

LEÔNIDAS JOÃO DE MELLO JUNIOR

**SILENCIAMENTO DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS *BCL-2* E
BCL-xL POR RNA DE INTERFERÊNCIA CARREADO POR
NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS EM CÂNCER DE MAMA**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Bioquímica
Orientadora: Profa. Dra. Tânia
Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis-SC
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mello Junior, Leônidas João de
SILENCIAMENTO DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS BCL-2 E
BCL-xL POR RNA DE INTERFERÊNCIA CARREADO POR
NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS EM CÂNCER DE MAMA / Leônidas
João de Mello Junior ; orientadora, Tânia Beatriz
Creczynski Pasa, 2017.
119 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

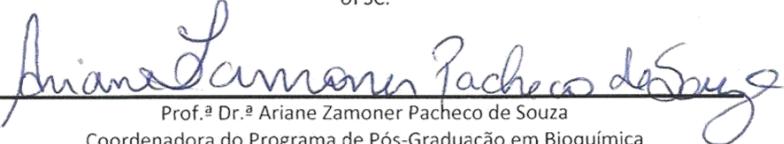
1. Bioquímica. 2. câncer. 3. nanotecnologia. 4.
silenciamento gênico. 5. siRNA. I. Pasa, Tânia
Beatriz Creczynski . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica. III. Título.

“Silenciamento dos genes antiapoptóticos *BCL-2* e *BCL-xL* por RNA de interferência carregado por nanopartículas híbridas em câncer de mama”

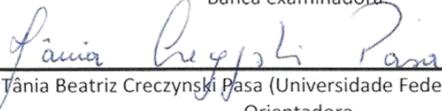
Por

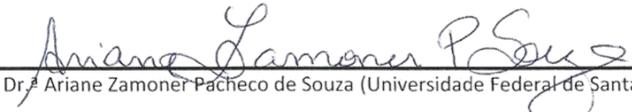
Leônidas João de Mello Junior

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (23/PPGBQA/2017) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.


Prof.ª Dr.ª Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:


Dr.ª Tânia Beatriz Creczynski Pasa (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora


Dr.ª Ariane Zamoner Pacheco de Souza (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.ª Hellen Karine Stulzer (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr. Rilton Alves de Freitas (Universidade Federal do Paraná)

Florianópolis, 06 de setembro de 2017.

Este trabalho é dedicado aos meus pais
Terezinha (*in memoriam*) e Leônidas e
à minha esposa Mônica.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos, primeiramente a Deus, por me guiar nas escolhas que fiz durante a vida e que me conduziram a este momento.

À minha esposa Mônica pelo companheirismo, paciência, cumplicidade e amor. Em especial neste momento, já que, enquanto estas palavras são escritas, aguardamos a chegada de nossos amados filhos Helena e Martin.

À minha família pelo apoio e compreensão nas ausências e distâncias. Agradeço aos meus pais Terezinha (*in memoriam*) e Leônidas pela minha verdadeira formação. Muito obrigado às minhas irmãs: Carmem, Norma, Vera, Mara e Márcia pelo amor e incentivo de sempre.

À Prof. Tânia Beatriz Creczynski Pasa, pelo acolhimento e confiança desde o primeiro contato. Serei sempre grato pelos ensinamentos, convivência e pelo exemplo inspirador de liderança e dedicação à Ciência. Desejo que esta parceria científica continue e a amizade perdure.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina (IFSC) pelo apoio, incentivo e concessão da licença para a realização do doutorado. Obrigado pelo investimento na minha formação como docente e cientista.

Ao professor Frederico Pittella da Silva, pelo suporte técnico e científico, colaboração, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do Grupo de Estudo de Interações entre Macro e Micromoléculas (GEIMM) pelo acolhimento, ensinamentos e amizade. Meu agradecimento especial às colegas Gabriela, Milene e Tatiane pelo apoio e carinho, especialmente no início desta jornada. Obrigado às professoras: Dra. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dr^a. Iara Fabrícia Kretzer, Dr^a Evelyn Winter e Dr^a Adny Henrique da Silva e ao Dr. Jelver Alexander Sierra Restrepo pelo apoio, contribuições e amizade.

Às colegas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Ana e Taliane pela parceria e colaborações.

Aos colegas de Instituto Federal, em especial: Ana Paula, Dorico, Graciane, Geanine, Guilherme, Jeovani, Júlio, Márcio, Nilson, Tabajara, Vanessa e Yuri, pelo incentivo e amizade.

Aos amigos Cristian e Liziane pelo incentivo e amizade.

Às colegas Neli Branco de Miranda e Aline Montibeler pelas colaborações.

Aos servidores do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pelo suporte técnico para os experimentos.

Ao CNPq pelo fomento ao projeto.

A todos que de alguma forma, pessoalmente ou profissionalmente, contribuíram com a realização deste trabalho, minha gratidão.

RESUMO

O câncer consiste em um conjunto multifatorial de doenças e está entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo. O de mama é o segundo tipo de câncer mais comum, ocupando o primeiro lugar considerando apenas o gênero feminino. O desenvolvimento da doença está fortemente associado ao desequilíbrio dos mecanismos genéticos de proliferação celular, entre eles os que controlam os mecanismos de sobrevivência e morte celular, como a apoptose. A expressão dos genes *BCL-2* e *BCL-xL* resulta na promoção da sobrevivência celular pela inibição da apoptose e no câncer de mama estes genes encontram-se superexpressos. Assim, além dos tratamentos existentes, uma nova abordagem de combate a doença seria o silenciamento de genes com expressão exacerbada. Para silenciar genes tem sido descrito o uso de pequenos RNAs de interferência (siRNA). No entanto, existem algumas limitações para a aplicação de siRNAs, como a baixa estabilidade e dificuldade de internalização pelas células alvo, fomentando a necessidade de vetores para promover a entrega do ácido nucleico. Neste estudo, duas formulações de nanopartículas híbridas CaP-siRNA-PEG-GLU poliânion foram desenvolvidas para promover a entrega, *in vivo* e *in vitro*, de siRNA para células de câncer de mama para silenciar os genes antiapoptóticos *BCL-2* e *BCL-xL*. Os objetivos foram avaliar se os sistemas nanocarreadores seriam eficientes na entrega de siRNA ao alvo e se o silenciamento destes genes reduziria a viabilidade das células tumorais de carcinoma mamário, aumentariam a apoptose e seriam capazes de inibir o crescimento tumoral. Para isto, as formulações foram testadas em cultura de células humanas de carcinoma mamário (MCF-7) e em modelo tumoral murino (Balb/c). Os resultados obtidos quanto à caracterização das nanopartículas desenvolvidas, mostraram que estas apresentam tamanho e aspecto estrutural adequado para a entrega de ácidos nucleicos. As formulações também demonstraram homogeneidade e estabilidade em soluções tampões, meio de cultura e salina, propriedades importantes para aplicações biológicas. Tanto os ensaios *in vitro* quanto os *in vivo*, mostraram que após a incubação com os sistemas nanocarreadores, a expressão dos genes *BCL-2* ou *BCL-xL* foi reduzida. Ainda, as sequências de siRNAs utilizadas induziram, *in vitro*, a morte de células tumorais por apoptose. Como as proteínas alvo deste estudo são relacionadas com a resistência aos medicamentos quimioterápicos, as formulações também foram testadas na presença de doxorubicina. Os resultados mostraram diminuição significativa na CC₅₀ deste fármaco, em

incubação combinada com o silenciamento dos genes antiapoptóticos *BCL-2* ou *BCL-xL*. Os resultados dos ensaios *in vivo* mostraram que a formulação contendo siRNA-*BCL-2* inibiu o crescimento tumoral no modelo murino de câncer de mama após 14 dias de tratamento. Adicionalmente, os resultados demonstraram que as nanopartículas híbridas CaP-PEG(GLU)-Poliânion são seguras para administração endovenosa e foram eficientes em promover a entrega de siRNA ao tecido tumoral. Em conclusão, o silenciamento de genes antiapoptóticos *BCL-2* e *BCL-xL* através do uso de siRNA carregado por nanopartículas híbridas CaP-PEG(GLU)-Poliânion, mostrou que pode ser uma estratégia promissora contra o câncer de mama, especialmente quando combinada com a quimioterapia padrão.

Palavras-chave: Câncer de mama; Silenciamento Gênico; Apoptose; *BCL-2*; *BCL-xL*; Nanopartículas.

ABSTRACT

Cancer is among the major causes of morbidity and mortality worldwide and breast cancer stands out by the epidemiological importance because it is the second most common cancer, ranking first considering only the female gender. The development of cancer clearly related with an imbalance of genetic mechanisms of cell proliferation, including those that control the survival mechanisms and cell death, such as apoptosis. Expression of *BCL-2* or *BCL-xL* genes results in the promotion of cell survival by the inhibition of apoptosis. Thus, a novel approach to silence anti-apoptotic genes in cancer context, is the use of small interfering RNAs (siRNA). However, there are some limitations to apply siRNAs, such as low stability and difficulties of internalization by target cells, pointing out to the need for vectors to promote nucleic acid delivery. In this study, hybrid nanoparticles CaP-siRNA-PEG-GLU-polyanion were developed to promote both *in vivo* and *in vitro* delivery of siRNA to breast cancer cells. Facing this scenario, the objectives of this work were to evaluate whether the nanocarrier systems would be efficient to deliver siRNA to the target and whether the silencing of these genes would reduce the viability of mammary carcinoma tumor cells, increasing apoptosis. It has also been tested whether the formulations were able to inhibit tumor growth in tumor-bearing mice. To achieve this, the formulations were tested against human mammary carcinoma cell culture (MCF-7) and murine solid tumor model (Balb/c). Regarding the characterization of the nanoparticles the results showed suitable size and structural aspect to the therapeutic strategy.

A homogeneity and stability of nanoparticles in buffer solutions, culture medium, and saline were also obtained, which is an important feature for biological applications. Additionally, both the *in vitro* and *in vivo* assays showed that the incubation with tested nanocarrier systems decreased the expression of *BCL-2* or *BCL-xL* genes. The siRNA sequences applied also induced *in vitro* cytotoxicity in tumor cells increasing apoptosis. Once the targeted proteins are related to drugs resistance, the nanocarriers systems were also tested in the MCF-7 cells in the presence of doxorubicin. The results showed a significant reduction in CC50 of the drug, in combined incubation with nanoparticles loading siRNA. The results obtained with the formulation loading siRNA-*BCL-2* in murine tumor model assays showed inhibition of tumor growth after 14 days of treatment. The hybrid CaP-PEG(GLU)-Polyanion nanoparticles were demonstrated to be safe for intravenous administration and are efficient in promoting the delivery of siRNA to tumor tissue. In

conclusion, the silencing BCL-2 or BCL-xL antiapoptotic genes through the use of siRNA loaded into hybrid nanoparticles were achieved successfully and may be a promising strategy against breast cancer, especially whether combined with standard chemotherapy.

Keywords: Gene Silencing; Breast Cancer; Apoptosis, BCL-2; BCL-xL; Hybrid Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Família de proteínas BCL-2.	30
Figura 2	Via intrínseca de apoptose.	31
Figura 3	Unidade de alvéolo mamário.	34
Figura 4	Mecanismo de ação do pequeno RNA de interferência (siRNA).	39
Figura 5	Efeito EPR (aumento da permeabilidade e retenção).	41
Figura 6	Ilustração esquemática de uma nanopartícula híbrida Cap-PEG-Poliânion contendo siRNA.	42
Figura 7	Transcrito do gene <i>BCL-2</i> humano e murino, indicando local de pareamento com siRNA.	59
Figura 8	Transcrito do gene <i>BCL-xL</i> humano e murino, indicando local de pareamento com siRNA.	59
Figura 9	Quantificação relativa de proteína BCL-2 e BCL-xL em células humanas de carcinoma mamário MCF-7.	60
Figura 10	Histogramas de distribuição de tamanho, ponderados pelo número de nanopartículas.	61
Figura 11	Comparação do tamanho de diferentes formulações nanoestruturadas.	61
Figura 12	Imagens de nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão.	62
Figura 13	Tamanho das nanopartículas em diferentes soluções.	62
Figura 14	Índice de polidispersão (PdI) das nanopartículas em diferentes soluções.	63

Figura 15	Imagem de nanopartículas diluídas em meio de cultura (RPMI) obtida por microscopia eletrônica de transmissão.	63
Figura 16	Ensaio de hemólise.	64
Figura 17	Quantificação normalizada de proteína BCL-2 em diferentes linhagens celulares humanas de carcinoma mamário.	65
Figura 18	Quantificação relativa de proteína BCL-2 em células humanas de carcinoma mamário MCF-7.	66
Figura 19	Análise quantitativa da expressão do gene <i>BCL-2</i> em células de carcinoma mamário.	66
Figura 20	Quantificação relativa de proteína BCL-xL em células humanas de carcinoma mamário MCF-7.	67
Figura 21	Análise quantitativa da expressão do gene <i>BCL-xL</i> em células de carcinoma mamário.	68
Figura 22	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-2 durante 24 h.	69
Figura 23	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-2 durante 48 h.	70
Figura 24	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-2 durante 72 h.	70
Figura 25	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após Incubação com NP siBCL-2 durante 96 h.	71

Figura 26	Citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 após incubação com doxorubicina (DOX) e NP siBCL-2 (200nM).	72
Figura 27	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 24 h.	72
Figura 28	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 48 h.	73
Figura 29	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 72 h.	73
Figura 30	Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 96 h.	74
Figura 31	Citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 após incubação com doxorubicina (DOX) e NP siBCL-xL (200nM).	74
Figura 32	Análise das Populações de células positivas para anexina V-FITC de câncer de mama humano MCF-7 após 24 h de incubação com formulação NP siBCL-2, seguida de 48 horas de incubação com doxorubicina.	76
Figura 33	Distribuição populacional de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC após 24 h de incubação com formulação NP siBCL-2, seguida de 48 horas de incubação com doxorubicina.	76
Figura 34	Análise das Populações de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC. Incubação de 24 h de com NP siBCL-xL, seguida de 48 horas de incubação com doxorubicina.	77

Figura 35	Distribuição populacional de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC após 24 h de incubação com formulação NP siBCL-xL, seguida de 48 horas de incubação com doxorrubicina.	77
Figura 36	Análise por microscopia confocal a laser de células de câncer de mama humano MCF-7 após incubação com doxorrubicina e nanopartículas carreando siRNA.	78
Figura 37	Quantificação da densidade nuclear relativa de fluorescência obtida por microscopia de confocal a laser.	79
Figura 38	Crescimento tumoral após tratamento com siRNA- <i>BCL-xL</i> carregado por nanopartículas híbridas.	80
Figura 39	Crescimento tumoral após tratamento com siRNA- <i>BCL-2</i> carregado por nanopartículas híbridas.	81
Figura 40	Expressão do gene <i>BCL-2</i> em carcinoma mamário murino após tratamento com NP siBCL-2.	82
Figura 41	Expressão do gene <i>BCL-xL</i> em carcinoma mamário murino após tratamento com NP siBCL-xL.	83
Figura 42	Quantificação relativa de proteína BCL-2 em carcinoma mamário murino.	84
Figura 43	Quantificação relativa de proteína BCL-xL em carcinoma mamário murino.	85

- Figura 44** Imagens histopatológicas de: a) pulmão, b) fígado, 86
c) baço e d) rim de animais controle (salina) ou
tratados com nanopartículas híbridas carreando
siRNA *BCL-2* ou *BCL-xL*.
- Figura 45** Biodistribuição de nanopartículas híbridas 87
carreando siRNA-cianina-5 (Cy-5).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação entre a expressão de BCL-2 e fatores clínico-patológicos de pacientes femininos de câncer de mama.	35
Tabela 2	Oligonucleotídeos iniciadores.	55
Tabela 3	Oligonucleotídeos de siRNA.	58
Tabela 4	Caracterização das nanopartículas híbridas.	64
Tabela 5	Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores.	68
Tabela 6	Valores de área sobre a curva e índice de seletividade da citotoxicidade induzida pelas formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL.	75
Tabela 7	Peso dos animais tratados com as formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL.	81
Tabela 8	Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF-1	Fator de ativação de apoptose 1
ASB	Albumina sérica bovina
BCL-2	Célula B de Linfoma – 2
BCL-xL	Célula B de Linfoma–Extra Grande
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BH	Domínio de homologia
BH3-DU	Domínio único de homologia 3
BLAST	Ferramenta básica de busca de alinhamento
BRCA1	Oncogene de mama (<i>breast cancer 1</i>)
BRCA2	Oncogene de mama 2 (<i>breast cancer 2</i>)
CaP	Fosfato de cálcio
CaP-PEG-b-poli(GLU)-Poliânion	Nanopartícula de fosfato de cálcio revestida por polímero polietileno-glicol-ácido glutâmico
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHOL-AA-Cit	Colesterol-ácido aminocapróico-citracónico
Ct	Ciclo limiar (<i>threshold</i>)
Cy-5	Cianina-5
DAPI	4',6-diamidino-2-fenillindol

DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DS	Dupla fita
EPR	Aumento da permeabilidade e retenção
ER	Estrogênio receptor
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GLU	Ácido glutâmico
HCC-1954	Linhagem humana de carcinoma mamário
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico
HER-2	Fator de crescimento epidérmico humano 2
MCF-7	Linhagem humana de carcinoma mamário
MCL-1	Proteína da família BCL-2
MDA-MB-231	Linhagem humana de carcinoma mamário
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mock	Nanopartícula branca
MOMP	Permeabilização da membrana mitocondrial externa
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

NOXA	Proteína da família BCL-2
NP siBCL-2	Nanopartícula híbrida CaP-PEG(GLU)- poliânion carregando siRNA <i>BCL-2</i>
NP siBCL-xL	Nanopartícula híbrida CaP -PEG(GLU)- poliânion carregando siRNA <i>BCL-xL</i>
NP siCy5	Nanopartícula híbrida CaP -PEG(GLU)- poliânion carregando siRNA marcado com cianina-5.
NP siScramble	Nanopartícula híbrida CaP -PEG(GLU)- poliânion carregando siRNA <i>scramble</i>
P53	Proteína de supressão tumoral
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PdI	Índice de polidispersão
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PKN3	Proteína cinase 3
PLK1	Serina-treonina proteína cinase 1
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR	Receptor de progesterona
PUMA	Proteína modeladora de apoptose
RIPA	Tampão de lise para radioimunoprecipitação

RISC	Complexo silenciador induzido por RNA
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	Pequeno RNA de interferência
siBCL-2	siRNA com sequência anti- <i>BCL-2</i>
siRNA- <i>BCL-xL</i>	siRNA com sequência anti- <i>BCL-xL</i>
TBS	Tampão tris-salino
TBS-T	Tampão tris-salino com tween [®] 20
TM	Domínio transmembrana
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Δ RN	Variação de sinal de fluorescência em reações de PCR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Câncer de Mama	27
1.2	Apoptose	29
1.2.1	Proteína BCL-2 propriamente dita.	33
1.2.2	BCL-xL	36
1.3	siRNA e silenciamento gênico	37
1.4	Nanopartículas Híbridas.....	40
1.5	Estado atual do uso terapêutico de siRNA em alvos antiapoptóticos.	42
2	OBJETIVOS	45
2.1	Objetivo geral.....	45
2.2	Objetivos específicos	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1	Materiais.....	47
3.2	Construção dos siRNAs	47
3.3	Cultura Celular.....	48
3.4	Preparação de nanopartículas híbridas Cap/siRNA/PEG-poliânion	49
3.5	Caracterização das nanopartículas híbridas Cap/siRNA/PEG-poliânion	49
3.5.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	49
3.5.2	Potencial Zeta das Nanopartículas Híbridas	50
3.5.3	Teste de Hemólise	50
3.5.4	Análise Morfológica das Nanopartículas Híbridas	50
3.6	Citotoxicidade	51
3.7	Análise de Apoptose	52
3.7.1	Ensaio de Anexina V-FITC	52
3.7.2	Análise de Apoptose por Microscopia Confocal de Varredura a Laser	52

3.8	Ensaios in vivo.....	52
3.8.1	Animais	52
3.8.2	Preparação dos modelos animais de tumor de mama.....	53
3.8.3	Análise da Atividade antitumoral.....	53
3.8.4	Análise de Biodistribuição.....	54
3.8.5	Análise Histopatológica	54
3.9	Avaliação in vitro e in vivo da Expressão dos Genes BCL-2 e BCL-xL	54
3.10	Quantificação de Proteínas BCL-2 e BCL-xL	56
3.11	Análise Estatística.....	57
4	RESULTADOS	58
4.1	Sequências de siRNAs	58
4.2	Nanopartículas Híbridas	60
4.3	Ensaio de Hemólise	64
4.4	Expressão do gene BCL-2, ensaios in vitro.	65
4.5	Expressão do gene BCL-xL, ensaios in vitro.....	67
4.6	Citotoxicidade.....	69
4.7	Apoptose	75
4.8	Atividade Antitumoral	79
4.9	Expressão gênica in vivo	82
4.10	Quantificação de Proteínas BCL-2 e BCL-xL extraídas dos tumores murinos.....	84
4.11	Análise histopatológica.....	85
4.12	Biodistribuição.....	87
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÕES.....	99
7	PERSPECTIVAS	100
8	REFERÊNCIAS.....	101
9	ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama

O câncer é um conjunto de várias doenças de aspecto multifatorial com severos impactos na saúde humana. Representa o maior problema mundial de saúde pública (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Estudos estatísticos e epidemiológicos o apontam como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo responsável pela morte de 8 milhões de pessoas em 2012 (FERLAY et al., 2013), vítimas de seus diversos tipos: mama, pulmão, fígado, cérebro, pele, leucemias entre outros (WHO, 2012; PENET et al., 2013). As projeções indicam um aumento de 70% no número de mortes para o ano de 2030 (ANTONI et al., 2016).

Entre estas formas de manifestações, o câncer de mama ocupa o segundo lugar em incidência mundial, representando 23% dos diagnósticos. No entanto, é o tipo de câncer mais comum entre o gênero feminino, com 1,7 milhão de novos casos diagnosticados mundialmente a cada ano (FERLAY et al., 2015). Representa também a maior causa mundial de mortalidade em mulheres (0,5 milhões/ano) (BENSON; JATOI, 2012; FERLAY et al., 2013). A idade, história familiar, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e idade tardia da primeira gravidez são fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento do câncer de mama (MCPHERSON; STEEL; DIXON, 2000).

