fernández, F. & Loske, A. M. Shock wave-induced permeabilization of mammalian cells. *Phys. Life Rev.* **26–27**, 1–38 (2018).
 90. Koshiyama, K., Kodama, T., Yano, T. & Fujikawa, S. Structural change in lipid bilayers and water penetration induced by shock waves: Molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **91**, 2198–2205 (2006).
 91. Hsieh, B. Y. *et al.* A laser ultrasound transducer using carbon nanofibers-polydimethylsiloxane composite thin film. *Appl. Phys. Lett.* **106**, 1–6 (2015).
 92. Lee, T., Baac, H. W., Li, Q. & Guo, L. J. Efficient Photoacoustic Conversion in Optical Nanomaterials and Composites. *Adv. Opt. Mater.* **6**, 1–30 (2018).
 93. Chang, W. Y., Huang, W., Kim, J., Li, S. & Jiang, X. Candle soot nanoparticles-polydimethylsiloxane composites for laser ultrasound transducers. *Appl. Phys. Lett.* **107**, (2015).
 94. Hou, Y., Kim, J. S., Ashkenazi, S., O'Donnell, M. & Guo, L. J. Optical generation of high frequency ultrasound using two-dimensional gold nanostructure. *Appl. Phys. Lett.* **89**, (2006).
 95. Vella, D., Mrzel, A., Drnovšek, A., Shvalya, V. & Jezeršek, M. Ultrasonic photoacoustic emitter of graphene-nanocomposites film on a flexible substrate. *Photoacoustics* **28**, (2022).
 96. Jain, P. K., Lee, K. S., El-sayed, I. H. & El-sayed, M. A. <Jp0571700.Pdf>. 7238–7248 (2006).
 97. Won Baac, H. *et al.* Carbon nanotube composite optoacoustic transmitters for strong and high frequency ultrasound generation. *Appl. Phys. Lett.* **97**, 1–4 (2010).
 98. Villas, B. H. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis.* **5**, 56–61 (1998).
 99. Serpa, C., Sá, G. F. F. & Arnaut, L. G. Intense high-frequency pressure waves produced with low laser fluences. *Photonic Ther. Diagnostics VIII* **8207**, 820701 (2012).
 100. Sigrist, M. W. Laser generation of acoustic waves in liquids and gases. *J. Appl. Phys.*

- 60**, (1986).
101. Kodama, T., Hamblin, M. R. & Doukas, A. G. Cytoplasmic molecular delivery with shock waves: Importance of impulse. *Biophys. J.* **79**, 1821–1832 (2000).
 102. Ando, T., Sato, S., Takano, S., Ashida, H. & Obara, M. Propagation characteristics of laser-induced stress wave in deep tissue for gene transfer. *Appl. Surf. Sci.* **255**, 9898–9901 (2009).
 103. Terakawa, M. *et al.* In vitro gene transfer to mammalian cells by the use of laser-induced stress waves: effects of stress wave parameters, ambient temperature, and cell type. *J. Biomed. Opt.* **11**, 014026 (2006).
 104. Terakawa, M. *et al.* Gene transfer into mammalian cells by use of a nanosecond pulsed laser-induced stress wave. *Opt. Lett.* **29**, 1227 (2004).

Material Suplementar

A obtenção e calibração dos gráficos relativos às pressões absolutas das ondas foi efetuada no OriginPro 2016. Após as medições com o hidrofone de 30 MHz, foi feita a transformada de Fourier da onda. Obteve-se um gráfico de dB normalizados em função das frequências, e retiraram-se os valores correspondentes das contribuições de 1 MHz até 30 MHz. Colocou-se num Excel os valores da sensibilidade do hidrofone que foram partilhados pelo fornecedor. O valor total da soma da calibração foi multiplicado pela onda e obteve-se a calibração de mili Volt (mV) para mega Pascal (Mpa).

MHZ	Contribuion	%	MHZ	mV/Mpa	Calibration (mV/MPa)
1	-4,77E+00	0,020	1	33	0,648
2	-1,77E+00	0,007	2	43	0,313
3	-4,94E-01	0,002	3	55	0,112
4	-2,90E-01	0,001	4	56	0,067
5	-1,61E+00	0,007	5	49	0,324
6	-2,48E+00	0,010	6	49	0,501
7	-2,86E+00	0,012	7	50	0,588
8	-5,25E+00	0,022	8	42	0,908
9	-6,48E+00	0,027	9	39	1,039
10	-8,02E+00	0,033	10	33	1,089
11	-6,94633	0,029	11	38	1,086
12	-5,52449	0,023	12	45	1,023
13	-6,10579	0,025	13	42	1,055
14	-7,00464	0,029	14	40	1,153
15	-7,11953	0,029	15	41	1,201
16	-7,42886	0,031	16	43	1,314
17	-8,15948	0,034	17	43	1,443
18	-8,84244	0,036	18	43	1,564
19	-9,29996	0,038	19	41	1,569
20	-9,70546	0,040	20	41	1,637
21	-9,91298	0,041	21	42	1,713
22	-10,29764	0,042	22	43	1,822
23	-11,29653	0,046	23	44	2,045
24	-12,10311	0,050	24	43	2,141
25	-1,33E+01	0,055	25	41	2,243
26	-1,38E+01	0,057	26	40	2,279
27	-1,44E+01	0,059	27	39	2,310
28	-14,84433	0,061	28	38	2,321
29	-16,15324	0,066	29	36	2,392
30	-16,74615	0,069	30	35	2,411
Total	-243,06682	1,0000	Value (mV/MPa)		40,311