O número estimado de novos casos anuais de câncer de mama na América do Sul é de 88,4 mil. Para efeito de comparação, o norte da África tem 28 mil novos casos/ano e a América do Norte 205,5 mil novos casos/ano (FERLAY et al., 2010). A alta incidência em países desenvolvidos é atribuída, segundo Benson & Jatoui (2012), a fatores como: estilo de vida, aspectos reprodutivos, dieta, sedentarismo e reposição hormonal, neste caso, realizado por mulheres com maior potencial econômico. Nestes países, houve declínio da mortalidade desde os anos 90 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016), relacionado principalmente com o acesso ao diagnóstico precoce. Embora haja declínio nos índices de mortalidade, isto não se observa em países menos desenvolvidos, já que a incidência de novos casos aumenta, seguida pela taxa de mortalidade. Isto porque fatores culturais de risco são incorporados mas a facilidade ao diagnóstico precoce e a terapêutica adequada não se encontram acessíveis (FERLAY et al., 2013). Corroborar para esta assertiva, o índice de sobrevivência médio, após cinco anos, de 60%

em países em desenvolvimento, contra 85% em países desenvolvidos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2014).

No Brasil, entre todos os tipos de câncer, a incidência de câncer de mama ocupa o segundo lugar no gênero feminino (58 mil novos casos/ano). É precedido apenas pelo câncer de pele não melanoma (71 mil casos novos/ano) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2015). No entanto esta prevalência não se comporta da mesma forma quando a análise é regional. Os novos casos de câncer de mama diagnosticados prevalecem sobre os demais tipos de câncer nas regiões Sudeste (69/100 mil), Sul (65/100 mil) e Centro-Oeste (48/100 mil). Na região Norte do país é o segundo tumor mais frequente (19/100 mil) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2015). Considerando os casos de câncer de mama precoce, o Brasil possui uma incidência em ascensão desde os anos 80. Esta forma de câncer de mama subiu de 6,4 para 7,8 (para cada 100.000 indivíduos) entre as mulheres de 25 – 29 anos. Para a idade entre 30 – 34 anos, a taxa de incidência teve acréscimo de 19 para 27,6 (JACOME et al., 2010). Carraro et al. (2013), em estudo sobre câncer de mama precoce no Brasil, afirma que nesta faixa etária (25 – 34 anos), o câncer é mais invasivo e requer terapias mais agressivas. No entanto, a metade dos casos diagnosticados ocorrem na faixa etária entre 59 – 60 anos (BENSON; JATOI, 2012). No Brasil, a idade segue sendo o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos de idade. Em idades acima de 50, o aumento ocorre de forma mais lenta (BRASIL. Ministério da Saúde, 2015). Entretanto, o aumento no número de casos, observados nos últimos anos, está associado à exposição aos fatores ambientais de risco (ORTEGA JACOME et al., 2010)

Uma das principais características do câncer de mama é a heterogeneidade molecular e clínica (PEROU et al., 2000). Do ponto de vista genético, pode estar relacionado com diversos genes e diferentes padrões de expressão. A história familiar de câncer de mama está relacionada a um aumento de duas a três vezes o risco de desenvolver a doença. Mutações em genes relacionados à regulação hormonal e reparos no DNA (P53, BRCA1, BRCA2) são constantemente associados à gênese da neoplasia (CARRARO et al., 2013). Os estudos que perfilaram as expressões genéticas no câncer de mama, o classificaram em subtipos distintos, conforme a expressão dos receptores celulares de estrogênio, progesterona e fator de crescimento epidérmico humano 2 (do inglês: ER-receptor de estrogênio, PR-receptor de progesterona e HER-2-receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2). São então classificados em: 1) luminal A (ER positivo, PR positivo ou negativo, HER-2 negativo), 2) luminal B (ER positivo, PR positivo ou negativo, HER-2 positivo),

3)HER-2 positivo (ER negativo, PR negativo, HER-2 positivo) e 4) triplo-negativo (ER negativo, PR negativo, HER-2 negativo) (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001).

Os vários subtipos descritos apresentam diferentes respostas teciduais e terapêuticas, relacionadas com genes de sobrevivência e morte celular (GRIMM et al., 2011). Para Donepudi et al., 2014, o desenvolvimento do câncer está claramente associado com a taxa de desequilíbrio dos mecanismos de proliferação de células e, em alguns casos, associada a uma diminuição da morte celular por apoptose.

1.2 Apoptose

O mecanismo de morte celular programada (apoptose) é crucial para a homeostasia de tecidos, cujo controle depende da ação orquestrada de vários genes pró-apoptóticos e antiapoptóticos, como os genes que pertencem à família BCL-2 (THOMAS et al., 2013). Esta família de genes têm sido investigada há anos devido ao papel das proteínas na regulação da apoptose e a importância para a tumorigênese e terapêutica contra o câncer (YOULE; STRASSER, 2008).

A proteína BCL-2 foi originalmente descrita em 1985 (TSUJIMOTO et al., 1985) e desde então outras proteínas com propriedades reguladoras de apoptose foram identificadas, resultando atualmente na família BCL-2. Trata-se portanto de um conjunto de proteínas que inibem ou promovem a apoptose, desempenhando um papel crucial na manutenção tecidual, morte celular programada durante o desenvolvimento e na defesa contra patógenos (REED, 1998). Apresentam localização subcelular diversa, podendo algumas delas serem encontradas no citosol, mas a maioria ancorada em membranas, como a mitocondrial externa, retículo endoplasmático e membrana nuclear (NGUYEN et al., 1993; YOULE; STRASSER, 2008).

As proteínas da família BCL-2 compartilham segmentos de homologia de seqüências, referenciados como domínios BH, conferindo-as a mesma conformação tridimensional. Os domínios BH são blocos alfa-helicoidais que medeiam interações entre proteínas, de modo que cada membro da família dimeriza com outro de forma BH-específica (CHITTENDEN et al., 1995). Cada proteína da família BCL-2 exibe até quatro domínios (CZABOTAR et al., 2014). Em relação a esses domínios, três grupos são categorizados: Grupo 1, multidomínio, atuam na promoção da apoptose (efetores) como BAX, BAK e BOK. Grupo 2, multidomínio, pró-sobrevivência (guardiões) incluindo as proteínas BCL-2 (propriamente dita), BCL-xL, Bcl-W, MCL-1, A-1 e BCL-B. O grupo

3 expressa apenas o domínio BH-3, compreendendo proteínas pró-apoptóticas como: BID, BAD, BIK, BIM, BMF, NOXA e PUMA (Figura 1). A inibição das atividades apoptóticas por membros pró-sobrevivência ocorre através da ligação a membros pró-apoptóticos produzindo homo e heterodímeros (YOULE; STRASSER, 2008; CZABOTAR et al., 2014).

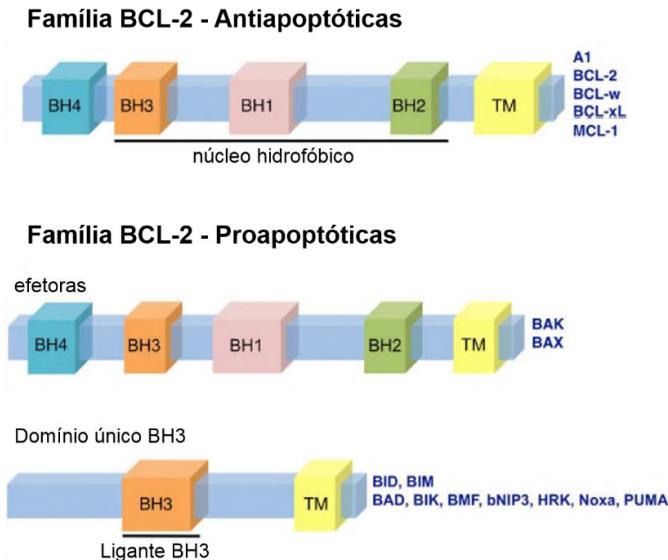


Figura 1 – Família de proteínas BCL-2. Adaptado de ANVEKAR et al., 2011. (BH = Domínio de homologia; TM = Domínio transmembrana).

Deste modo, as proteínas de domínio único BH-3 funcionam como mediadores e sensores de estresse celular através de duas ações: inativando os membros da família BCL-2 de sobrevivência e ativando os membros pró-apoptóticos como proteínas BAX e BAK. Tais eventos ocorrem simultaneamente alterando a permeabilidade da membrana externa mitocondrial (MOMP) (GROSS, 2016). Esta alteração na permeabilidade da MOMP conduz à liberação de citocromo c do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol (WOLTER et al., 1997; ZHOU; YANG; XING, 2011). Este fenômeno promove a ativação da caspase 9 pela ligação com a proteína APAF-1 (reguladora alostérica) com consequente ativação de outras caspases efetoras, desencadeando a apoptose (LI et al., 1997). A ativação das caspases é um mecanismo rápido e irreversível sem ponto de retorno para a sobrevivência celular

(Figura 2) (BEEKMAN; HOWELL, 2015). Quando a apoptose não é adequadamente mediada, mutações ocasionais podem ser acumuladas, desencadeando a tumorigênese (SAFE, 2005; KIRAZ et al., 2016).

O papel chave das proteínas da família BCL-2 na determinação do destino das células exigiu um esforço intenso para entender os mecanismos de ação com o objetivo de intervenção terapêutica. Estudos mostraram funções importantes para os domínios BH-3, de forma que a modificação covalente de peptídeos BH3 está sendo usada para restringir conformacionalmente sua ação ou para melhorar a estabilidade proteolítica in vivo, explorando novas potencialidades em tratamentos contra o câncer (RAUTUREAU; DAY; HINDS, 2010).

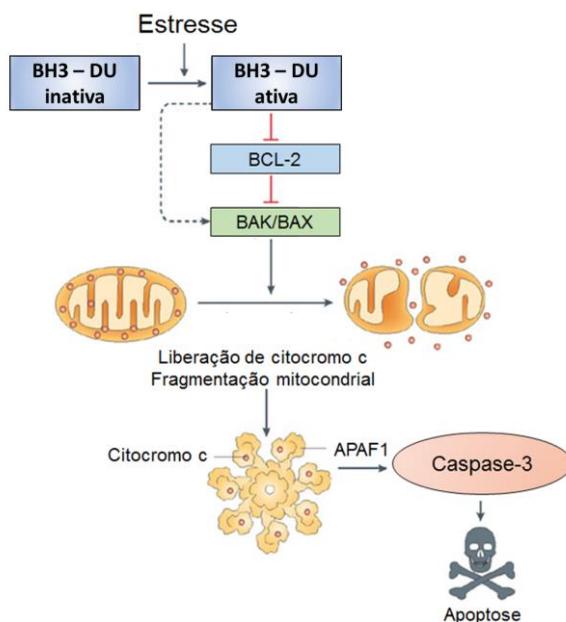


Figura 2 – Via intrínseca de apoptose. O sinal para a apoptose depende da ação das proteínas BAK ou BAX, que são moduladas pela proteína BCL-2. BH3-DU=domínio único. (Adaptado de (YOULE; STRASSER, 2008)

No cenário da manutenção tecidual das mamas, as proteínas da família BCL-2 desempenham um papel fundamental sobre as células epiteliais, frente a dinâmica tecidual responsiva a hormônios em diferentes fases da vida da mulher. A morte celular programada predomina, por exemplo, durante o período de desmame e na involução

lobular na menopausa, em que as vias intrínsecas de apoptose são mediadas pela família BCL-2. Em contraste, a ação orquestrada destas proteínas promove a proliferação celular superando a taxa de apoptose durante os períodos de puberdade e gravidez (WILLIAMS; COOK, 2015). Tal dinâmica tecidual, principalmente em resposta hormonal, tem implicações no desequilíbrio que impele o tecido mamário normal rumo à tumorigênese. Tumores como o de mama podem originar-se justamente da “tomada de decisões” por parte das células, quanto à sobrevivência, quiescência e reparação de danos ou morte (TYSON et al., 2011).

No contexto do câncer, os membros pró-apoptóticos são caracterizados como executores de apoptose, atuando como supressores tumorais enquanto os membros pró-sobrevivência são tidos como inibidores de apoptose, atuando como oncoproteínas (CZABOTAR et al., 2014; UM, 2015). Entre os membros antiapoptóticos, destaca-se os genes *BCL-2* e *BCL-xL*, cuja expressão resulta nas respectivas proteínas mitocondriais, promotoras da sobrevivência celular por mecanismos inibidores de apoptose. No âmbito da sobrevivência celular de células tumorais, o gene *BCL-2* é descrito como superexpresso em 50-70% de todos os tipos de câncer (TEKEDERELI et al., 2013). Ainda, a expressão aumentada de proteínas antiapoptóticas tais como como a *BCL-2* e *BCL-xL* estão frequentemente relacionadas aos mecanismos de resistência à quimioterapia, reduzindo o potencial terapêutico dos fármacos. De fato, a fuga da apoptose é descrita como uma via típica de resistência à quimioterapia, sem relação com a bomba de efluxo, diminuindo a sensibilidade do tumor ao quimioterápico (CHEN et al., 2014).

A resistência a quimioterapia atribuída aos genes antiapoptóticos da família BCL-2 pode ocorrer de forma inata ou adquirida (WILLIAMS; COOK, 2015). O fato é que a efetividade da maioria dos quimioterápicos dependem da atividade apoptótica (FOX; MACFARLANE, 2016). Como exemplo, um dos fármacos mais utilizados na terapêutica contra o câncer de mama é o tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio. Estudos de resistência tumoral a este fármaco apontam para entre outros fatores, a ação antiapoptótica mediada pelas proteínas BCL-2 e BCL-xL (VIEDMA-RODRÍGUEZ et al., 2014). Para estes autores, o tratamento endócrino do câncer de mama ER-positivo com tamoxifeno é a primeira estratégia terapêutica. No entanto, uma proporção substancial de pacientes, apesar de serem ER-positivos, são potencialmente resistentes ou desenvolverão resistência ao fármaco durante o curso da terapêutica.

1.2.1 Proteína BCL-2 propriamente dita.

A proteína antiapoptótica BCL-2 apresenta-se tipicamente ancorada à membrana mitocondrial externa por um domínio C-terminal hidrofóbico transmembrana, tendo a maioria dos aminoácidos voltados ao citosol (NGUYEN et al., 1993). O gene de pró-sobrevivência *BCL-2* foi o primeiro regulador apoptótico descrito (TSUJIMOTO et al., 1984) e o primeiro proto-oncogene associado à tumorigênese por ação sobre a vida útil da célula e efeitos na regulação da proliferação celular (REED, 1998). A importância do gene *BCL-2* no desenvolvimento embrionário normal foi descrito por VEIS et al. (1993) que observou que em modelos nocautes murinos, a deleção deste gene produz fenótipos com rins policísticos (letais durante as primeiras seis semanas de vida). A deleção do gene produz também envelhecimento precoce e linfopenia (YOULE; STRASSER, 2008).

No desenvolvimento mamário, prioritariamente durante a puberdade e gravidez, a proteína BCL-2 atua inibindo a apoptose durante a formação dos botões terminais dos ductos mamários. Isto permite a proliferação das células terminais e consequente invasão pelos ductos no estroma circundante. Em contrapartida, a redução na expressão de *BCL-2*, resulta na canalização dos ductos, garantindo a formação do lúmen (Figura 3) (HUMPHREYS et al., 1996; WILLIAMS; COOK, 2015).

A descrição do gene *BCL-2* como um proto-oncogene deve-se aos pontos de ruptura de translocações cromossômicas t(14,18) em linfomas de células B (REED, 1998). Adicionalmente à alteração cromossômica, o gene *BCL-2* pode ser modificado de forma transcricional, fato que aumenta sua importância no contexto do câncer (THOMAS et al., 2013). Isto porque a flexível extremidade C-terminal contém aminoácidos hidrofóbicos cuja modificação pós-transcricional permite a inserção em uma diversidade de membranas celulares, como membrana mitocondrial, cariomembrana e retículo endoplasmático (KRAJEWSKI et al., 1993). A expressão do gene *BCL-2* já foi descrita para o câncer hematopoiético humano e para outros tipos de câncer, como rins, cérebro, mama, próstata, pulmão, bexiga e estômago, sempre associado ao progresso clínico agressivo e ao mau prognóstico (SHIMIZU et al., 2004; COTTER, 2009; JUIN et al., 2013; THOMAS et al., 2013).

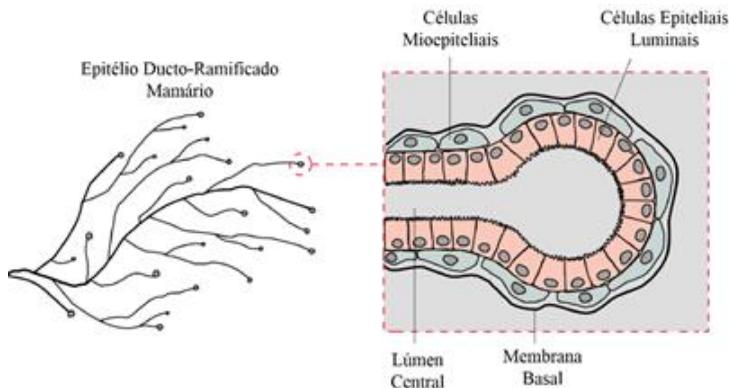


Figura 3 – Unidade de alvéolo mamário. A relação espacial precisa das células envolvidas não é constante e muda em função do estado hormonal e reprodutivo, orquestrado pelo balanço entre a taxa de proliferação e morte por apoptose. (Adaptado de RADISKY; HIRAI; BISSELL, 2003).

Especificamente para o câncer de mama, a expressão aumentada do gene *BCL-2* é descrita para 75% entre todos os subtipos. Ao considerar apenas os subtipos luminais, este valor atinge 85%, tornando a proteína *BCL-2* como um proeminente marcador de prognóstico. De fato, as maiores expressões do gene *BCL-2* correlacionam-se com fatores como: graduação do câncer de mama (escore) e subtipo em relação aos receptores hormonais (HONMA et al., 2015), como pode ser observado na Tabela 1.

Adicionalmente, a progressão para a metástase de tumores dependentes de hormônio está fortemente relacionada com a desregulação do mecanismo apoptótico, como o exemplo do câncer de próstata hormônio-refratário (subtipo que não responde mais à terapia hormonal) que apresenta superexpressão do gene *BCL-2* (CASTILLA et al., 2006).

Quando o gene *BCL-2* é superexpresso, células tumorais obtêm uma vantagem em termos de sobrevivência sob situação de estresse. Para JUIN et al. (2013) elas podem ser dependentes deste processo, opondo-se a sinais de apoptose enquanto o tumor progride. Além do fato de que a proteína *BCL-2* é comprometida com a inibição apoptótica para vários tipos de câncer, a expressão de *BCL-2* aumenta a resistência contra a radiação e a quimioterapia, como foi provado em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (WELLER et al., 1995; REZAEI ARAGHI; KEATING, 2016).

Tabela 1 – Relação entre a expressão de *BCL-2* e fatores clínico-patológicos de pacientes femininos de câncer de mama. Adaptado de HONMA et al., 2015.

Fatores	Expressão de <i>BCL-2</i> (Número de Pacientes)	
	+	-
<u>Grau</u>		
II + III	244 (54)	205
I	157 (86)	26
<u>ER</u>		
+	330 (88)	45
-	71 (28)	186
<u>PR</u>		
+	242 (89)	30
-	159 (44)	200
<u>HER2</u>		
+	19 (21)	70
-	381 (70)	160

Diante deste cenário, observa-se a necessidade de abordagens terapêuticas que substituam ou complementem as estratégias atuais, no sentido de reduzir o aparecimento da resistência múltipla contra a quimioterapia padrão (SUO et al., 2017). Assim, modificações na expressão do gene *BCL-2* relacionadas com a tumorigênese, oportuniza-o como possível alvo para a ação de fármacos a serem explorados de forma terapêutica (YIP; REED, 2008). Há crescentes evidências que sugerem que esta proteína é um alvo terapêutico efetivo contra muitos tipos de câncer (HONMA et al., 2015).

1.2.2 BCL-xL

A proteína BCL-xL é encontrada tipicamente incorporada à membrana mitocondrial externa (JEONG et al., 2004) e está diretamente relacionada à promoção da recuperação mitocondrial após os danos ocasionados por estresse oxidativo (GOTTLIEB; VANDER HEIDEN; THOMPSON, 2000). Tal como descrito para a proteína BCL-2, a ação da proteína BCL-xL se opõe ao mecanismo pró-apoptótico desencadeado por proteínas como as BAX e BAD, evitando assim a liberação citosólica de citocromo c com a consequente manutenção da permeabilidade da membrana mitocondrial (OTHMAN et al., 2013). Motoyama et al. (1995) descreveram o papel da proteína BCL-xL como fundamental no desenvolvimento normal de eritrócitos fetais murinos, assim como na participação no desenvolvimento neuronal nestes modelos. A supressão de BCL-xL resulta em 100% de morte embrionária até o 14º dia de desenvolvimento (YOULE; STRASSER, 2008). Estudos também revelaram o que foi descrito como “funções noturnas” da proteína BCL-xL: esta foi associada à retrotranslocação de proteínas pró-apoptóticas, como a BAX, da membrana mitocondrial para o citosol, agindo mesmo na ausência de sinais apoptóticos (EDLICH et al., 2011). Esta proteína pode estar trabalhando como sensor metabólico e/ou mensageiro que entra e sai das mitocôndrias para avaliar o citosol e fornecer às mitocôndrias informações metabólicas atualizadas (GROSS, 2016), remanescente da teoria endossimbiótica (EMBLEY; MARTIN, 2006).

Na dinâmica tecidual mamária, a proteína BCL-xL desenvolve papel importante por reduzir a apoptose na involução da glândula durante o desmame (WALTON et al., 2001). O desmame consiste no processo de dois passos que envolve a morte do epitélio secretório e sua substituição por adipócitos. Durante a primeira fase, a remodelação é inibida e as células apoptóticas podem ser vistas no lúmen alveolar. Na segunda fase, a apoptose é acompanhada por remodelação do estroma circundante e rediferenciação dos adipócitos (WATSON, 2006).

A descrição do gene *BCL-xL* como oncogene ocorreu em 1993 (BOISE et al., 1993). O aumento da expressão do gene *BCL-xL*, assim como os níveis diminuídos de expressão do gene *BAX* exibem uma correlação positiva com o crescimento descontrolado de células tumorais (SHARIFI et al., 2015). Yosef et al. (2016) encontraram forte evidência de aumento de expressão do gene *BCL-xL* em células senescentes formadas em resposta ao estresse oncogênico (como ativação da proteína p53). Os autores associaram a longevidade destas células à resistência aos

sinais apoptóticos e demonstraram que a inibição proteica de BCL-xL resultou em morte destas células senescentes.

É conhecido que o gene *BCL-xL* está superexpresso em diversos carcinomas, como o urotelial do trato urinário superior (YOSHIMINE et al., 2013; VAN KESSEL et al., 2015), colorretal (KRAJEWSKA et al., 1996a), mieloma (TU et al., 1998) e próstata (KRAJEWSKA et al., 1996b). Neste último, o gene está fortemente relacionado com pontuações altas na escala de Gleason (avaliação histopatológica de biópsia, em que pontuações altas são indicativos de mau prognóstico) (BOECKING; SINAGOWITZ, 1980; CASTILLA et al., 2006). Especificamente para o câncer de mama, estudos realizados por Olopade et al. (1997), em humanos, sugerem que a expressão da proteína BCL-xL é aumentada em uma fração significativa de tumores de mama invasivos. Estes autores apontam a proteína BCL-xL como um potencial marcador de progressão tumoral.

Os estudos de silenciamento de genes *BCL-xL* mostraram ser relevantes não só para o efeito pró-apoptótico *per se*, mas também relacionados à fuga de apoptose que as células tumorais exibem na presença de certos fármacos. Como exemplo, os repressores de MCL-1, (outra proteína da família BCL-2 com atividade antiapoptótica), que são frequentemente usados na terapia antitumoral. A eficácia dos fármacos é reduzida pela superexpressão do gene *BCL-xL* (WEI et al., 2012). Na verdade, estes autores demonstraram que a alta expressão de *BCL-xL* confere resistência à repressão do gene *MCL-1*, exaltando a importância de terapias combinadas com o silenciamento do gene *BCL-xL*. Por suprimir a apoptose e induzir a quimiorresistência, a proteína BCL-xL é então elegível como uma molécula chave para a terapia contra o câncer e transpor a barreira de resistência aos fármacos (KOJIMA et al., 1998; SHARIFI et al., 2015).

Neste contexto, uma estratégia para utilizar estes genes antiapoptóticos como alvos terapêuticos, inclusive como possibilidade de superar a resistência aos quimioterápicos, pode estar na supressão dos mesmos, e o uso do siRNA (do inglês: pequeno RNA de interferência) é apresentado como uma opção promissora para atingir este objetivo. (CHEN et al., 2014)

1.3 siRNA e silenciamento gênico

Na última década, houve um amplo aumento na compreensão dos RNAs de interferência. O potencial de silenciamento gênico os torna uma abordagem notável para a terapêutica contra o câncer (PECOT, 2011).

Atuando ostensivamente sobre o genoma e o transcriptoma, os RNAs de interferência estão naturalmente envolvidos na maioria dos processos biológicos, incluindo os relacionados com a sobrevivência e controle de morte celular. Entre os RNAs de interferência, estão os siRNAs, que apresentam tamanho de 20 a 23 nucleotídeos e são relacionados com o controle de expressão gênica quando associado à família de proteínas Argonauta (YOULE; STRASSER, 2008). Esta associação entre a proteína Argonauta e o siRNA forma o complexo RISC (do inglês, complexo silenciador induzido por RNA), que, contendo a sequência de RNA antisense, procura o emparelhamento específico com o RNA mensageiro (RNAm) alvo, mediando a respectiva clivagem por endonucleases (Figura 4). Esta ação resulta, de forma pós-transcricional, na modulação da expressão do gene alvo (BERNSTEIN et al., 2001; AMERES; MARTINEZ; SCHROEDER, 2007; KOBAYASHI; TOMARI, 2016).

Esta interferência pós-transcricional específica é considerada uma ferramenta promissora para o uso em terapia de doenças que apresentam genes superexpressos (BERNSTEIN et al., 2001; KIM; ROSSI, 2007; ZUCKERMAN; DAVIS, 2015). Frente a este potencial controle da expressão do gene por siRNA, a aplicação desta estratégia no silenciamento de genes chave no câncer têm mostrado resultados terapêuticos promissores. Por exemplo, Tekedereli et al. (2013) utilizando lipossomas para carrear siRNA, observaram o silenciamento do gene *BCL-2* em células de câncer de mama. Este silenciamento provou ser eficaz *in vivo* e *in vitro*, tanto na inibição do crescimento do tumor quanto no aumento da efetividade da quimioterapia padrão. Em outro estudo, o silenciamento do gene *BCL-xL* por siRNA foi descrito como eficaz em promover a morte de células tumorais de pulmão, neste caso relacionada com a desregulação de um micro-RNA (miRNA) envolvido neste tipo de câncer (OTHMAN et al., 2013).

Apesar do potencial terapêutico, o uso de siRNA enfrenta algumas barreiras a serem superadas. A aplicação é geralmente prejudicada pelas propriedades moleculares intrínsecas do ácido nucleico, tais como alta massa molar (~ 13 kDa) e propriedades aniônicas (SAAD; GARBUZENKO; MINKO, 2009). Estas propriedades tornam as moléculas de siRNA incapazes de entrar passivamente nas células alvo (QIU et al., 2016). Além disso, as moléculas de siRNA apresentam imunogenicidade alta (DE FOUGEROLLES et al., 2007), excreção renal rápida (WATER et al., 2006) e suscetibilidade à degradação por ação de endonucleases séricas (TURNER et al., 2007).

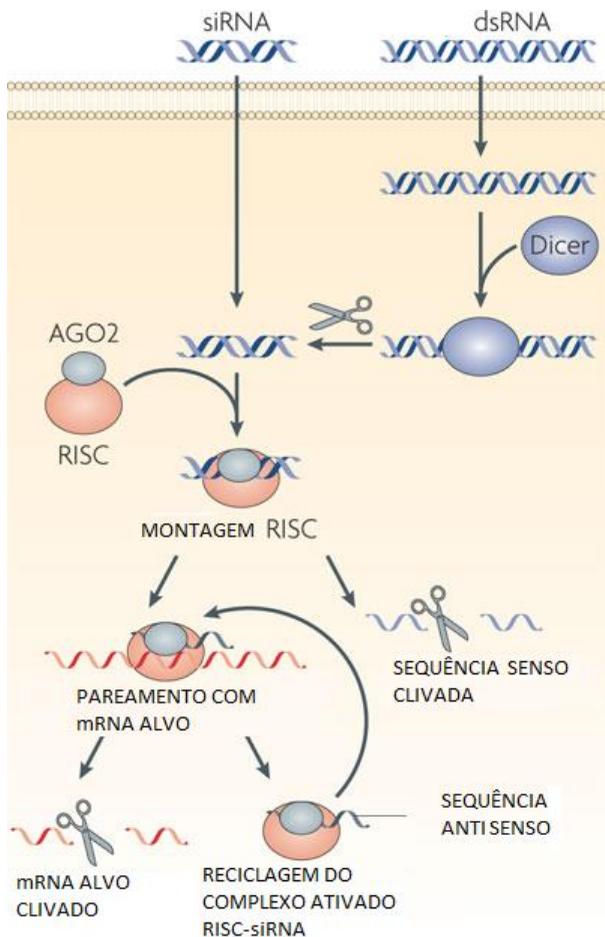


Figura 4 – Mecanismo de ação do pequeno RNA de interferência (siRNA). Após o pareamento específico do siRNA com o RNAm alvo, este é clivado, culminando na interrupção da expressão gênica. RISC= complexo silenciador induzido por RNA, ds = dupla fita, siRNA = pequeno RNA de interferência (Adaptado de JONES, 2009).

Neste sentido, a falta de um sistema de entrega adequado para as moléculas de siRNA tem sido identificada como um obstáculo importante neste tipo de terapia (ZHANG; KATAOKA, 2009; KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012; SUN et al., 2012). Várias estratégias têm sido

utilizadas para superar estas dificuldades, incluindo o desenvolvimento de nanovetores com diferentes materiais, combinando lipossomas, polímeros e materiais inorgânicos que garantem maior capacidade de carga, eficácia de entrega e menores efeitos secundários (LIAO et al., 2016). Além da necessidade de superar estas barreiras, é essencial promover a transfecção utilizando vetores biocompatíveis, minimizando os efeitos indesejáveis causados pelos constituintes do carreador. Isto porque alguns vetores, incluindo micelas poliméricas, lipossomas catiônicos, nanopartículas inorgânicas, entre outros, estão frequentemente associados a uma toxicidade significativa, parte devido à superfície carregada positivamente para absorção eletrostática de siRNA, parte devido ao próprio constituinte do vetor (QIU et al., 2016). Neste contexto, o uso de nanopartículas combinadas com materiais inorgânicos e orgânicos (nanopartículas híbridas) é visto como uma alternativa adequada para sobrepujar estas dificuldades.

1.4 Nanopartículas Híbridas

Entre os sistemas nanoestruturados constituídos por material inorgânico, destaca-se as nanopartículas cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP), que já se mostraram eficientes na entrega de siRNA em terapias baseadas em silenciamento gênico. O CaP vem sendo utilizado desde os anos 70, nas primeiras técnicas de transfecção de DNA viral (GRAHAM & VAN DER EB, 1973; PITTELLA et al., 2011). A propriedade amorfa deste material permite a adsorção de ácidos nucleicos, além de ser um material inorgânico sensível ao pH. Esta propriedade é particularmente útil no contexto da superação das barreiras de entrega. No pH ácido endossomal, o CaP gera um efeito similar a uma "esponja" protônica, aumentando o escape endossomal, permitindo a liberação citosólica do siRNA (MA, 2014). Devido à esta dinâmica na liberação de fármacos em pHs específicos, nanocarreadores baseados em CaP permitem uma entrega lenta e controlada, garantindo também a estabilidade no preparo em pH fisiológico (SON & KIM, 2017). Além do mais, como já é um constituinte de ossos e dentes, o CaP apresenta elevada biocompatibilidade, complementada por baixa toxicidade (ZHANG & KATAOKA, 2009). Com estas propriedades, princípios ativos carregados por nanocompostos baseados em CaP podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova geração de medicamentos com liberação celular controlada (SON; KIM, 2017). Apesar das nanopartículas inorgânicas apresentarem estas vantagens, o revestimento de nanoestruturas desta natureza por uma camada de polímero orgânico

mostra-se vantajoso sob vários aspectos: a adição de uma camada de bloco de copolímero poliânico PEG (polietilenoglicol) ao CaP aumenta a estabilidade coloidal e reduz a imunogenicidade das nanopartículas (ZHANG; LI; HUANG, 2014). Ainda, este tipo de revestimento aumenta o potencial de escape endossomal, uma vez que aumenta a atividade iônica com o conseqüente aumento da pressão osmótica no endossomo. Além do mais, a adição de revestimento orgânico permite evitar o típico crescimento rápido de cristais de CaP após a preparação de nanopartículas (maior que 1 μm), controlando o tamanho da estrutura. Este controle de tamanho é particularmente importante porque nanocarreadores inferiores a 100 nm oferecem a vantagem de acumular-se no tumor pelo efeito EPR (do inglês: aumento da permeabilidade e retenção) (ZHANG; KATAOKA, 2009; PITTELLA et al., 2011; ZHANG; LI; HUANG, 2014). O efeito EPR (Figura 5) está baseado na dinâmica da própria tumorigênese, que, frente a hipervascularização rápida, determina uma arquitetura vascular incompleta e desorganizada (rica em fenestrações) (MATSUMURA & MAEDA, 1986; MAEDA et al., 2000).

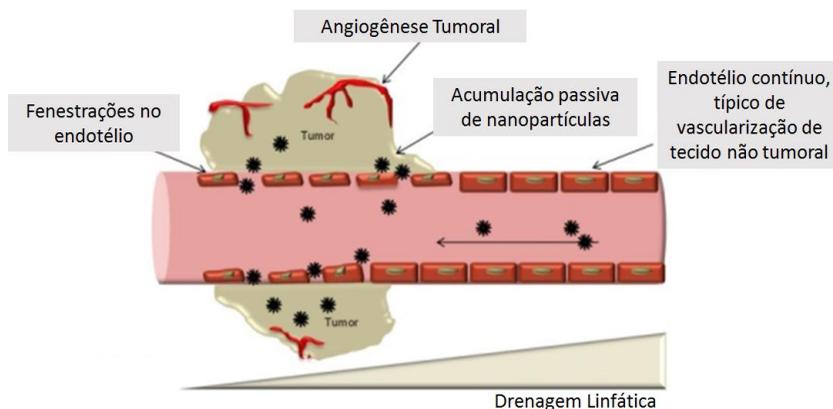


Figura 5 – Efeito EPR (aumento da permeabilidade e retenção). Acumulação passiva de nanopartículas em tumor sólido. (Adaptado de (JHAVERI & TORCHILIN, 2014))

Somados a fatores como a baixa pressão intersticial no tumor e ausência de drenagem linfática eficiente, esta dinâmica conduz à maior permeabilidade e retenção de compostos nanoestruturados em tumores sólidos (GONG et al., 2012).

Do ponto de vista estrutural, as nanopartículas híbridas (IUPAC, 1997) carregando siRNA são formadas a partir de um núcleo inorgânico de

CaP, tendo o siRNA como carga terapêutica. Apresentam o PEG como revestimento externo, conforme ilustrou Pittella et al. (2011), mostrado pela Figura 6.

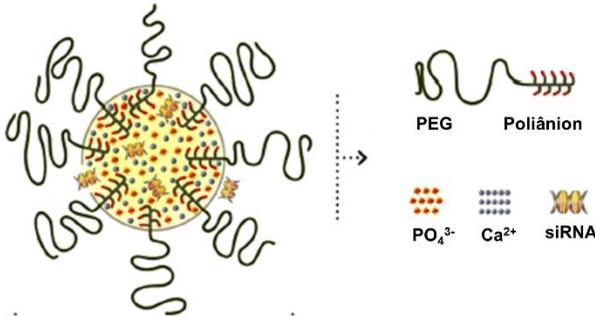


Figura 6 - Ilustração esquemática de uma nanopartícula híbrida Cap-PEG-Poliânion contendo siRNA. (Adaptado de PITTELLA et al., 2011).

Outros revestimentos têm sido utilizados para controlar o tamanho e acrescentar estabilidade a compostos nanoestruturados com núcleo de CaP. Como exemplo, o colesterol-ácido aminocaprílico-citracônico (CHOL-AA-Cit) revestindo núcleo de CaP mostrou-se eficiente em proteger moléculas de siRNA-*BCL-2* e promover transfecção, *in vitro* e *in vivo* às células de câncer de pulmão (CAI et al., 2017). A utilização de outro revestimento polimérico como o PEG-b-poli-ácido glutâmico [PEG-b-poli(GLU)] também já demonstrou propriedades adequadas para recobrir nanopartículas com núcleo de CaP, em estudo de aplicação diagnóstica (MI et al., 2016). Para Souza (2016), que testou nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion em células de câncer mama triplo-negativas, este tipo de nanocarreador é promissor para a entrega de siRNA e atua como base para novos testes, envolvendo novas modificações estruturais.

1.5 Estado atual do uso terapêutico de siRNA em alvos antiapoptóticos.

A inibição proteica por mimetizadores de domínios BH-3 tem sido a principal abordagem visando os alvos das vias intrínsecas de apoptose. No entanto, conforme demonstrado em ensaios clínicos, o antagonista oral de BCL-2, o ABT-263 (Navitoclax[®]) foi relacionado à toxicidade dependente de dose, associada à trombocitopenia. Uma investigação pré-

clínica mais aprofundada do mecanismo de morte celular em animais tratados com inibidores gerais da família BCL-2 revelou que, nas plaquetas destes animais, a BCL-xL é a proteína antiapoptótica crítica necessária para prevenir a ativação das proteínas efetoras BAK e BAX (SOCHALSKA et al., 2015), associadas ao desenvolvimento e sobrevivência destas células. Como consequência, o ABT-263 só pode ser usado em doses baixas, segundo os autores. Ainda, e paradoxalmente, os mimetizadores BH3 em doses terapêuticas podem ser oncogênicos em outros alvos. Isto porque foi demonstrado, que a iniciação incompleta da MOMP por esses agentes, conhecida como MOMP minoritária, pode resultar em transformação e tumoração dependentes de caspase, que por sua vez pode promover tumores invasivos mais agressivos (ICHIM et al., 2015). Ainda, e mais gravemente, a resistência adquirida a inibidores de BH3 está relacionada à mutações em BCL-2, induzidas pelo próprio fármaco, como demonstrado para o inibidor ABT-199 em tratamento de linfoma (FRESQUET et al., 2014). Estas premissas convergem para uso de terapia contra alvos mais específicos, já que inibidores proteicos são notoriamente promíscuos quanto aos membros de uma mesma família de proteínas, como a BCL-2. A especificidade de cada tipo de câncer quanto a superexpressão de uma ou outra proteína deve ser o fator norteador de qual alvo atingir, apontando alternativamente para a inibição transcricional, como a promovida por siRNA. Neste contexto, destaca-se uma das principais vantagens da utilização de siRNA na terapia contra o câncer: a capacidade de inibir oncogenes sem a necessidade de interferir diretamente nos produtos proteicos (LEE et al., 2016). É relevante também destacar a propriedade transitória deste tipo de silenciamento, já que os siRNAs e mesmo seus alvos RNAm são degradados no citosol após a respectiva ação.

Na terapia contra o câncer, apenas quatro formulações baseadas em silenciamento por siRNA foram estudadas em ensaios clínicos de Fase I (KIM et al., 2016). Os alvos terapêuticos foram: PKN3 em diversos tumores sólidos avançados (mama, próstata, fígado, rins, pâncreas, cólon, ovário, melanoma e esôfago) (SCHULTHEIS et al., 2014); PLK1 em câncer de mama, fígado, cólon, melanoma e pulmão (RAMANATHAN et al., 2013); VEGF e KSP em câncer de fígado (TABERNERO et al., 2013) e LMP2, LMP7 e MECL1 em melanoma metastático (PRUITT, 2014). Nenhum destes alvos estão relacionados à sobrevivência de células tumorais por ação antiapoptótica.

Embora alguns estudos *in vitro* tenham sido realizados com os genes alvo envolvidos em pró-sobrevivência, existe uma lacuna para os ensaios pré-clínicos e clínicos, apesar da importância dos genes pró-

sobrevivência no âmbito do crescimento tumoral e quimiorresistência. Esta lacuna está provavelmente relacionada com uma grande variedade de diferentes genes alvo, tornando difícil silenciar todos simultaneamente. A compreensão de cada proteína envolvida na sobrevivência ou morte, bem como suas implicações para cada tipo de câncer, possibilitará o desenvolvimento de combinações mais eficazes de compostos para silenciar genes.

A biologia de um tumor e as propriedades dos veículos de entrega estão estreitamente associadas à eficácia da terapia baseada em silenciamento gênico por siRNA (KIM et al., 2016). Além disso, veículos adequados podem garantir uma distribuição mais seletiva, seguida de bioacumulação no tumor, evitando efeitos fora das células-alvo.

Desta forma, neste estudo, foi desenvolvido um sistema nanoestruturado [CaP-siRNA-polietilenoglicol-bloco-ácido glutâmico (PEG-b-poli(GLU))] para ser testado em células de câncer de mama. O sistema foi caracterizado e o efeito silenciador dos genes antiapoptóticos *BCL-2* e *BCL-xL* pelo siRNA, combinado ou não com um agente antitumoral, foi avaliado. As análises foram realizadas em termos de resposta à apoptose, citotoxicidade (*in vitro*), atividade antitumoral e biodistribuição (*in vivo*).

Como hipóteses testadas, o sistema nanocarreador Cap-PEG-b-poli(GLU)-Poliânion pode demonstrar capacidade de entrega de siRNA às células tumorais. Os siRNAs para *BCL-2* e *BCL-xL* podem promover, *in vitro*, o silenciamento dos genes e induzir à morte as células de câncer de mama por apoptose. Estas formulações podem exibir, ainda, ação antitumoral em modelo de carcinoma mamário murino.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um agente de transfecção de siRNA e avaliar a efetividade do silenciamento dos genes antiapoptóticos *BCL-2* e *BCL-xL* em câncer de mama *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenhar e/ou selecionar as sequências de siRNAs para promover o silenciamento dos genes *BCL-2* e *BCL-xL*;
- Sintetizar e caracterizar as nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion quanto ao tamanho, potencial zeta, aspecto estrutural e estabilidade em diferentes soluções de uso;
- Analisar, em cultura de células de câncer de mama, a citotoxicidade das formulações desenvolvidas;
- Testar o efeito apoptótico das formulações;
- Testar o efeito das formulações em incubações combinadas com doxorrubicina;
- Quantificar, *in vitro*, a transfecção dos siRNAs através do silenciamento dos genes *BCL-2* e *BCL-xL*, bem como o teor das respectivas proteínas após incubações com as formulações;
- Verificar a efetividade das formulações *in vivo*, avaliando potencial de inibição do crescimento tumoral, biodistribuição e silenciamento gênico em modelo tumoral murino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

As sequências de siRNA utilizadas neste estudo, os oligonucleotídeos iniciadores, doxorubicina, DAPI (4',6-diamidino-2-fenillindol), MTT [3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], Azul de Tripán, os inibidores de protease: leupeptina, aprotinina, pepstatina e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e os padrões de peso molecular para eletroforese de proteínas (Full Range RPN800E) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil. Os reagentes utilizados em cultura celular e a tripsina foram adquiridos junto à Cultilab. A aquisição do citrato de sódio, dimetil sulfóxido (DMSO), álcool metílico, álcool etílico, álcool propílico, Tween[®] 20 e Triton-X100[®] ocorreu através da Vetec; Os sais: Na₃PO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂ e NaCl, o dodecil sulfato de sódio (SDS) e os tampões TRIS (2-Amino-2-hydroximetilpropano-1,3-diol) e HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico] foram adquiridos da Synth. O kit anexina V-FITC e os ultrafiltros Amicon foram adquiridos da Millipore; A albumina sérica bovina (ASB) e o fenol-clorofórmio (Trizol[®]) foram adquiridos da Invitrogen; A enzima DNase, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e o kit *high capacity-cDNA Reverse Transcription* foram adquiridos da Applied Biosystems; O kit *Power SYBR-Green PCR Master Mix* foi adquirido da Thermo Scientific Inc; O polímero PEG-Poliânion metoxi-poli (etileno glicol) - (L-ácido glutâmico) [PEG-b-poli(GLU)] foi adquirido através da empresa Alamanda Polymers Inc. Os anticorpos primários monoclonais (coelho) BCL-2, BCL-xL e β -actina, bem com o anticorpo secundário (cabra) conjugado à peroxidase foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology. O Amersham ECL[®] foi adquirido da GE Healthcare. O kit para dosagem de hemoglobina livre foi adquirido da Bioclin.

3.2 Construção dos siRNAs

As sequências oligonucleotídicas de siRNAs foram desenhadas tendo como referência os genes *BCL-2* e *BCL-xL* humanos e murinos para serem incorporadas aos nanocarreadores. Com a sequência completa do transcrito primário (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, acessado em 11/12/2013) de cada gene, os exons foram mantidos e os introns excluídos. A forma final, que representou o RNAm maturado, foi o alvo do siRNA. A sequência complementar ao RNAm foi escolhida de acordo

com os critérios propostos por REYNOLDS et al. (2004). Assim, foi mantido a percentual 35-60% de Guanina-Citosina, objetivando a garantia de estabilidade devido ao maior número de ligações de hidrogênio entre tais bases nitrogenadas. Evitou-se também a repetição de 4 ou mais nucleotídeos. Ainda seguindo os critérios destes autores, os alvos devem estar localizados a 50-100 nucleotídeos após o códon de início.

Aspectos como energia potencial termodinâmica, que favorece a formação de *hairpins* e outras formas de autodímeros foram rigorosamente considerados, aplicando a ferramenta Oligoanalyzer[®]. As sequências de siRNA foram desenhadas para que o pareamento dos locais de clivagem (entre os nucleotídeos 11 e 12 da fita antisense) estivessem localizados na porção inicial (30%) da sequência do RNA mensageiro maturado (ELBASHIR et al., 2001). As sequências obtidas não deveriam apresentar homologies com outros genes, evitando-se assim pareamentos inespecíficos. Da mesma forma o siRNA foi desenhado de forma a parrear com as variantes de RNAs resultantes de possíveis *splicings*. Assim, foi realizada uma pesquisa de homologia das sequências desenhadas para cada gene, através da ferramenta *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* de nucleotídeos (*National Center for Biotechnology Information - NCBI*).

Especificamente para o siRNA do alvo *BCL-2*, foi utilizada a sequência desenhada e aplicada por Tekedereli et al. (2013) que abrange pareamento com o transcriptoma humano e murino. Como controle negativo de silenciamento, utilizou-se uma sequência não pareável (*scramble*), amplamente descrita na literatura (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004).

3.3 Cultura Celular

As linhagens celulares de câncer de mama humano, MCF-7 (ER +, PR +/-, HER2-), MDA-MB-231 (ER -, PR -, HER2-), HCC-1954 (ER-, PR -, HER2+) e a linhagem celular humana não tumoral HUVEC foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (códigos BCRJ: 0162, 0392, 0280 e 0345, respectivamente). As células foram cultivadas em RPMI-1640 (Gibco[®]) e suplementadas com 10% (v / v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U / ml), estreptomicina (100 µg / mL) e 10 mM de tampão HEPES. As células foram cultivadas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 ° C. Para o modelo animal de câncer de mama (ensaios *in vivo*) foram utilizadas as células da linhagem de carcinoma de mama murino 4T1 (ER-, PR-, HER2-), obtidas do

banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ: 0022). Esta linhagem foi mantida em cultura nas mesmas condições descritas previamente para as outras linhagens tumorais. Os experimentos foram sempre realizados durante a fase de crescimento exponencial das populações celulares.

3.4 Preparação de nanopartículas híbridas Cap/siRNA/PEG-b-poli(GLU)-poliânion

As nanopartículas híbridas foram preparadas em gabinete de fluxo laminar por automontagem dos constituintes, como descrito por Kakizawa, Furukawa e Kataoka (2004) com pequenas modificações. Inicialmente, uma solução de CaCl_2 (2,5 M) foi adicionada a uma solução de siRNA 15 mM em tampão TRIS-HCl 10 mM (pH 10) (solução A). Outra solução contendo PEG-b-poli(GLU) (400 μg / mL) foi misturada com uma solução de tampão HEPES 50 mM (pH 7,4) contendo Na_3PO_4 (1,5 mM) e NaCl (140 mM) (solução B). A solução A foi então misturada com a solução B para a obtenção de uma concentração final de 2,25 μM de siRNA. Devido às interações eletrostáticas, os componentes são automontados para a complexação do siRNA (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004), originando as formulações: nanopartículas carregadas com siRNA *BCL-2* (NP siBCL-2), siRNA *BCL-xL* (NP siBCL-xL), siRNA *Scramble* (NP siScramble) e siRNA marcado com cianina-5 (NP siCy-5). Os sistemas nanoestruturados formados foram caracterizados quanto à morfologia, potencial zeta e tamanho. Visando os ensaios *in vivo*, as soluções originadas foram purificadas utilizando ultrafiltros (4 kDa) Amicon® (centrifugação à 3000×g, 30 min, 4° C) e ressuspensas em solução salina.

3.5 Caracterização das nanopartículas híbridas Cap/siRNA/ PEG-b-poli(GLU)

3.5.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para medir a distribuição de tamanho, imediatamente após a preparação, as formulações foram diluídas em tampão TRIS 10 mM (pH 10) 1:10 (v/v) ou meio RPMI 1:10 (v/v) e analisadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medidas dinâmicas de espalhamento de luz (DLS) foram realizadas a 25°C em um ângulo de detecção de 173° com um laser He-Ne (633nm) como feixe incidente. Os diâmetros específicos e os índices de polidispersão (PdI) foram obtidos a partir da taxa de decaimento na

função de correlação de fótons e analisados com um método cumulativo. Histogramas foram montados para apresentar a distribuição populacional baseada no tamanho médio das nanopartículas.

3.5.2 Potencial Zeta das Nanopartículas Híbridas

As suspensões contendo as nanopartículas (Tris, 1:10 v/v) foram avaliadas quanto ao potencial zeta, através do equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), com um potencial estabelecido de ± 150 mV. A carga superficial das nanopartículas foi estimada pelas medidas de mobilidade eletroforética e o potencial zeta foi calculado medindo a velocidade de migração usando a equação de Smoluchowski, através do software Zetasizer versão 7.03.

3.5.3 Teste de Hemólise

A fim de verificar uma potencial e prejudicial hemólise induzida pelas nanopartículas, a formulação NP siScramble foi testada quanto à este parâmetro. Para tanto procedeu-se com a coleta de sangue de indivíduo saudável por punção venosa. O sangue foi acondicionado em tubos contendo 3,2% de citrato de sódio. Estas amostras foram centrifugadas ($200 \times g$; 5 min.) e posteriormente lavadas 3 vezes com solução salina. Os eritrócitos correspondentes a 1 mL de sangue foram ressuspenso em 10 mL de solução salina para formar a solução de eritrócitos.

Após a adição de salina (controle negativo) e NP siScramble (1%, 4% e 8%) às soluções de eritrócitos, a porcentagem de hemólise foi avaliada pela dosagem de hemoglobina livre no soro, usando o *kit* de detecção (Bioclin), de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Para tanto, as soluções testadas foram incubadas à 37 °C por 1 hora em agitação e a hemólise avaliada. Como controle positivo uma alíquota de água foi adicionada à suspensão de eritrócitos. O controle positivo foi considerado 100 % de hemólise.

3.5.4 Análise Morfológica das Nanopartículas Híbridas

Para a análise morfológica, as imagens das formulações NP siBCL-2 e NP e BCL-xL foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando o equipamento JEM-1011 (Jeol Ltd., Tóquio, Japão) operado com voltagem de aceleração de 80 kV. Inicialmente, foram depositados 2 μ L da suspensão de nanopartículas,

diluídas em tampão TRIS 10 mM pH 10 (1:10 v/v) ou meio RPMI (1:10 v/v) em grades de níquel (malha 200 *mesh*) Parlodion® (CF200-Ni EMS) revestido com carbono amorfo. Procedeu-se então com a secagem das amostras durante 24 h à temperatura de 25° C. Para a análise da morfologia, o microscópio foi operado em modo de campo brilhante com uma ampliação até 50.000 vezes. As séries de imagens foram analisadas usando o software ImageJ®.

3.6 Citotoxicidade

A viabilidade celular em resposta às formulações nanoestruturadas e à doxorrubicina (DOX) foi avaliada utilizando o ensaio de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] (MOSMANN, 1983). Primeiramente, as células humanas de câncer de mama MCF-7 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células por poço, em confluência de 90% e incubadas em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 h) com as formulações contendo siRNA nas concentrações de 50, 100 e 200 nmol/L. Para avaliar a resposta das células à doxorrubicina com e sem o silenciamento dos genes alvos, estas foram incubadas com meio contendo de 0,5 a 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ do fármaco e 200 nmol/L das formulações contendo siRNA durante 72 h. Células incubadas apenas com meio de cultura foram consideradas como controles. Após a incubação, os meios de cultura foram removidos e 100 μL de DMSO foram adicionados a cada poço para dissolver os cristais. Após homogeneização dos cristais em agitador orbital por 5 min, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas Microwell Systems® (Organon, Teknika) a 540 nm para determinar a concentração de formazam púrpura, diretamente proporcional à viabilidade celular. A densidade óptica das células controle foi considerada como equivalente a 100% de viabilidade e nas demais condições de incubação este índice foi calculado proporcionalmente.

Com a finalidade de avaliar a seletividade das formulações sobre as células tumorais, a citotoxicidade produzida nestas células foi comparada com a citotoxicidade produzida em uma linhagem não tumoral. As condições de cultura e incubações foram as mesmas utilizadas para as células tumorais. O índice de seletividade (POPIŃKIEWICZ et al., 2005) foi obtido pela relação entre os valores de área sobre a curva de células não tumorais e os valores obtidos de células tumorais .

3.7 Análise de Apoptose

3.7.1 Ensaio de Anexina V-FITC

A ocorrência de apoptose foi avaliada pela coloração de anexina V-FITC (BD Biosciences, EUA) (VERMES et al., 1995). Para tanto, células MCF-7 foram cultivadas em placas de 12 poços (250×10^3 células/poço) nas condições de cultura descritas anteriormente. Após 24 h de incubação com NP siBCL-2 ou NP siBCL-xL, foi adicionado $0,5 \mu\text{M}$ de doxorrubicina ao meio, seguido de incubação por mais 48 h. Esta incubação inicial com nanopartículas com siRNA visou uma redução da expressão gênica antes da aplicação de doxorrubicina. Os sinais de fluorescência, indicativos de apoptose, foram detectados em citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, EUA) e analisados através do programa FCS-Express 5®.

3.7.2 Análise de Apoptose por Microscopia Confocal de Varredura a Laser

Células MCF-7 foram cultivadas e incubadas nas mesmas condições descritas no ensaio de anexina V-FITC. Após três lavagens com tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,2, as células foram coradas com DAPI (1: 1000 v/v) durante 2 min. As culturas foram então enxaguadas três vezes com PBS e as lâminas preparadas para obtenção das imagens por microscopia confocal de varredura a laser. Esta observação utilizou o Microscópio Leica DMI6000 B e as imagens obtidas foram analisadas usando o software ImageJ®.

3.8 Ensaios *in vivo*

3.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/C fêmeas, com idade de 4 – 8 semanas. Os animais foram acondicionados e aclimatados em recintos de plástico ($15 \times 36 \times 30$ cm) forrados com serragem, substituída a cada três dias para higiene e manutenção. O ambiente de permanência e experimentos com os animais teve a temperatura controlada ($23^\circ \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12h. Durante todo o período os animais tiveram acesso à água e alimento *ad libitum*. Os experimentos seguiram os preceitos éticos para experimentação animal e o protocolo experimental foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), o qual foi aprovado sob parecer número PP00892 (Anexo 1).

3.8.2 Preparação dos modelos animais de tumor de mama

Foram injetados, no tecido subcutâneo da mama inferior abdominal direita dos camundongos, 5×10^4 células (suspensão em 100 μL de meio) da linhagem de carcinoma mamário murino 4T1 (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001, com modificações). Após 20 dias de maturação do tumor no espaço subcutâneo, os camundongos cujos tumores cresceram homogeneamente foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, conforme os tratamentos: Controle, NP siBCL-2 (n=5) e NP si BCL-xL (n=3), para o ensaio de atividade antitumoral. Controle e NP siCy5 (n=4) para o ensaio de biodistribuição.

3.8.3 Análise da Atividade antitumoral

A partir da estabilização do modelo de tumor de mama, o ensaio teve a duração de 14 dias, sendo no dia 1 administrada a primeira injeção das formulações testadas e no dia 14 realizada a eutanásia nos animais, com remoção do tumor e alguns órgãos (fígado, baço, rins, pulmões e coração).

As injeções com cada formulação foram realizadas nos dias 1, 4, 7 e 12 do experimento, perfazendo 4 injeções com 1mg/Kg de siRNA cada. Após a purificação, as formulações nanoestruturadas foram administradas em suspensão de 200 μL de salina estéril por via endovenosa através da veia caudal lateral.

Os tumores foram medidos com um paquímetro e o volume calculado através da fórmula elipsoidal modificada: volume = $\frac{1}{2}$ (comprimento \times largura²) (EUHUS et al., 1986). As medições foram realizadas nos dias 2, 4, 6, 8, 10 12 e 14 do experimento. A atividade antitumoral é observada pela redução do crescimento do tumor nos animais tratados em comparação ao controle, medida pelo volume relativo do tumor. Os animais foram também pesados nos mesmos dias da medição do tumor, com a finalidade de verificar diferenças de peso entre os tratamentos, como evidência de toxicidade induzida pelas formulações.

3.8.4 Análise de Biodistribuição

Com o objetivo de avaliar a biodistribuição e bioacumulação no tumor, nanopartículas carreando siRNA marcado com fluoróforo (Cianina-5) foram administrados intravenosamente através da veia caudal dos camundongos (n=4). Após 3 horas, os animais foram eutanasiados e os tumores e órgãos retirados para análise de fluorescência por contagem de fótons, utilizando o equipamento In-Vivo Xtreme®. A contagem de fótons foi medida e normalizada pelo próprio peso do órgão/tumor.

3.8.5 Análise Histopatológica

Para a análise histopatológica dos tumores e órgãos, as amostras foram fixadas (paraformaldeído 4%), desidratadas em álcool, inclusas em blocos de parafina e posteriormente cortadas (5µm diâmetro) para o preparo das lâminas histológicas. A coloração foi realizada com hematoxilina e eosina. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de luz (magnificação de 100 - 400×) e as imagens fotografadas para registro.

3.9 Avaliação *in vitro* e *in vivo* da Expressão dos Genes *BCL-2* e *BCL-xL*

A avaliação da expressão dos genes alvos para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foi realizada por reação em cadeia de polimerase em tempo real (PCR quantitativa). Para tanto, procedeu-se a extração de RNA das amostras, conforme segue:

Ensaio *in vitro*: Células MCF-7 ($0,5 \times 10^6$ células / poço) foram incubadas em placas de 6 poços com meio nutriente contendo 10% de SFB. Após 24 h, as formulações contendo siRNA foram adicionadas a cada poço e incubadas durante 48 h. Em seguida, o RNA total foi extraído de amostras utilizando o reagente fenol-clorofórmio (Trizol®) de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo de RNA total foi então quantificado por absorbância a 260 nm (NanoVue™, GE Healthcare, Reino Unido) e 1µg de RNA foi utilizado para síntese de cDNA.

Ensaio *in vivo*: A extração de RNA ocorreu a partir das amostras dos tumores de mama murinos, previamente imersos em 1 mL de Trizol® e conservados em -80° C. Para tanto, 100 mg de tumor de cada amostra foi homogeneizada em Trizol® utilizando o equipamento T 10 Basic Ultra

Turrax (IKA®). O RNA total foi então extraído utilizando Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo de RNA total foi então quantificado por absorbância a 260 nm (NanoVue™, GE Healthcare, Reino Unido) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1µg de RNA extraído.

Após as extrações, o cDNA foi sintetizado através do uso do kit de cDNA - transcrição reversa de alta capacidade (Applied Biosystems®, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA obtidas foram armazenadas à -20° C. O cDNA obtido foi então aplicado para análise por PCR quantitativa. Para amplificar os genes alvo, uma solução de 10 µM dos iniciadores específicos (senso e antisenso) (Tabela 2) foi misturada com Power SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific Inc, CA, EUA).

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores

Gene	Sequência senso/antisenso (5'-3')	Espécie	Ref.
<i>BCL-2</i>	TACCTGGTGGGAGGAAAAGAG / GGGCATTTCATCGCT	<i>H. sapiens</i>	Autor
	CCCTTGCGTGTCTCTCTG/ TGTGATTCTCCCTTCTTCTCGG	<i>M. musculus</i>	Autor
<i>BCL-xL</i>	TCAGGAACAGCTATGGGAGC/ TTCTAGTCAGCCCTACCCCA	<i>H. sapiens</i>	Autor
	ACATCCCAGCTTCACATAACC C/ GCGACCCAGTTTACTCCATC	<i>M. musculus</i>	Autor
<i>β-actina</i>	CCAACCGCGAGAAGATGA/ CCAGAGGCGTACAGGGATAG	<i>H. sapiens</i>	Autor
	TCAGCAAGCAGGAGTACGATG / AACGCAGCTCAGTAACAGTCC	<i>M. musculus</i>	Autor

O gene β -actina foi utilizado como gene de referência, para normalizar os resultados das diferentes amostras. Amostras conhecidas de cDNA foram aplicadas para a confecção de uma curva padrão, nas concentrações de: 1, 1/10, 1/100, 1/1000. Para a PCR em tempo real o equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems[®]) foi utilizado. As condições de ciclagem térmica foram: 95 °C durante 15 min; 95 °C por 15 s (40 ciclos), 60 °C durante 30 s e 72 °C por 38 s seguido de análise da curva de dissociação (95 °C por 15 s, 60 °C por 59 s e 95 °C por 15 s).

A fim de verificar a formação de dímeros de oligonucleotídeos, contaminantes e ampliações inespecíficas, todas as amostras foram submetidas à análise por curva de dissociação dos amplicons. Esta curva representou a quantidade de fluorescência emitida em relação às diferentes temperaturas na reação de PCR.

A análise da expressão gênica foi realizada pela quantificação de sinais de fluorescência (Δ RN) em função do número de ciclos de amplificação. Os valores foram obtidos em um ponto durante a fase exponencial de amplificação, denominado Ct (*cycle threshold*). A quantificação foi então realizada comparando com as concentrações conhecidas pela curva padrão. Os valores foram normalizados pelo gene de referência e a expressão relativa dos tratamentos em relação aos controles foi obtida.

3.10 Quantificação de Proteínas BCL-2 e BCL-xL

Ensaio *in vitro*: As células MCF-7 ($0,5 \times 10^6$ células / poço) foram incubadas em placas de 6 poços com meio contendo 10% de SFB. Após 24 h, as formulações NP siBCL-2 ou NP siBCL-xL foram adicionadas aos poços e as células foram incubadas por 72 h. Para a extração das proteínas os poços foram tripsinizados e as células obtidas homogeneizadas em vortex, seguido de incubação por 30 min em tampão de lise (RIPA) e em banho de gelo. Foram adicionados à esta incubação os inibidores de protease (pepstatina 1 μ L/mL; leupeptina μ L/mL; aprotinina 2,5 μ L/mL e PMSF 5 μ L/mL. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas ($3000 \times g$, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi então recolhido, uma alíquota foi utilizada para quantificação e outra armazenada em -80 °C para posterior utilização.

Ensaio *in vivo*: A extração de proteínas ocorreu a partir das amostras dos tumores de mama murinos, previamente conservados a seco em -80° C. Para tanto, 100 mg de tumor de cada amostra foi homogeneizada através do equipamento T 10 Basic Ultra Turrax (IKA[®]).

As proteínas totais foram então extraídas conforme previamente descrito para o ensaio *in vitro*.

Western blot: A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Assim, 35 µg de proteína total de cada amostra (ensaios *in vitro* e *in vivo*) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio a 15% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em solução salina tamponada com TRIS-HCl e Tween® 20 (TBS-T) e incubadas *overnight* a 4 ° C com anticorpos primários anti-BCL-2, anti-BCL-xL e anti- β-actina. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T (BCL-2 e BCL-xL - 1:100 v/v, β-actina - 1: 2000 v/v) contendo ASB 2,5%. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1: 20.000 v/v). Os complexos imunes foram visualizados através da detecção quimioluminescente usando Amersham ECL® detectado pelo equipamento ChemiDoc MP (Bio-Rad). As proteínas foram quantificadas utilizando o software de análise de imagem Bio-Rad e a proteína β-actina foi utilizada para normalização de dados.

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de acordo com três experimentos independentes, se não for mencionado de outra forma. Os resultados contendo mais de 2 amostras foram analisados através de testes ANOVA (uma via ou duas vias quando necessário) e o teste de Tukey como *post hoc* foi aplicado. Para comparação de duas amostras, foi utilizado o teste t de *student*. Em todos os testes, os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significantes e indicados por asterisco. Para análise dos dados utilizou-se o software GraphPad Prism®.

4 RESULTADOS

4.1 Sequências de siRNAs

As sequências de siRNAs utilizadas neste estudo atenderam os critérios propostos por Reynolds et al. (2004). Assim, foram desenhadas as sequências apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos de siRNA

Gene	Sequência Senso (5'-3')	Espécie	Ref.
<i>BCL-2</i>	ACAUCGCCUGUGGAUGACU	<i>H. sapiens</i> e <i>M. musculus</i>	(1)
<i>BCL-xL</i>	GGAGAUUGGACGGCCUGAU	<i>H. sapiens</i>	Autor
<i>BCL-xL</i>	CAGCUGGAGUCAGUUUAGU	<i>M. musculus</i>	Autor
<i>BCL-xL</i>	CAGCUGGAGUCAGUUUAGU ⁽²⁾	<i>M. musculus</i>	Autor
<i>Scramble</i>	UUCUCCGAACGUGUCACGU ⁽³⁾	<i>H. sapiens</i>	(3)

(1) (TEKEDERELI et al., 2013);

(2) Marcado com Cianina 5.

(3) Sequência aleatória, sem alvo no transcriptoma (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004).

Os locais específicos de pareamento junto aos alvos *BCL-2* e *BCL-xL* podem ser observados nas Figuras 7 e 8, que permitem uma visualização mais ampla do ponto exato de pareamento em relação à extensão total do transcrito.

A pesquisa de homologia mostrou alta especificidade dos oligonucleotídeos de siRNA desenhados, sem possibilidade de pareamento fora do alvo. Ainda, as sequências obtidas contemplam todas as variantes de cada gene alvo.

Com a finalidade de avaliar a capacidade das sequências de silenciar seus respectivos alvos, antes de incorporar os siRNA nas nanopartículas propostas, estes foram testados em células humanas de câncer de mama MCF-7 utilizando um reagente de transfecção comercial (Lullaby®). Os resultados demonstram a redução da quantidade de proteína BCL-2 e BCL-xL, após 72 h de incubação, como apresentado na Figura 9.

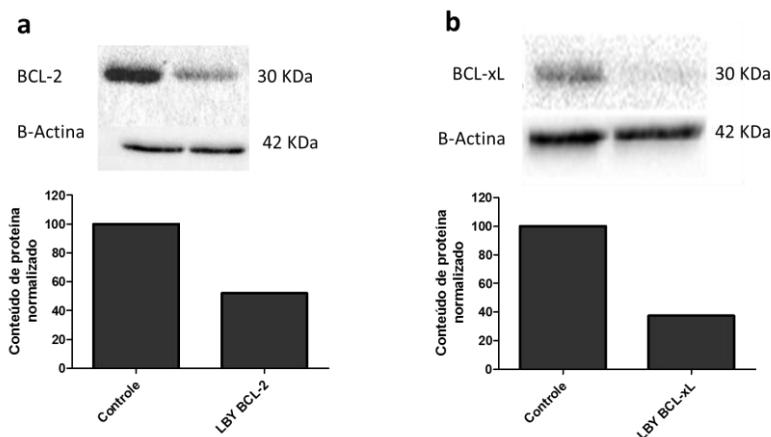


Figura 9 – Quantificação relativa de proteína BCL-2 e BCL-xL em células humanas de carcinoma mamário MCF-7. Incubação por 72 h com siRNA (200 nM) vetorizado por reagente de transfecção Lullaby®. Análise por *western blot* empregando anticorpos monoclonais anti-BCL-2, Anti-BCL-xL e anti- β -actina. (a) BCL-2; (b) BCL-xL.

4.2 Nanopartículas Híbridas

As sequências de siRNA utilizadas neste estudo foram incorporadas em nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion: NP siBCL-2 e NP siBCL-xL, carreando siRNA *BCL-2* e *BCL-xL*, respectivamente. As formulações foram preparadas por automontagem de compostos orgânicos e inorgânicos conforme descrito em materiais e métodos. De acordo com a análise ponderada por intensidade, as formulações analisadas por DLS após diluição com tampão TRIS-HCl (1:10 v/v) apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios de $68,9 \text{ nm} \pm 1,9 \text{ nm}$ e $69,6 \text{ nm} \pm 0,8 \text{ nm}$, e índice de polidispersão (PdI) de $0,105 \pm 0,026$ e $0,089 \pm 0,011$, para NP siBCL-2 e NP siBCL-

xL, respectivamente. O histograma de distribuição de tamanho (Figura 10), ponderado pelo número, mostrou distribuições unimodais para NP siBCL-2 e NP siBCL-xL, com picos a $49,5 \text{ nm} \pm 2,8 \text{ nm}$ e $47,9 \text{ nm} \pm 3,9 \text{ nm}$, respectivamente.

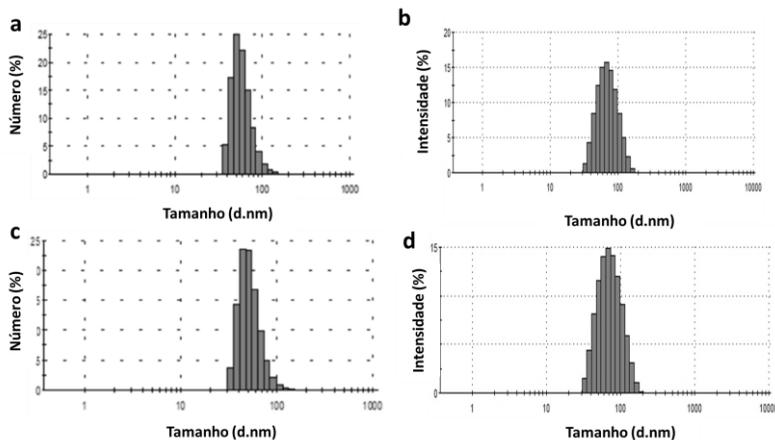


Figura 10 - Histogramas de distribuição de tamanho de nanopartículas, ponderados pelo número e intensidade. (a-b) NP siBCL-2; (c-d) NP siBCL-xL. Histogramas representativos de três experimentos independentes.

Em relação à presença de siRNA *scramble* ou ausência de siRNA (*mock*), os resultados quanto ao tamanho não mostraram diferença expressiva, como pode ser observado na Figura 11.

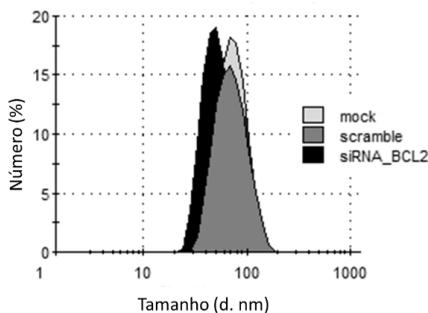


Figura 11 - Comparação do tamanho de diferentes formulações nanoestruturadas. Ponderação pelo número de nanopartículas. Análise representativa de três experimentos independentes.

As imagens obtidas por microscopia de transmissão eletrônica (MET) demonstraram que a formulação NP siBCL-2 expressou um diâmetro médio de $33,3 \pm 2,8$ nm e a NP siBCL-xL um diâmetro médio de $35,3 \pm 1,9$ nm ($n=155$ nanopartículas). As imagens obtidas mostraram unidades com aspecto esférico e homogêneo (Figura 12).

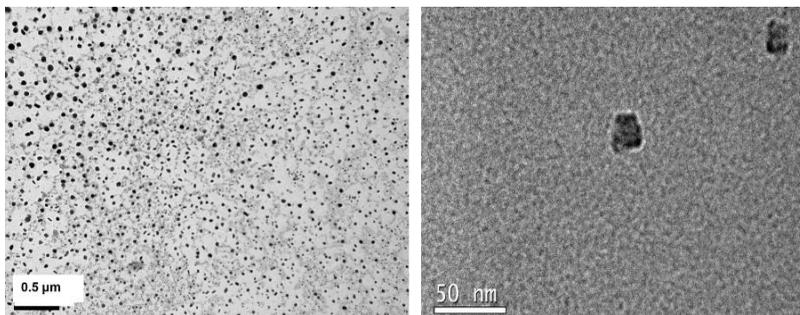


Figura 12 – Imagens de nanopartículas obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Voltagem 650 kv. As imagens são representativas das duas formulações (NP siBCL-2 e NP siBCL-xL).

As formulações diluídas em TRIS, salina pré-purificação e salina pós-purificação por ultrafiltração não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros tamanho e PDI, analisadas por DLS (Figuras 13 e 14).

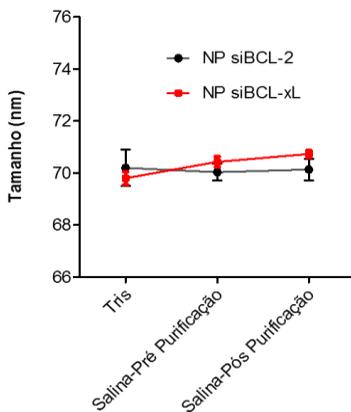


Figura 13 – Tamanho das nanopartículas em diferentes soluções. Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Anova 1 via, $n=3$, $p<0,05$. NP siBCL-2 e NP siBCL-xL = siRNA *BCL-2*, e *BCL-xL* respectivamente, carregados por nanopartículas híbridas;

Da mesma forma, a diluição em meio RPMI não alterou o tamanho e morfologia das nanopartículas (análise por MET, Figura 15). Destaca-se que a análise por DLS das suspensões de nanopartículas em meio de cultura não é possível devido à interferência das proteínas do soro fetal bovino, conforme observado por Souza (2016).

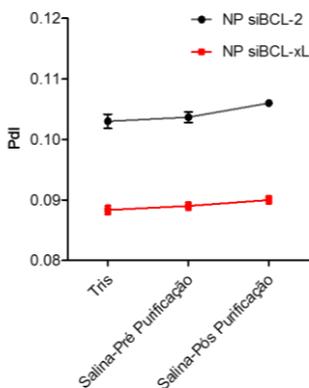


Figura 14 – Índice de Polidispersão (PdI) das nanopartículas em diferentes soluções. Análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Anova 1 via, $n=3$, $p<0,05$. NP siBCL-2 e NP siBCL-xL = siRNA *BCL-2*, e *BCL-xL* respectivamente, carregados por nanopartículas híbridas.

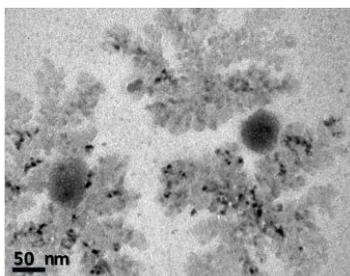


Figura 15 – Imagem de nanopartículas diluídas em meio de cultura (RPMI) obtida por microscopia eletrônica de transmissão. Voltagem: 3150 kv. A imagem é representativa das duas formulações (NP siBCL-2 e NP siBCL-xL).

O teste de mobilidade eletroforética (potencial zeta) mostrou que as formulações apresentaram diferenças de tensão superficiais de $-1,22 \pm$

0,23 mV (NP siBCL-2) e $-1,16 \pm 0,14$ mV (NP siBCL-xL), perto da neutralidade (Tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização das nanopartículas híbridas

Formulação	Tamanho DLS ¹ (nm)	Tamanho MET ² (nm)	PdI ¹	Potencial Zeta ¹ (mV)
NP siBCL-2	68 ± 1	33 ± 3	0.105 ± 0.02	-1.22 ± 0.2
NP siBCL-xL	69 ± 1	35 ± 2	0.089 ± 0.01	-1.16 ± 0.1

(¹n=3, ²n=155; DLS = Espalhamento dinâmico de luz; MET =Microscopia eletrônica de transmissão; NP siBCL-2 e NP siBCL-xL = siRNA BCL-2 e BCL-xL respectivamente, carregados por nanopartículas híbridas; PdI=índice de polidispersão.

4.3 Ensaio de Hemólise

Os ensaios *in vivo* exigem que os componentes dos nanocarreadores não produzam hemólise. Assim, a formulação NP siScramble foi incubada com sangue em diferentes concentrações para avaliação deste parâmetro. A Figura 16 ilustra que não foi observada hemólise em nenhuma das concentrações testadas.

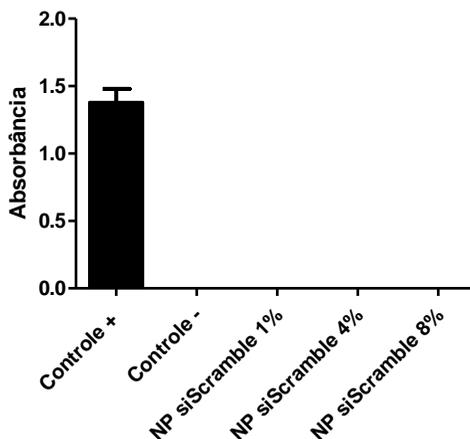


Figura 16 – Ensaio de hemólise. Incubações por 1 h com nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-Poliânion em diferentes concentrações. Salina como controle negativo e água destilada como controle positivo. n=3; ANOVA 1 via, $p < 0,001$.

4.4 Expressão do gene *BCL-2*, ensaios *in vitro*.

A expressão do gene *BCL-2* foi primeiramente analisada pela quantificação da proteína *BCL-2* por *western blot* em três linhagens celulares de carcinoma mamário (MDA-MB-231, HCC-1954 e MCF-7). Os resultados mostraram que a proteína *BCL-2* é expressa em maior quantidade na linhagem celular MCF-7 em comparação com as linhas celulares MDA-MB-231 e HCC-1954 (Figura 17).

A formulação NP si*BCL-2* foi avaliada quanto à capacidade de silenciar o gene *BCL-2* em células MCF-7. Para tanto, o teor de proteínas *BCL-2* foi determinado por *western blot*. As células foram então incubadas por 72 h como descrito em materiais e métodos e os resultados são apresentados na Figura 18, que mostra uma diminuição de $63\% \pm 9\%$ no teor de proteína *BCL-2* após a incubação com a formulação e normalização pela proteína β -actina.

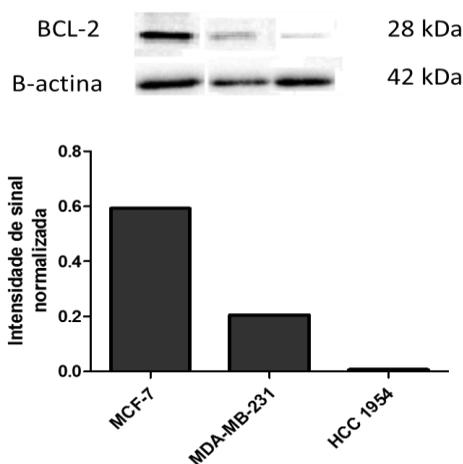


Figura 17 - Quantificação normalizada de proteína *BCL-2* em diferentes linhagens celulares humanas de carcinoma mamário. Análise por *western blot* empregando anticorpos monoclonais anti-Bcl-2 e anti- β -actina para normalização. Unidades arbitrárias de intensidade de sinal.

O mecanismo de interferência promovido pela formulação NP si*BCL-2* foi também avaliado por PCR quantitativo após 48 h de incubação. A expressão do gene diminuiu aproximadamente $51\% \pm 0,9\%$ (Figura 19) em comparação com o controle.

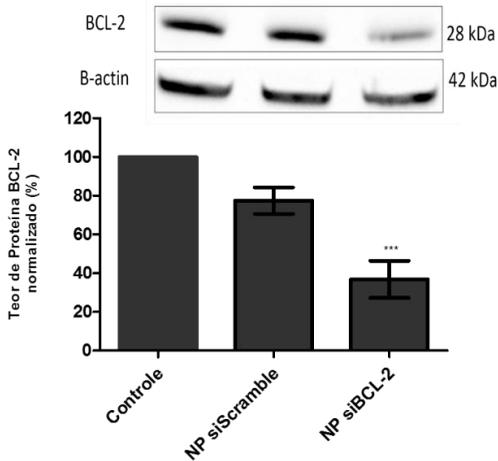


Figura 18 - Quantificação relativa de proteína BCL-2 em células humanas de carcinoma mamário MCF-7. Incubação com NP siBCL-2 (200 nM) por 72 h. (ANOVA 1 via; $n=3$; $p<0,001$). Análise por *western blot* empregando anticorpos monoclonais anti-BCL-2 e anti- β -actina. Imagem das bandas imunomarcadas é representativa de 3 experimentos independentes. NP siBCL-2 = siRNA *BCL-2* carregado por nanopartícula híbrida; NP siScramble=siRNA não pareável, carregado por nanopartícula híbrida.

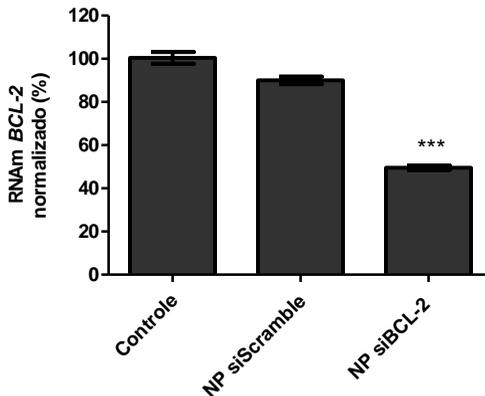


Figura 19 - Análise quantitativa da expressão do gene *BCL-2* em células de carcinoma mamário. PCR quantitativo. Incubação com NP siBCL-2 (200nM) por 48 h. ANOVA 1 via, $n = 3$, $p < 0,001$.

4.5 Expressão do gene *BCL-xL*, ensaios *in vitro*

O siRNA *BCL-xL* vetorizado em nanopartículas híbridas foi testado quanto a capacidade de silenciar este alvo. O ensaio de *western blot* mostrou uma diminuição significativa na proteína BCL-xL após 72 h de incubação com a formulação NP siBCL-xL (200 nM). A diminuição foi de $52\% \pm 2\%$ e é apresentado na Figura 20.

Posteriormente, a expressão do gene *BCL-xL* foi também avaliada por PCR quantitativa e normalizada pela expressão de β -actina. A Figura 21 mostra que o siRNA da formulação NP siBCL-xL promoveu interferência, reduzindo a expressão do gene em $77\% \pm 5\%$ após a incubação de 48 h.

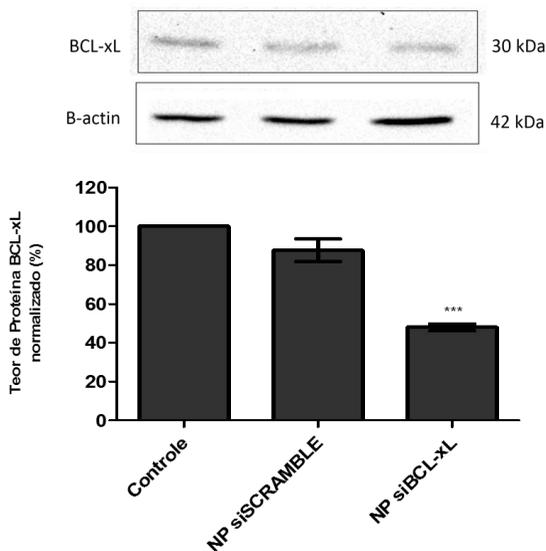


Figura 20 - Quantificação relativa de proteína BCL-xL em células humanas de carcinoma mamário MCF-7. Incubação com NP siBCL-xL (200 nM) por 72 h. (ANOVA 1 via; n=3; $p < 0,001$). Análise por *western blot* empregando anticorpos monoclonais anti-BCL-xL e anti- β -actina. A imagem das bandas imunomarcadas é representativa de 3 experimentos independentes. NP siBCL-xL = siRNA *BCL-xL* carreado por nanopartícula híbrida; NP siScramble=siRNA não pareável, carreado por nanopartícula híbrida.

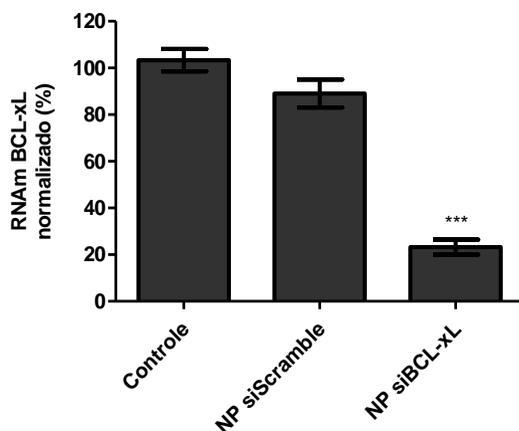


Figura 21 - Análise quantitativa da expressão do gene *BCL-xL* em células de carcinoma mamário. PCR quantitativo. Incubação com NP siBCL-xL (200nM) por 48 h. ANOVA 1 via, n = 3, p <0,001.

A análise da expressão gênica dos ensaios *in vitro* foram realizadas por PCR quantitativa e os primers utilizados apresentaram as propriedades constantes na Tabela 5.

Tabela 5 - Características dos oligonucleotídeos iniciadores na reação de PCR.

Gene (<i>H. sapiens</i>)	Sequência senso/antisense (5'-3')	Produto (pb)	Eficiência (%)
<i>BCL-2</i>	TACCTGGTGGGAGGA AAAGAG/GGGCATT TTCCCATCGCT	92	102,4
<i>BCL-xL</i>	TCAGGAACAGCTATG GGAGC/TTCTAGTCA GCCCTACCCCA	98	99,6
<i>β-actina</i>	CCAACCGCGAGAAG ATGA/CCAGAGGCGT ACAGGGATAG	97	96,2

4.6 Citotoxicidade

As células de câncer de mama humano MCF-7 incubadas com NP siBCL-2 foram analisadas por meio de ensaio MTT para avaliar o possível efeito citotóxico das formulações. Conforme mostrado nas Figuras 22 e 23, a formulação NP siBCL-2 não mostrou citotoxicidade até uma concentração de 200 nM de siRNA nos tempos de 24 h e 48 h de incubação.

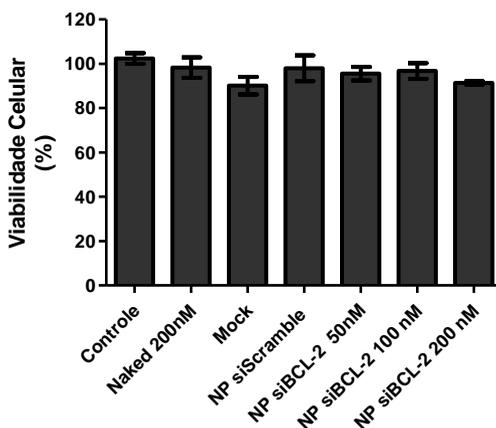


Figura 22 – Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-2 durante 24 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p > 0,05$; $n = 3$.

No entanto, observou-se um efeito citotóxico significativo nos tempos de 72 h e 96 h de incubação, na concentração de 200 nM, diminuindo a viabilidade celular para $56 \pm 6\%$ (72h) e $57 \pm 5\%$ (96 h) em comparação com o controle (Figuras 24 e 25). A formulação sem siRNA (mock), bem como as formulações carregando siRNA *scramble* não promoveram nenhuma diminuição na viabilidade celular, para nenhum dos tempos testados (Figuras 22-25). Da mesma forma, a incubação com as moléculas de siRNA sem o nanocarreador (*naked*), na concentração de 200 nM não produziu efeito citotóxico.

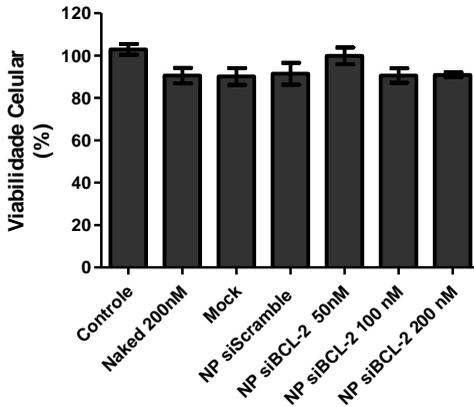


Figura 23 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-2 durante 48 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p > 0,05$; $n = 3$.

No entanto, observou-se um efeito citotóxico significativo nos tempos de 72 h e 96 h de incubação, na concentração de 200 nM, diminuindo a viabilidade celular para $56 \pm 6\%$ (72h) e $57 \pm 5\%$ (96 h) em comparação com o controle (Figuras 24 e 25).

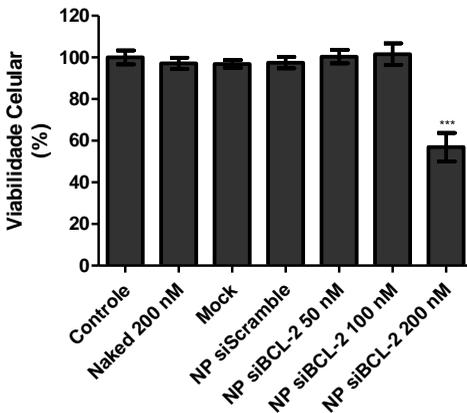


Figura 24 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-2 durante 72 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p < 0,001$; $n = 3$.

A formulação sem siRNA (mock), bem como as formulações carreando siRNA *scramble* não promoveram nenhuma diminuição na viabilidade celular, para nenhum dos tempos testados (Figuras 22-25). Da mesma forma, a incubação com as moléculas de siRNA sem o nanocarreador (*naked*), na concentração de 200 nM não produziu efeito citotóxico.

Para analisar o efeito combinado do silenciamento do gene *BCL-2* com quimioterapia, as células MCF-7 foram incubadas com NP siBCL-2 - 200 nM seguida da incubação com doxorrubicina. Após 72 h de incubação, a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) para a doxorrubicina foi reduzida de $2,47 \pm 1,10 \mu\text{M}$ para $0,42 \pm 0,03 \mu\text{M}$ na presença do sistema NP siBCL-2 (Figura 26).

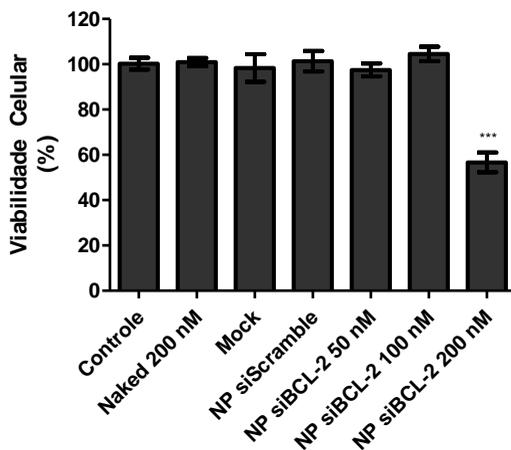


Figura 25 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após Incubação com NP siBCL-2 durante 96 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p < 0,001$; $n = 3$.

A citotoxicidade da formulação NP siBCL-xL em células de câncer de mama MCF-7 também foi avaliada por teste de MTT. As Figuras 27 e 28 demonstram que as nanopartículas carreando siRNA *BCL-xL* não exibiram efeitos citotóxicos até uma concentração de 200 nM nos tempos de 24 h e 48 h de incubação.

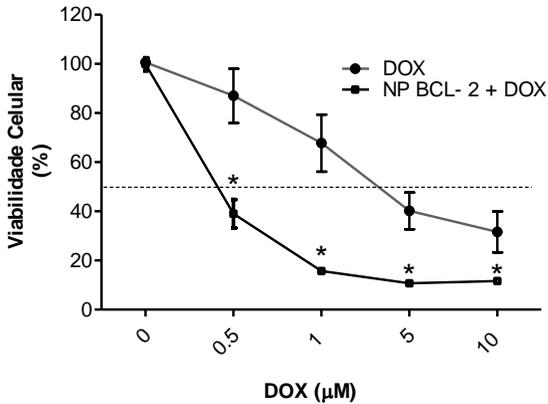


Figura 26 - Citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 após incubação com doxorrubicina (DOX) e NP siBCL-2 (200nM). A incubação foi de 72 h, nas concentrações indicadas na figura. Teste t de Student; $p < 0,05$; $n=3$.

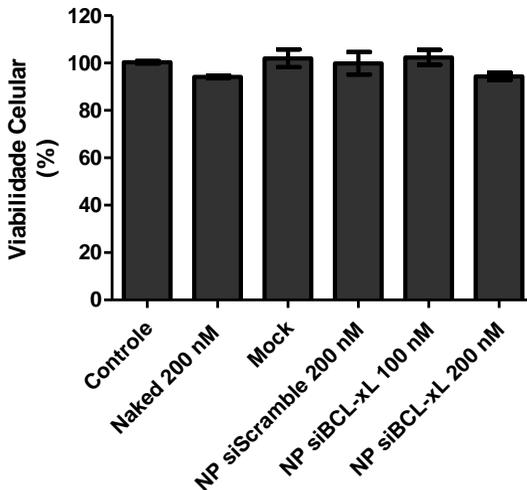


Figura 27 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 24 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p > 0,05$; $n=3$.

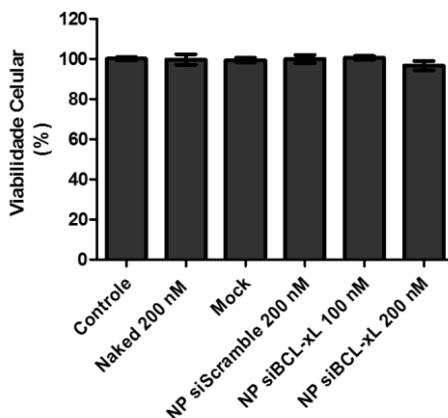


Figura 28 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 48 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p > 0,05$; $n = 3$.

Entretanto, foi alcançado diminuições significativas da viabilidade celular, reduzidas para $41\% \pm 9\%$ (72 h) e $48\% \pm 6\%$ (96 h), conforme pode ser observado nas Figuras 29 e 30.

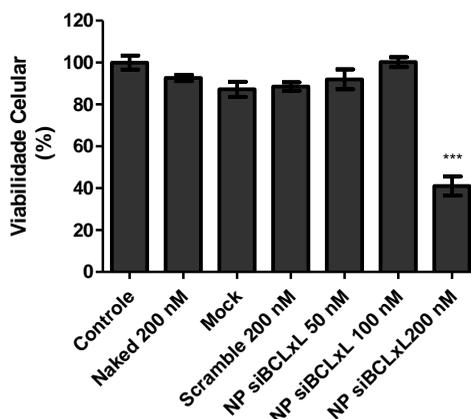


Figura 29 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 72 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p < 0,001$; $n = 3$.

O efeito da doxorubicina em uma curva de concentrações também foi testada com e sem incubação com nanopartículas carregando siBCL-xL (200 nM). Observou-se uma potencialização do efeito da doxorubicina induzida pelo siRNA, reduzindo a CC_{50} do fármaco de $2,47 \pm 1,10 \mu\text{M}$ para $1,15 \pm 0,04 \mu\text{M}$ (Figura 31).

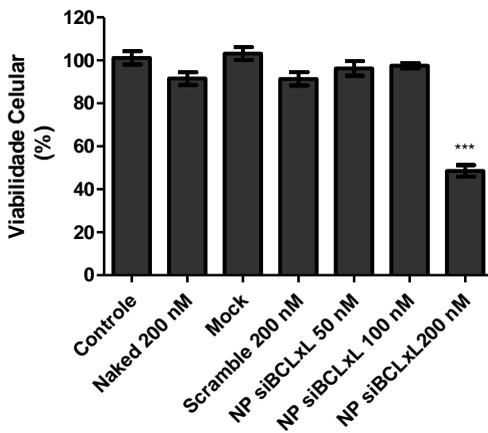


Figura 30 - Viabilidade celular para células de câncer de mama MCF-7 após incubação com NP siBCL-xL durante 96 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 1 via; $p < 0,001$; $n = 3$.

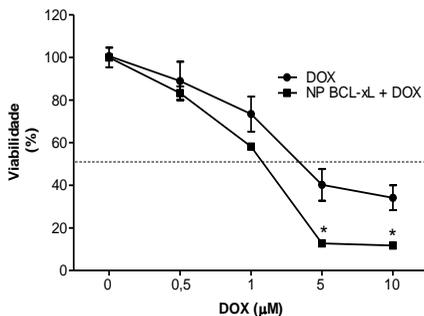


Figura 31 - Citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7 após incubação com doxorubicina (DOX) e NP siBCL-xL (200nM). O tempo de incubação foi de 72 h. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi Teste t de Student; $p < 0,05$; $n = 3$.

Os efeitos citotóxicos das formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL sobre as células de carcinoma mamário humano foram comparados com uma linhagem celular não tumoral (HUVEC). Os resultados dos índices de seletividade obtidos a partir dos valores de área sobre a curva são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores de área sobre a curva e índice de seletividade da citotoxicidade induzida pelas formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL.

Formulação	MCF-7	HUVEC	IS (viabilidade / nM)
NP siBCL-2	304 ± 4	433 ± 2	1,4
NP siBCL-xL	270 ± 3	402 ± 3	1,5

Incubação por 72 h, n=3. NP siBCL-2 e NP siBCL-xL = siRNA BCL-2 e BCL-xL respectivamente, carregados por nanopartículas híbridas; IS=índice de seletividade.

4.7 Apoptose

A avaliação da taxa de apoptose pelas células de carcinoma mamário MCF-7 por meio do ensaio de anexina V-FITC mostrou um aumento nas células apoptóticas após a incubação com as formulações testadas (Figuras 32 e 34).

Comparada com o controle, a incubação com doxorrubicina 0,5 µM isoladamente não mostrou efeito apoptótico nas células de câncer de mama MCF-7. Da mesma forma, a formulação NP siBCL-2 (200 nM) isoladamente não aumentou a contagem de eventos apoptóticos. No entanto, após a incubação com a formulação NP siBCL-2 seguido da incubação com doxorrubicina 0,5 µM, o número de células positivas para anexina V-FITC aumentou significativamente (Figura 33).

A incubação de células MCF-7 com doxorrubicina 0,5 µM, precedida pela incubação com a formulação NP siBCL-xL (200 nM), aumentou a população de células positivas para anexina V-FITC, como mostrado nas Figuras 34 e 35. Da mesma forma que a incubação com NP siBCL-2, a incubação com as nanopartículas carregando siRNA *BCL-xL* isoladamente não produziu eventos apoptóticos significativamente diferente em relação ao controle.

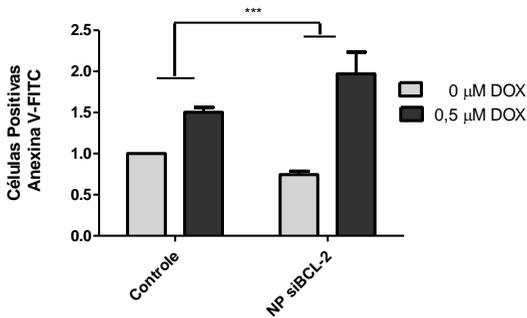


Figura 32 – Análise das Populações de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC. Incubação de 24 h de com NP siBCL-2, seguida de 48 horas de incubação com doxorubicina. DOX=doxorubicina; NP siBCL-2 = siRNA *BCL-2* carreado por nanopartícula híbrida. Os valores do eixo x são arbitrários. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 2 vias; n = 3, p<0,001.

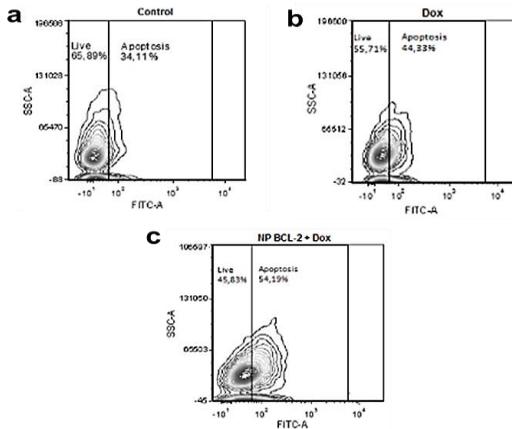


Figura 33 – Distribuição populacional de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC após 24 h de incubação com formulação NP siBCL-2, seguida de 48 horas de incubação com doxorubicina. (a) Controle (b) 0,5 μM DOX (d) NP siBCL-2 200 nM + DOX 0,5 μM. Os contornos exibem células positivas para anexina V-FITC. Imagens representativas de três experimentos independentes. DOX=doxorubicina; NP siBCL-2 = siRNA *BCL-2* carreado por nanopartícula híbrida.

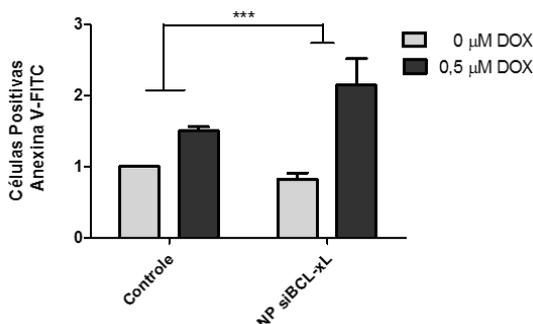


Figura 34 – Análise das Populações de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC. Incubação de 24 h de com NP siBCL-xL, seguida de 48 horas de incubação com doxorubicina. DOX=doxorubicina; NP siBCL-xL = siRNA *BCL-xL* carreado por nanopartícula híbrida. Os valores do eixo x são arbitrários. As concentrações das substâncias adicionadas estão mostradas na figura. A análise estatística foi a ANOVA de 2 vias; n = 3, p<0,001.

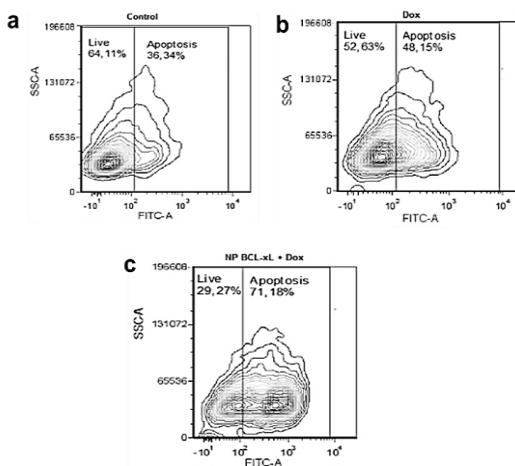


Figura 35 - Distribuição populacional de células de câncer de mama humano MCF-7 positivas para anexina V-FITC após 24 h de incubação com formulação NP siBCL-xL, seguida de 48 h de incubação com doxorubicina. (a) Controle (b) 0,5 μM DOX (d) NP siBCL-xL 200 nM + DOX 0,5 μM . Os contornos exibem células positivas para anexina V-FITC. Imagens representativas de três experimentos independentes. DOX=doxorubicina; NP siBCL-xL = siRNA *BCL-xL* carreado por nanopartícula híbrida.

Para confirmar os eventos apoptóticos, após o mesmo padrão de incubação realizado para o ensaio de anexina V-FITC, foram obtidas imagens por microscopia de confocal à laser. As amostras foram marcadas com DAPI para avaliar condensação nuclear de cromatina (Figura 37).

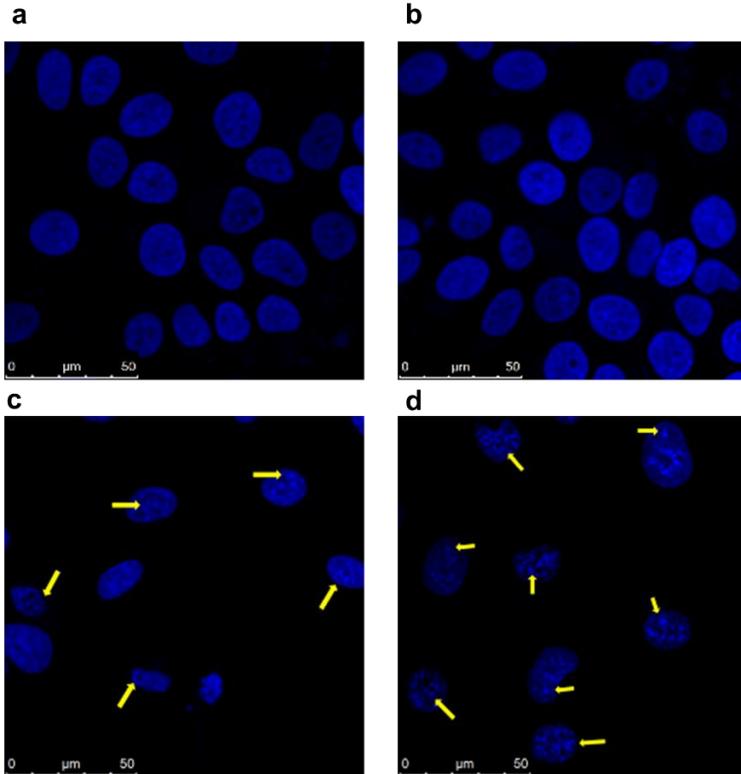


Figura 36 - Análise por microscopia confocal a laser de células de câncer de mama humano MCF-7 após incubação com doxorubicina e nanopartículas carreando siRNA. Incubação com NP siBCL-2 ou NP siBCL-xL durante 24 h, seguidas de 48 h de incubação com 0,5 μM de DOX e coradas com DAPI (ampliação 100x). (a) Controle (b) Imagem representativa das incubações DOX 0,5 μM ou NP siBCL-2 ou NP siBCL-xL individualmente (c) Incubação com DOX + NP siBCL-2. (d) Incubação com DOX + NP siBCL-xL. As setas amarelas indicam a condensação da cromatina. DOX=doxorubicina; NP siBCL-2 = siRNA *BCL-2*; NP siBCL-xL = siRNA *BCL-xL* carregado por nanopartícula híbridas.

Em comparação com o controle, a análise das imagens mostrou a condensação da cromatina após a incubação das células com as seguintes combinações: NP siBCL-2 + DOX ou NP siBCL-xL + DOX (Figura 36). Comparado com o controle, a quantificação da densidade de fluorescência no núcleo mostrou reduções de $22\% \pm 5\%$ e $35\% \pm 7\%$, respectivamente.

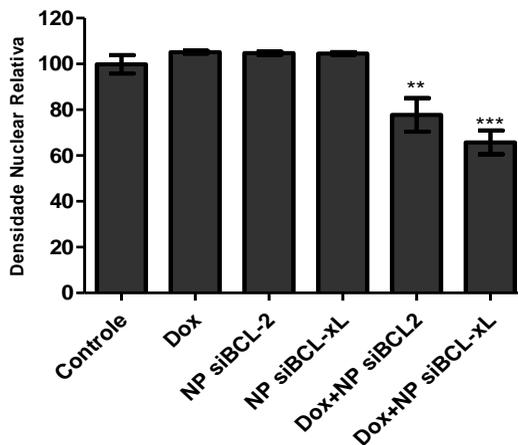


Figura 37 – Quantificação da densidade nuclear relativa de fluorescência obtida por microscopia de confocal a laser. Incubação com NP siBCL-2 ou NP siBCL-xL durante 24 h, seguidas de 48 h de incubação com $0,5 \mu\text{M}$ de doxorubicina. ANOVA 1 via ($n=3$); $p < 0,001$. DOX=doxorubicina; NP siBCL-2 = siRNA *BCL-2*; NP siBCL-xL = siRNA *BCL-xL* carregado por nanopartícula híbridas.

4.8 Atividade Antitumoral

Para a avaliação da atividade antitumoral induzida pelas formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL, camundongos Balb/C foram previamente inoculados subcutaneamente com células de carcinoma mamário murino 4T1 para produzir o modelo tumoral. Após 20 dias, a medida dos volumes tumorais observados foi de $23 \pm 11 \text{ mm}^3$.

Posteriormente, os tratamentos iniciaram conforme descrito em materiais e métodos. Nos dias indicados, o volume do tumor de cada animal foi medido e normalizado em relação ao volume do primeiro dia (admitido como valor arbitrário = 1). O crescimento do tumor pôde ser então acompanhado e está apresentado nas Figuras 38 e 39.

Para a formulação NP siBCL-2 foram observadas diferenças estatísticas entre os volumes tumorais dos grupos controle e tratados. As diferenças ocorreram no 12º ($5,82 \pm 2$ e $2,75 \pm 1$) e 14º dias do tratamento ($5,62 \pm 2$ e $2,45 \pm 0,7$), controle e NP siBCL-2, respectivamente.

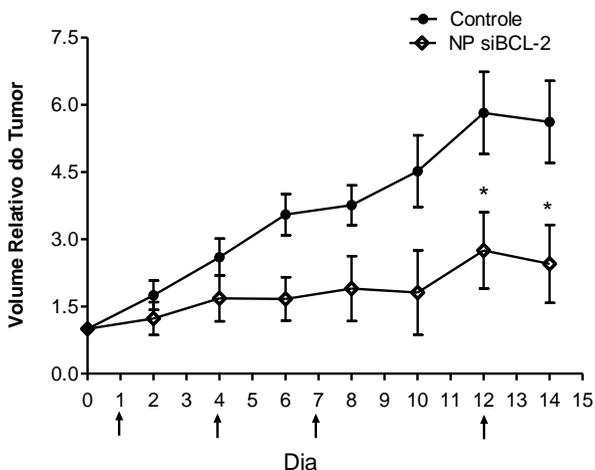


Figura 38 – Crescimento tumoral após tratamento com siRNA-*BCL-2* carregado por nanopartículas híbridas. Setas indicam os dias da administração de 200 μ L de solução endovenosa contendo nanopartículas híbridas carregando siRNA *BCL-2* (NP siBCL-2) 1 mg/Kg ou salina (controle). Teste t por dia de tratamento. N=5; P<0,05.

No tratamento com a formulação NP siBCL-xL não foram observadas diferenças estatísticas entre os volumes tumorais. Entretanto, devido à morte de um animal do grupo NP siBCL-xL, o número de animais amostrados foi reduzido para 2, o que inviabiliza inferir e discutir os resultados, muito embora o efeito da formulação mostre-se evidente visualmente no gráfico.

Com o intuito de avaliar potencial citotoxicidade geral induzida pelas formulações testadas, os pesos dos animais foram obtidos ao longo do experimento, com pesagens no mesmo dia da medição tumoral. Pela Tabela 7 é possível observar que não houve alteração significativa no peso dos animais e que, quanto a este parâmetro, não há sinal de toxicidade. A normalização dos pesos tendo como base a primeira medição também não mostrou diferenças entre os dias de tratamento. Esta análise objetivou suprimir eventual ganho de peso pelo crescimento do tumor.

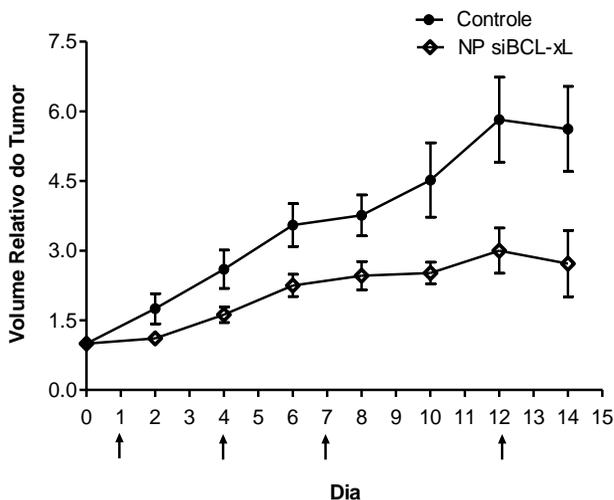


Figura 39 – Crescimento tumoral após tratamento com siRNA-*BCL-xL* carregado por nanopartículas híbridas. Setas indicam administração de 200 μ L de solução endovenosa contendo nanopartículas híbridas carregando siRNA *BCL-xL* (NP siBCLxL) 1 mg/Kg ou salina (controle). ANOVA 2 vias e Teste t por dia de tratamento. Controle n=5 e NP siBCL-xL n=3; P>0,05.

Tabela 7 – Peso dos animais tratados com as formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL.

Dia	Controle (g) p=0,97 (ns), n=5	NP siBCL-2 (g) p=0,91 (ns), n=5	NP siBCL-xL (g) p=0,99 (ns), n=2
0	18,5 \pm 1,1	19,5 \pm 0,8	19,1 \pm 0,8
2	18,1 \pm 1,1	19,7 \pm 0,9	19,7 \pm 1,3
4	19,1 \pm 1,0	20,0 \pm 0,9	19,7 \pm 1,4
6	18,8 \pm 1,0	19,9 \pm 0,8	19,6 \pm 1,5
8	18,6 \pm 0,8	19,5 \pm 0,8	19,8 \pm 1,7
10	18,7 \pm 0,9	19,8 \pm 1,0	19,5 \pm 1,3
12	19,1 \pm 1,2	19,6 \pm 1,0	19,9 \pm 1,3
14	18,6 \pm 0,9	19,1 \pm 1,3	18,9 \pm 1,0

NP siBCL-2 e NP siBCL-xL = siRNA BCL-2 e BCL-xL respectivamente, carregados por nanopartículas híbridas; ns = não significante.

4.9 Expressão gênica in vivo

A avaliação da expressão dos genes *BCL-2* e *BCL-xL* no modelo tumoral murino foi realizada pela quantificação de RNAm via PCR quantitativa. O RNAm foi extraído dos tumores murinos dissecados após o 14º dia de tratamento, e o cDNA correspondente foi obtido conforme descrito em materiais e métodos.

A análise da expressão do gene *BCL-2* mostrou que, comparativamente ao controle, a formulação NP siBCL-2 reduziu significativamente a expressão deste em ~ 40 % (Figura 40).

A expressão do gene *BCL-xL* nos tumores murinos, entretanto, não foi significativamente reduzida (Figura 41).

Para estas análises por PCR quantitativo, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 8, que apresenta também suas propriedades, como tamanho de produto e percentual de eficiência nas reações.

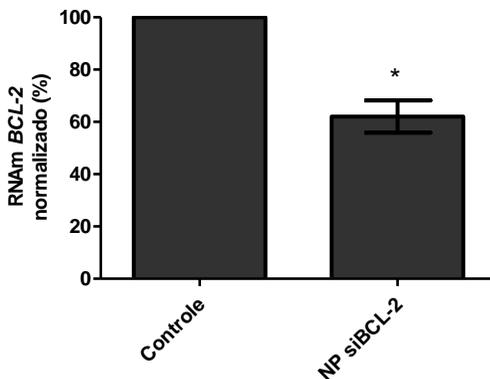


Figura 40 – Expressão do gene *BCL-2* em carcinoma mamário murino após tratamento com NP siBCL-2. 4 administrações endovenosas (dias 1, 4, 7 e 12; 1mg/Kg/dose) Avaliação no 14º dia de tratamento por PCR quantitativa; normalização pelo gene de referência *β -actina*. Controle (salina) n=5, NP siBCL-2 (siRNA *BCL-2* carreado por nanopartícula híbrida, n=5); Teste t de *student*; p<0,05.

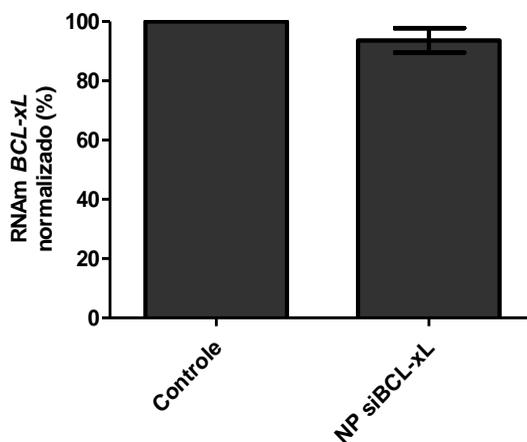


Figura 41 – Expressão do gene *BCL-xL* em adenocarcinoma mamário murino após tratamento com NP siBCL-xL. 4 administrações endovenosas (dias 1, 4, 7 e 12; 1mg/Kg/dose) Avaliação no 14º dia de tratamento por PCR quantitativa; normalização pelo gene de referência β -actina. Controle (salina) n=5, NP siBCL-2 (siRNA *BCL-xL* carregado por nanopartícula híbrida, n=2); Teste t de student; $p>0,05$.

Tabela 8 – Propriedades dos oligonucleotídeos iniciadores.

Gene (<i>M. musculus</i>)	Seqüência senso/antiseno (5'-3')	Produto (pb)	Eficiência (%)
<i>BCL-2</i>	CCCTTGGCGTGTCT CTCTG/TGTGATTCT CCCTTCTTCTCGG	116	104,2
<i>Bcl-xL</i>	ACATCCCAGCTTCA CATAACCC/GCGAC CCCAGTTTACTCCA TC	93	94,3
β -actina	TCAGCAAGCAGGA GTACGATG/AACGC AGCTCAGTAACAG TCC	82	102,0

4.10 Quantificação de Proteínas BCL-2 e BCL-xL extraídas dos tumores murinos

Após a dissecação dos tumores, as proteínas totais foram extraídas das amostras, conforme descrito em materiais e métodos e analisadas por *western blot* após a incubação com os respectivos anticorpos.

O teor de proteína BCL-2 obtido dos tumores é apresentado na Figura 42. Na figura, observa-se que houve pequena diminuição do teor de BCL-2, embora não significativa, nas condições de tempo e tratamentos realizados.

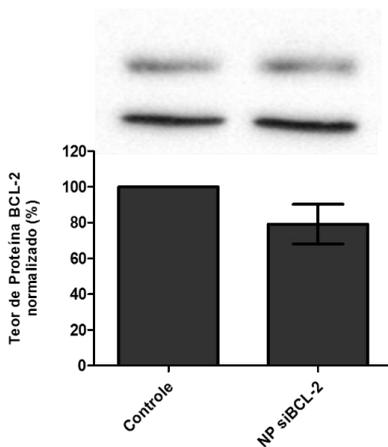


Figura 42 - Quantificação relativa de proteína BCL-2 em carcinoma mamário murino. Tratamento com 4 administrações endovenosas (dias 1, 4, 7 e 12; 1mg/Kg/dose). Avaliação no 14º dia de tratamento por *western blot* empregando anticorpos monoclonais anti-BCL-2 e anti- β -actina. Imagem das bandas imunomarcadas de um tumor é representativa. NP siBCL-2 = siRNA *BCL-2* carreado por nanopartícula híbrida; Teste t de student; Controle (salina) n=5, NP siBCL-2 (n=5); p>0,05.

No entanto, após os tratamentos com a formulação NP siBCL-xL, foi verificada evidência de diminuição do teor da proteína BCL-xL, conforme mostra a Figura 43.

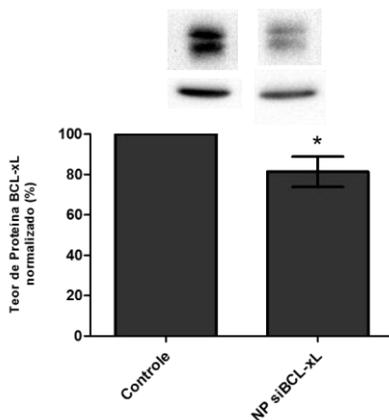


Figura 43 - Quantificação relativa de proteína BCL-xL em carcinoma mamário murino. Tratamento com 4 administrações endovenosas (dias 1, 4, 7 e 12; 1mg/Kg/dose). Avaliação no 14º dia de tratamento por *western blot* empregando anticorpos monoclonais anti-BCL-xL e anti- β -actina. Imagem das bandas imunomarcadas de um tumor é representativa. NP siBCL-xL = siRNA *BCL-xL* carregado por nanopartícula híbrida; Teste t de student; Controle (salina) n=5, NP siBCL-xL (n=2); p<0,05.

4.11 Análise histopatológica

Após o final do tratamento com as formulações testadas, os animais foram eutanasiados e, além do tumor, os seguintes órgãos foram coletados para serem analisados histopatologicamente: pulmão, rim, coração, fígado e baço (Figura 44).

Esta avaliação mostrou evidentes metástases originadas a partir dos tumores implantados. Isto porque foi observada extensa infiltração de células neoplásicas epiteliais no tecido pulmonar em quatro dos cinco animais do grupo controle, e em todos os animais dos grupos tratados (NP siBCL-2 e NP siBCL-xL). Nos tecidos pulmonares foi encontrada também evidência de inflamação, observada pela presença de infiltrados polimorfonucleares intersticiais em quatro dos cinco animais do grupo controle, mas apenas em um animal do grupo NP siBCL-2. Ainda, infiltrados neoplásicos foram observados em praticamente todas as amostras de tecido hepático, com exceção de um animal do grupo NP siBCL-2.

Infiltrações neoplásicas foram encontradas no baço de apenas dois animais: um do grupo controle, que também apresentou infiltrados

polinucleares e um do grupo NP siBCL-xL. Ainda, no baço (amostras de todos os grupos), foi observada presença de hematopoiese extramedular. Não foram observadas alterações nos tecidos cardíacos de todos os grupos testados.

A única evidência de possível toxicidade causada pelo tratamento com as formulações e não pelo desenvolvimento do tumor foi a presença de moderada e difusa tumefação das células renais, observada apenas nos grupos tratados (Figura 44-d).

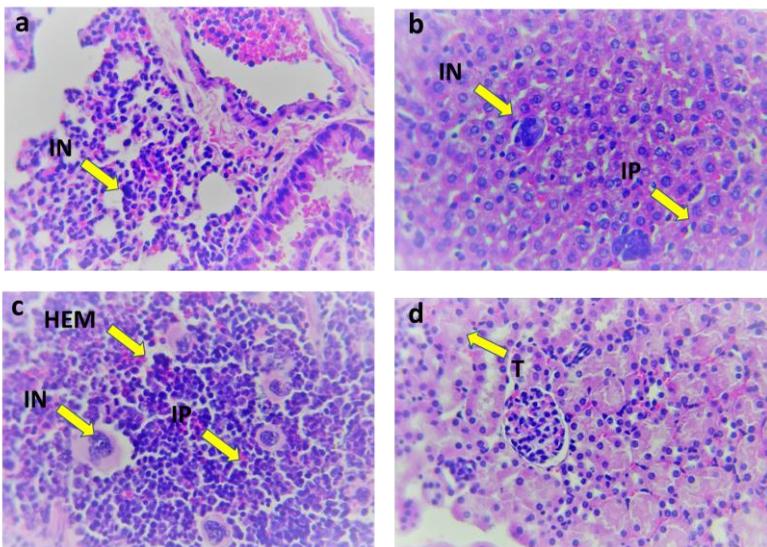


Figura 44 – Imagens histopatológicas de: a) pulmão, b) fígado, c) baço e d) rim de animais controle (salina) ou tratados com nanopartículas híbridas carregando siRNA *BCL-2* ou *BCL-xL*. Tratamento com 4 administrações endovenosas (dias 1, 4, 7 e 12; 1mg/Kg/dose). Órgãos removidos e fixados no 14º dia de tratamento. Imagens obtidas por microscopia de luz, magnificação 400 x, coloração por hematoxilina-eosina. IN=infiltrado neoplásico; IP=infiltrado polimorfonuclear; HEM=hematopoiese extramedular; T=tumefação. Imagens a-c: representativas de todos os grupos. Imagem d; representativa dos grupos NP siBCL-2 e NP siBCL-xL.

4.12 Biodistribuição

A análise de biodistribuição foi realizada após 3 h de administração endovenosa da formulação NP siBCL-xL (1 mg/Kg), marcado com cianina-5. Após a normalização pelo peso dos órgãos e subtraída a autofluorescência, não foi observada sinal fluorescente nos seguintes órgãos: fígado, baço e pulmões. Contudo, foi evidenciado sinal fluorescente no coração, rins e pulmões, como demonstra a Figura 45.

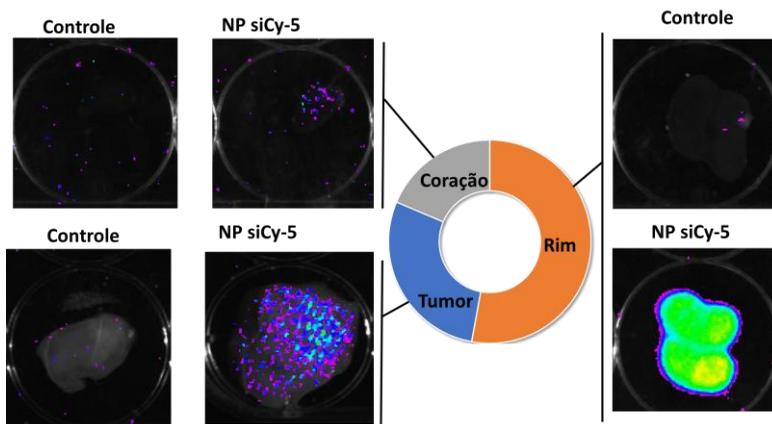


Figura 45 - Biodistribuição de nanopartículas híbridas carregando siRNA-cianina-5 (Cy-5). Fluorescência observada após 3 h de administração endovenosa de nanopartículas híbridas carregando siRNA (1mg/Kg) marcado com fluoróforo cianina-5 (NP siCy5). Normalização pelo peso do órgão e após subtração da autofluorescência. Excitação: 605–665 nm, emissão 800–875 nm. Imagens representativas de n=4.

5 DISCUSSÃO

Para a transfecção de ácidos nucleicos, vetores virais e não-virais têm sido amplamente aplicados na terapia contra o câncer. Contudo, fatores como a biossegurança e a imunogenicidade convergem para a preferência por vetores não-virais. Neste contexto, as nanopartículas inorgânicas, como as desenvolvidas neste estudo, têm sido estudadas visando terapias que envolvem silenciamento gênico no âmbito do câncer (ZHANG; LI; HUANG, 2014).

As sequências de siRNA construídas mostraram-se eficientes no silenciamento dos seus respectivos alvos, produzindo os efeitos apoptóticos desejados. Para o gene alvo *BCL-2*, cuja sequência foi previamente utilizada em outro estudo (TEKEDERELI et al., 2013), os resultados aqui apresentados são compatíveis com os alcançados por aqueles autores, que obtiveram silenciamento parcial, porém significativo do gene *BCL-2* em células MDA-MB-231. Ressalta-se que naquele estudo, o siRNA foi vetorizado por compostos nanoestruturados lipossomais HiPerFect®.

Os testes aqui realizados com o reagente de transfecção Lullaby® permitiram comprovar a efetividade das moléculas de siRNA aplicadas, independente do nanocarreador desenvolvido, atuando como um controle positivo de silenciamento (Figura 9). Embora a transfecção por Lullaby® tenha sido alcançada, ao compará-lo com o nanocarreador desenvolvido neste estudo, aquela formulação é limitada quanto à biocompatibilidade (FILION; PHILLIPS, 1998), justificando o desenvolvimento de nanocarreadores biocompatíveis e mais estáveis, como as nanopartículas híbridas (ZHANG; KATAOKA, 2009).

Embora à partir de 2016, após nova revisão da literatura, novos critérios tenham sido adotados para desenhar oligonucleotídeos de siRNA (FAKHR; ZARE; TEIMOORI-TOOLABI, 2016), os critérios previamente estabelecidos atenderam rigorosamente as novas diretrizes. Assim, a efetividade das novas sequências em promover o silenciamento é atribuída aos parâmetros de desenho, como por exemplo, o conteúdo de citosina e guanina, que foi desenhado no intervalo descrito como ideal. De fato, baixos níveis de pareamento citosina-guanina (C-G) conferem instabilidade à molécula e altos níveis de pares de C-G, embora aumentem a rigidez da molécula, inibem a interação com o complexo RISC (REYNOLDS et al., 2004). Além disso, a alta repetição de nucleotídeos no RNA aumenta a possibilidade de ligações secundárias, o que foi evitado na estratégia de desenho de moléculas aplicada neste estudo. Ainda, observou-se pela ferramenta BLAST que as sequências

desenvolvidas não apresentaram homologia com outros genes, evitando as ligações inespecíficas de siRNA fora dos alvos.

As nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-Poliânion mostraram-se eficazes na entrega de siRNA às células de câncer de mama humano (MCF-7) e murino (4T1). Este fato pode ser comprovado pelos efeitos alcançados em termos de silenciamento, observado tanto pela diminuição direta nos valores de expressão dos genes (Figuras 19 e 21) quanto pela diminuição do teor de proteínas (Figuras 18 e 20). Além do mais, os dados obtidos quanto à citotoxicidade, aumento de apoptose, biodistribuição e redução de crescimento tumoral também comprovam a efetividade em promover o silenciamento dos alvos.

Os resultados obtidos quanto ao tamanho das nanopartículas (Tabela 4) são desejáveis, pois são pequenas o suficiente para serem acumuladas no tumor devido à maior permeabilidade no endotélio capilar (efeito EPR) e grande o bastante para permanecerem mais tempo na circulação, evitando a rápida depuração renal (GONG et al., 2012; ZHANG; LI; HUANG, 2014). O tempo maior na circulação aumenta o potencial da terapia com base no silenciamento por siRNA, especialmente por permitir a entrega eficiente aos tecidos desejados. O tamanho é crucial para a entrega seletiva de siRNA por nanocarreadores, uma vez que tem sido descrito que tamanhos acima de 100 nm são facilmente reconhecidos pelo sistema reticuloendotelial, reduzindo o tempo de meia-vida na circulação sanguínea (ZHANG; LI; HUANG, 2014). Além disso, nanocarreadores menores exibem maior estabilidade coloidal e capacidade intracelular de administração de siRNA. São também menos tóxicos e menos imunogênicos (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012). Neste contexto, os valores de tamanho obtidos (± 69 nm) são compatíveis com outros achados, como o de Pittella et al. (2011), que obtiveram nanopartículas de CaP com tamanho hidrodinâmico médio de 42 nm e aspecto esférico e homogêneo. É relevante destacar que, pelo fato de diferentes siRNAs não alterarem o tamanho das nanopartículas (Figura 11), estas revelaram-se extremamente maleáveis quando ao uso de diferentes oligonucleotídeos. Esta informação também se aplica às nanopartículas sem siRNA (mock), permitindo análises do controle negativo de silenciamento.

As diferenças de tamanho obtidas pela análise por DLS e MET (Tabela 4) são esperadas, uma vez que as camadas de PEG externas ao núcleo de fosfato geralmente não são observáveis por MET. Nesta técnica, o preparo das amostras é realizado a seco, fato que desestabiliza a estrutura do polímero. Entretanto, esta estrutura está disponível para

análise do diâmetro hidrodinâmico por DLS (BACHELET; CHEN, 2016).

Durante a preparação e aplicação de nanopartículas é importante que as unidades produzidas exibam distribuição homogênea em soluções de aplicação biológica. Esta propriedade, alcançada neste estudo, foi demonstrada pela observação das nanopartículas em meio de cultura, por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 15). Esta homogeneidade também foi confirmada pela análise de PDI (Figura 15 e Tabela 4), que é uma medida da heterogeneidade de nanopartículas em uma mistura. Este parâmetro aceita valores de 0 a 1 e os resultados obtidos na faixa de 0,089 – 0,105 são considerados baixos, adequados e consistentes com outros estudos (VERMA; STELLACCI, 2010; HE et al., 2014).

Os valores de potencial zeta obtidos na faixa de -1,22 mV à -1,16 mV (revelam nanopartículas com carga superficial próxima a neutralidade (Tabela 4). Esta propriedade é vantajosa, uma vez que uma menor superfície iônica minimiza a interação entre nanopartículas e possíveis componentes do meio, tanto em aplicações *in vitro* quanto *in vivo* (VERMA; STELLACCI, 2010).

As análises de citotoxicidade mostraram a segurança no uso de nanopartículas contendo CaP, uma vez que as incubações com NP *siScramble* e *Mock* não produziram efeito citotóxico nas concentrações testadas. De fato, estas formulações não reduziram a viabilidade celular com o uso de 30 µg / mL de CaCl₂, concentração do sal utilizado para preparar as formulações. Além disso, os testes com hemólise demonstraram que, quanto a este parâmetro, as nanopartículas são seguras para administração endovenosa. Estes resultados reforçam a biocompatibilidade e estabilidade do CaP já apresentados em outros estudos (ZHANG; KATAOKA, 2009; PITTELLA et al., 2011). Além disso, a adição do revestimento PEG-b-poli(GLU) ao núcleo CaP contribuiu para a estabilidade do nanocarreador, devido à formação de uma camada hidrofílica e biocompatível. Isto porque a presença deste revestimento minimiza a interação entre as nanopartículas e os possíveis componentes do meio, evita a formação de complexos agregados e também contribui para a neutralidade das cargas de superfície (ZHANG; KATAOKA, 2009). Outra vantagem do revestimento PEG é o aumento da capacidade de liberação endossomal por desestabilização da membrana. Após a internalização pela célula, é primordial que o sistema não permaneça retido nesta organela e possa atuar no citosol (PITTELLA et al., 2011). Estes autores utilizaram nanopartículas híbridas revestidas com o polímero PEG-PASP (DET-Aco) a 1000 µg / mL. O polímero PEG-b-poli(GLU)-poliânion utilizado neste estudo também já foi testado

em outro trabalho de nosso grupo de pesquisa envolvendo nanopartículas com núcleo de CaP (SOUZA, 2016). Naquele estudo foi utilizada a concentração de polímero de 1000 µg / mL e foi obtido tamanho médio (DLS) de 53 nm. No presente estudo, a concentração de polímero escolhida foi de 400 µg/mL, o que explica a já mencionada obtenção de nanopartículas maiores, comparadas às obtidas pelos outros autores citados. Isto é explicado pelo fato de que a menor concentração do polímero aplicado proporcionou menos rigidez ao sistema, resultando em nanopartículas um pouco maiores. Em síntese, isto é parte da função de revestimento, pois uma das propriedades do copolímero em bloco é controlar o crescimento do cristal de CaP (ZHANG; LI; HUANG, 2014). De fato, Son & Kim (2017) desenvolveram nanopartículas utilizando CaP e controlaram o crescimento e a estabilidade das estruturas utilizando polímero PEG como revestimento externo, obtendo nanoestrutura esférica e homogênea. Em outro estudo envolvendo nanopartículas CaP também revestidas com PEG-b-poli(GLU), diâmetros médios de 60 nm foram alcançados. O controle do crescimento do bloco de cristal ocorreu, segundo os autores, justamente devido à interação entre o ácido glutâmico do polímero e o Ca^{2+} que evitou a expansão do núcleo de CaP. Esta ação evita a aglomeração e agregação das nanopartículas (MI et al., 2016). Assim, as propriedades observadas neste estudo demonstraram seguramente que o sistema nanocarreador possui grande potencial para a entrega seletiva de siRNA a tumores sólidos.

A resposta citotóxica obtida pelos ensaios de MTT demonstra a capacidade de transfecção dos sistemas transportadores e a efetividade das sequências aplicadas em reduzir a viabilidade das células tumorais MCF-7. As células MCF-7 são do tipo luminal A, expressando receptor de estrogênio (ER+) e estudos apontam este hormônio como um promotor da resistência a quimioterápicos via expressão aumentada dos genes BCL-2 (VIEDMA-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Os efeitos sobre a viabilidade celular pelo silenciamento de genes antiapoptóticos baseados em siRNA já foram demonstrados em vários tipos de câncer, porém com outras formas de vetorização (Tekedereli et al., 2013, Li et al., 2015). A incubação com siRNA livre (*naked*) não mostrou efeito citotóxico (Figuras 22-25 e 27-30), ressaltando a necessidade do nanocarreador.

A atividade antiapoptótica via proteína BCL-2 apresenta-se como uma estratégia protetora contra estressores que podem desequilibrar a relação sobrevivência / morte das células tumorais. Este aspecto está amparado no fato de que as células tumorais usam as rotas de escape da apoptose mediante agentes quimioterápicos (CHEN et al., 2014; Qian et

al., 2015). De fato, os efeitos citotóxicos de uma quimioterapia padrão são mais pronunciados quando combinado com o silenciamento de genes antiapoptóticos (O'CONNOR et al., 2006), como os genes *BCL-2* e o *BCL-xL*. O presente estudo comprovou que o silenciamento destes alvos trouxe efeito adicional em relação à toxicidade, como pôde ser observado pela diminuição da CC_{50} da doxorrubicina (Figuras 26 e 31). Em outro estudo envolvendo tumor de ovário, foi observado efeitos da terapia combinada de doxorrubicina e siRNA contra o gene *BCL-2* carregados conjugadamente por nanolipossomas (CHEN et al., 2014). Estes autores observaram, notavelmente, que a incubação de doxorrubicina com as nanomicelas carregando siRNA *scramble* duplicou a expressão da proteína BCL-2, evidenciando que esta é uma via de escape tipicamente relacionada ao fenômeno de resistência ao quimioterápico. Por outro lado, observaram a diminuição significativa da viabilidade das células tumorais de ovário, quando a incubação ocorreu com nanomicelas carregando siRNA-*BCL-2* e doxorrubicina. Ainda naquele estudo, os resultados obtidos em modelos tumorais murinos, mostraram potencial notável de co-distribuição de siRNA e doxorrubicina às células tumorais, com evidente acumulação no tumor e sensibilização das células tumorais à quimioterapia via modulação do gene *BCL-2*. A redução da concentração necessária do quimioterápico para produzir este resultado corrobora os achados neste estudo, aqui observados em tumor de mama e aplicando nanopartículas híbridas. Embora a terapia combinada pareça perfeita à primeira vista, o maior desafio associado à co-entrega de siRNAs e fármacos é a seleção de um nanocarreador apropriado. Isto deve-se ao fato de que os siRNAs são normalmente carregados negativamente e possuem maior peso molecular comparados aos medicamentos quimioterápicos, que são geralmente hidrofóbicos (DARVISHI; FARAHMAND; MAJIDZADEH-A, 2017).

Os resultados observados no incremento da taxa de apoptose reforçam a assertiva de que a resistência à doxorrubicina está relacionada com a resistência aos sinais apoptóticos. Ainda, devido aos efeitos sinérgicos, a terapia combinada com o silenciamento de genes antiapoptóticos pode retardar o aparecimento de resistência múltipla à fármacos, bem como reduzir os efeitos citotóxicos indesejáveis relacionados às doses mais altas (LEHÁR et al., 2009).

Em relação ao tempo de ação da formulação NP siBCL-2, os resultados apresentados em citotoxicidade são compatíveis com o fato de que os melhores efeitos apoptóticos são alcançados de três a cinco vezes o tempo de meia vida da proteína BCL-2 (O'CONNOR et al., 2006), que é de 20h (BLAGOSKLONNY et al., 1996). Isto explica os resultados do

sistema NP siBCL-2 que não reduziu a viabilidade das células tumorais em até 48 h de incubação (Figuras 22 e 23).

Os resultados relacionados à citotoxicidade induzida pela formulação NP siBCL-xL são consistentes com os resultados de Othman et al. (2013), que obtiveram diminuição da viabilidade celular em 58 %, incubando células de câncer de pulmão com siRNA-*BCL-XL* transportado para um reagente comercial de transfecção.

Ao incubar as células MCF-7 com a formulação NP siBCL-xL e doxorrubicina, verificou-se um aumento moderado da citotoxicidade produzida pelo quimioterápico, uma vez que a CC_{50} foi reduzida (Figura 31). O efeito foi discreto se comparado com o obtido quando o alvo era o gene *BCL-2* (Figura 26). Este fenômeno parece estar relacionado com o efeito citotóxico da própria doxorrubicina, que está associada à diminuição da expressão de *BCL-xL* e ao aumento da atividade do gene pró-apoptótico *BAX* (SHARIFI et al., 2015). Estes autores, quando incubaram células de câncer de mama MCF-7 com doxorrubicina, encontraram uma diminuição da expressão de *BCL-xL* em 80% na concentração de doxorrubicina de 0,1 μ M após 48 h e um aumento de quatro vezes na expressão da proteína *Bax*. Aqui, a expressão de *BCL-2* foi maior do que a de *BCL-xL*, e, portanto, a combinação de silenciamento de genes por siRNA e o efeito citotóxico por doxorrubicina tem um impacto maior nas células tumorais ao silenciar o gene *BCL-2* em comparação com o silenciamento do gene *BCL-xL*.

Embora o efeito da terapia combinada tenha sido menor do ponto de vista da citotoxicidade, na promoção do silenciamento de genes com NP siBCL-xL foi observado um aumento significativo da apoptose (Figuras 34 e 35), neste caso mais pronunciado que o observado para o alvo *BCL-2* (Figuras 32 e 33). Estes achados contribuem para a confirmação de que o envolvimento do gene *BCL-xL* no mecanismo de resistência é menor. Também permitem inferir sobre eficiência do nanocarreador em promover a entrega e a efetividade do silenciamento gênico promovido pelo siRNA.

Mesmo que os resultados apresentados mostrem que ambas as formulações testadas produzem efeito citotóxico sobre as células não tumorais, o índice de seletividade obtido revela que há maior toxicidade sobre as células tumorais (Tabela 6). Isto porque índices de seletividade superiores a 1 apontam para maior sensibilidade de células tumorais ao agente testado (POPIOŁKIEWICZ et al., 2005). Estes resultados podem ser atribuídos à maior expressão dos genes alvo, conforme já discutido anteriormente. Ainda, é relevante destacar que, mesmo produzindo efeitos citotóxicos sobre células não tumorais, o carreamento do siRNA

pela nanopartícula aumenta a chance de acumulação no tecido tumoral pelo efeito EPR, também já mencionado.

Um aumento na contagem de células positivas para anexina V-FITC após 48 h de incubação com doxorrubicina e precedida pela incubação com as formulações NP siBCL-2 ou NP siBC-xL constituem fortes indícios de apoptose (Figuras 32 e 35). Isto porque células marcadas com este corante são positivas para apoptose, face à externalização do componente fosfolipídico fosfatidilserina pela membrana celular (ARUR et al., 2003).

A diferenciação do tipo de morte por apoptose ou necrose é tipicamente realizada pela análise de outro corante, o iodeto de propídeo. No entanto, devido à emissão de fluorescência intrínseca da doxorrubicina (emissão:480 nm e excitação: 590 nm), na mesma faixa do iodeto de propídeo, esta análise não pôde ser realizada. No entanto, a morte celular por apoptose foi confirmada pela observação da alteração da morfologia nuclear, mais precisamente da condensação da cromatina (Figuras 36 e 37). Esta é uma das alterações morfológicas mais notáveis nas células em apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972) e, juntamente com os resultados obtidos pelo ensaio de anexina V-FITC, permitem inferir seguramente sobre os eventos apoptóticos. SUO et al.(2017), também obtiveram aumento da taxa de apoptose e atividade antitumoral, via silenciamento do gene *BCL-2* mediado por entrega combinada de siRNA e doxorrubicina em nanopartículas catiônicas revestidas por folato.

A apoptose não é dependente exclusivamente da supressão dos genes antiapoptóticos, mas também mobilizada pela expressão de genes pró-apoptóticos (BAX e BAK, por exemplo), como mostrou estudo de silenciamento deste último grupo de proteínas (WEI et al., 2011). Isto contribui para explicar o fato de, tanto o efeito citotóxico, quanto a taxa de apoptose obtida não ter sido total, demandando mais estudos no âmbito do silenciamento dos genes pró-apoptóticos. Um exemplo é a cinética do silenciamento do gene *BCL-xL*, que promove a depleção proteica em 48 h, diminuindo a interação com as proteínas pró-apoptóticas. No entanto, as proteínas pró-apoptóticas precisam estar presente para produzir seus efeitos apoptóticos (CASTILLA et al., 2006). O aumento na taxa de apoptose, observada após as incubações com Np siBCL-xL e doxorrubicina, é compatível com os achados de Li et al. (2015). Em câncer de ovário, estes autores demonstraram que a apoptose que ocorre em presença de doxorrubicina está relacionada com a diminuição do teor citoplasmático da proteína BCL-xL. Para tanto, utilizaram inibição farmacológica e nanocarreadores baseados em dióxido de silício.

Os resultados aqui obtidos confirmam então o fato de a resistência desenvolvida pelas células à doxorubicina é promovida pelas vias antiapoptóticas, cujo silenciamento aumenta o efeito do fármaco.

Embora seja postulado que a proteína antiapoptótica BCL-2 desempenhe um papel crucial na sobrevivência do tumor (Chen et al. 2014) e a superexpressão do gene ocorra na maioria dos tipos de câncer, a análise do conteúdo basal (Figura 17) mostrou-se diferente entre os subtipos de carcinomas mamários. Estudos apontam que a atividade da proteína BCL-2 de fato varia nos diferentes subtipos de tumor sendo menor em células de câncer de mama triplo negativas (KALLEL et al., 2015). De fato, células de câncer de mama ER (-), como as células MDA-MB-231, expressam menos BCL-2 do que as ER (+), como a linhagem MCF-7 (TEKEDERELI et al., 2013). Esta informação é importante no contexto de desenvolvimento de novas terapêuticas, baseadas em cada perfil clínico e ou molecular.

Os resultados dos ensaios *in vitro*, relativos à expressão do gene *BCL-2* e *BCL-xL* e a análise do teor das respectivas proteínas, comprovaram a efetividade das formulações testadas, tanto na capacidade de transfecção quanto no potencial de silenciamento gênico em células câncer de mama MCF-7. Os tempos de incubação tanto para o PCR quantitativo (48 h) de quanto para o ensaio de *western blot* (72 h) são atribuídos aos tempos de internalização do sistema nanocarreador, liberação endossomal (PITTELLA et al., 2011) e, finalmente à interferência junto ao RNAm, além da relação com a meia vida da proteína BCL-2, já discutida e BCL-xL que é de 18 h (CASTILLA et al., 2006). Esta informação é sustentada também pelos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, já que não foi encontrado efeito citotóxico em até 48 h de incubação para nenhuma das formulações.

O silenciamento do gene *BCL-2* em células MCF-7 por RNA de interferência cessa cerca de 48 h e a expressão do gene *BCL-2* reinicia logo após este tempo (TALAIYZADEH et al., 2015), o que pode explicar a expressão residual da proteína nas condições de ensaio usadas neste estudo. Explicam também o fato de não haver incremento de citotoxicidade em 96 h de incubação (Figura 25). Entretanto, os resultados mostraram que a diminuição da expressão do gene *BCL-2* e *BCL-xL*, embora não tenha sido total, produziu os eventos citotóxicos e apoptóticos em uma estratégia combinada de incubação.

A taxa de silenciamento do gene *BCL-2* obtido neste estudo é compatível com outros trabalhos, envolvendo outros tipos de câncer. A expressão do gene *BCL-2* por siRNA, por exemplo, foi reduzida em 55% em câncer de ovário, neste caso utilizando nanopartículas híbridas com

outro poliânion (PEG-Pasp), após 48 horas de incubação (CHEN et al., 2014). Da mesma forma, Liu; Lu, (2013), obtiveram 65% de silenciamento do gene *BCL-2* transfetando siRNA por lipo-lectamina®, em um estudo envolvendo câncer gástrico. Para o gene *BCL-xL*, já foi obtido taxa de silenciamento por siRNA na ordem de 75%, porém em estudo com câncer de pulmão (OTHMAN et al., 2013).

Os resultados apresentados nos testes realizados *in vivo* mostraram que a formulação NP siBCL-2 (1 mg/Kg/dose), comparativamente com o controle, retardou o crescimento tumoral, evidenciado pelas medições do 12º e 14º dia de tratamento. A inibição do crescimento tumoral é compatível com os resultados encontrados na avaliação da expressão do gene *BCL-2* (Figura 40), que foi significativamente reduzida para 62% (avaliada no 14º dia do tratamento). Os resultados obtidos nos modelos murinos confirmam os resultados apresentados nos testes *in vitro*, especialmente nos tempos de internalização, tráfego intracelular, silenciamento do RNAm e finalmente efeito apoptótico, resultando na diminuição do crescimento tumoral. Os achados apontam a necessidade de maior tempo de tratamento ou maior intervalo entre a última administração endovenosa e a análise da expressão gênica. Esta afirmação é corroborada pelos resultados obtidos pela quantificação do teor de proteína *BCL-2* (Figura 42), que não mostrou diminuição significativa. Este resultado é atribuído ao tempo para a formulação NP siBCL-2 desempenhar seus efeitos biológicos somado ao tempo de meia-vida da proteína *BCL-2*, já anteriormente discutido.

Outros estudos mostram que, de fato, o silenciamento total do gene *BCL-2* por RNA de interferência não é alcançado. Isto é atribuído ao caráter temporário dos complexos silenciadores e a dinâmica de expressão e manutenção do teor citoplasmático da proteína. Estudos com silenciamento *in vivo*, em câncer de pulmão mostraram diminuição de 70% da expressão gênica (CAI et al., 2017). O mesmo valor foi conseguido por Tekedereli et al. (2013), neste caso em estudo de câncer de mama como células humanas MCF-7 em camundongos *nude*.

Quanto à inibição do crescimento tumoral obtida, em outro estudo dos efeitos de compostos hidrazídicos foi demonstrada a inibição do crescimento de tumor de mama, relacionada à modulação da expressão da proteína *BCL-2*, também utilizando o modelo tumoral murino BALB/c inoculados com células 4T1 (MOUSAVI et al., 2017). Estes autores atribuem aos seus resultados o fato de a sobrevivência neste tipo de tumor depender do gene *BCL-2*, o que foi confirmado no presente estudo.

A formulação NP siBCL-2 não mostrou sinais evidentes de toxicidade sistêmica, observados pela manutenção do peso corporal

durante todo o período experimental (Tabela 7). Ainda, durante o desenvolvimento do modelo tumoral ou tratamento, não foram observados sinais de dor ou desconforto como piloereção, diminuição da atividade exploratória, vocalização, inapetência ou outra alteração comportamental associada à estresse (BEYNEN et al., 1987).

Embora o número de animais do experimento com NP siBCL-xL tenha sido reduzido, dificultando inferir com segurança sobre os resultados, alguns indícios podem ser apontados e servir como plataforma para estudos futuros, especialmente no quesito tempo-dependência de resposta biológica. Neste contexto, a inibição do crescimento do tumor não foi observada de forma significativa (Figura 39). No entanto, embora não tenha sido observado diminuição da expressão do gene *BCL-xL* por PCR quantitativa (Figura 41), a diminuição do teor de proteína BCL-xL reduziu discretamente (Figura 43). Estudos adicionais serão necessários para apontar se estes achados são resultantes do tamanho amostral ou estão relacionados com a dinâmica temporal associada à expressão gênica e seus efeitos sobre a apoptose. O fato é que os indícios parecem estar relacionados a estes fatores e não a uma falha no sistema de entrega pelo nanocarreador. Este mostrou-se eficiente, já que promoveu algum dos efeitos biológicos desejados em todos os tratamentos, como queda da expressão gênica, diminuição do teor da proteína alvo e/ou inibição do crescimento tumoral. Esta inferência também é embasada no fato de o ensaio de biodistribuição ter evidenciado a presença da formulação NP siCy5 no tumor.

A análise histopatológica revelou intensa atividade metastática, derivada dos tumores implantados nos modelos murinos. Como não foram achadas diferenças, quanto a este parâmetro, entre os grupos controle e tratados com as formulações, é possível inferir que estas não inibiram a formação de metástases nas condições testadas. Embora a formulação NP siBCL-2 tenha inibido o crescimento dos tumores, os eventos metastáticos podem ter ocorrido anteriormente ao tratamento. Tal assertiva é amparada no alto grau de invasão dos tecidos pulmonares e hepáticos, que se mostraram em estágio avançado. A metástase depende do sucesso das células tumorais em invadir, adentrar a circulação, sobreviver nela, extravasar e proliferar em um órgão distante do sítio inicial (AZNAVOORIAN et al., 1993). O alto grau de metástase observado, especialmente nos pulmões, é típico da linha celular de carcinoma mamário 4T1, que é frequentemente utilizada como modelo metastático murino (YANG; ZHANG; HUANG, 2012).

As características teciduais típicas de processo inflamatório que foram encontradas ocorrem exclusivamente no órgãos e/ou animais nos

quais se evidenciou metástases (Figura 44). Desta forma, já que não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e tratados, a inflamação é atribuída aos infiltrados neoplásicos e não às formulações administradas. Além do mais, a inflamação em órgãos como fígado e baço é uma característica da invasão destes locais por células neoplásicas (TAO et al., 2008).

Embora o fenômeno da hematopoiese extramedular seja descrita tipicamente como um mecanismo fisiológico compensatório, os achados em algumas amostras de baço (Figura 44-c) revelam que, no contexto de metástases, a origem da hematopoiese não está associado às células tronco deste órgão, mas ocorrem pela desordem originada de infiltrados neoplásicos (O'KEANE et al., 1989). O fato é que os resultados mostram que esta disfunção evidenciada em amostras de baço não está associada ao tratamento, mas à metástase em si, já que foram encontradas em todos os grupos. Além do mais, os achados de Tao et al. (2008) revelam a hematopoiese extramedular ocorre já na segunda semana após a implantação das células tumorais, portanto anterior ao tratamento com as formulações testadas.

A presença de tumefação nos rins dos animais dos grupos tratados (Figura 44-d), embora discreta, revela maior atividade destes órgãos, possivelmente associado à excreção dos íons presentes nas nanopartículas, como o Ca^+ e o PO_4^- (BLAINE; CHONCHOL; LEVI, 2015). Esta informação é fortemente corroborada pelos achados no ensaio de biodistribuição, que mostraram intensa fluorescência nos rins dos animais que receberam injeção endovenosa de nanopartículas híbridas marcadas com cianina-5 (Figura 45). A atribuição das alterações renais ao próprio mecanismo de excreção concorda com os resultados de Pittella et al. (2014), que demonstraram que nanopartículas baseadas em CaP são, de fato, excretadas pelos rins.

Os resultados aqui obtidos demonstraram principalmente a capacidade de entrega de ácidos nucléicos às células tumorais por nanopartículas híbridas CaP-PEG-b-poli(GLU)-Poliânion. Como principal vantagem da formulação desenvolvida em relação às demais formulações discutidas, está a facilidade de preparação, realizada por automontagem de seus constituintes orgânicos e inorgânicos. Também se destaca à biocompatibilidade e o baixo custo, se comparado com outros tipos de nanocarreadores.

6 CONCLUSÕES

Os sistemas nanocarreadores CaP-PEG-b-poli(GLU)-Poliânion obtidos exibiram propriedades adequadas para as aplicações terapêuticas testadas. Mostraram-se também eficazes em promover a transfecção das moléculas de siRNA às células alvos, como pôde ser comprovado pelos efeitos biológicos obtidos. Exibiram também alta estabilidade e baixa toxicidade sobre tecidos não tumorais, resultando em um sistema com potencial terapêutico promissor.

Os resultados apresentados mostraram que as sequências de siRNA *BCL-2* e *BCL-xL* aplicadas promoveram o silenciamento dos respectivos genes, culminando nos efeitos biológicos *in vitro*: citotoxicidade sobre células humanas de carcinoma mamário, aumento da taxa de apoptose e aumento da atividade citotóxica da doxorrubicina. Ainda, a diminuição da expressão do gene *BCL-2* obtida nos ensaios *in vivo*, resultou na inibição do crescimento tumoral.

Desta forma, os resultados confirmam as hipóteses alternativas levantadas e comprovam a complexidade das interações entre as proteínas pró e antiapoptóticas, bem como, a relevância destas interações para o equilíbrio entre sobrevivência e morte das células de câncer de mama.

Confirmam ainda, o postulado de que a terapia combinada pode ser uma abordagem efetiva para superar a resistência aos quimioterápicos, especialmente aqueles associados às vias apoptóticas.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para os estudos com as formulações NP siBCL-2 e NP siBCL-xL, sugere-se:

- Realizar estudos adicionais *in vivo* de toxicidade aguda e crônica, envolvendo diferentes tempos, concentrações e modelos experimentais sem tumor;
- Reavaliar o silenciamento gênico, sob uma perspectiva temporal dos efeitos das formulações sobre a expressão gênica e conteúdo proteico;
- Reanalisar a biodistribuição também numa perspectiva de tempo de acumulação e eliminação renal;
- Aumentar o universo amostral dos ensaios *in vivo* com a formulação NP siBCL-xL.

8 REFERÊNCIAS

AMERES, S. L.; MARTINEZ, J.; SCHROEDER, R. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 101–112, 2007.

ANTONI, S. et al. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. n. November 2015, p. 174–184, 2016.

ANVEKAR, R. A. et al. Born to be Alive: A Role for the BCL-2 Family in Melanoma Tumor Cell Survival, Apoptosis, and Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 1, n. October, p. 1–16, 2011.

ARUR, S. et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Developmental Cell**, v. 4, n. 4, p. 587–598, 2003.

AZNAVOORIAN, S. et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. **Cancer**, v. 71, n. 4, p. 1368–1383, 1993.

BACHELET, M.; CHEN, R. Self-assembly of PEGylated Gold Nanoparticles with Satellite Structures as Seeds. **Chem. Commun.**, v. 52, p. 9542–9545, 2016.

BEEKMAN, A. M.; HOWELL, L. A. Small-Molecule and Peptide Inhibitors of the Pro-Survival Protein Mcl-1. **ChemMedChem**, p. 802–813, 2015.

BENSON, J. R.; JATOI, I. The Global Breast Cancer Burden. **Future Oncol.**, v. 8, n. 6, 2012.

BERNSTEIN, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363–366, 2001.

BEYNEN, A C. et al. Assessment of discomfort in gallstone-bearing mice: a practical example of the problems encountered in an attempt to recognize discomfort in laboratory animals. **Laboratory animals**, v. 21, n. 1, p. 35–42, 1987.

BLAGOSKLONNY, M. V et al. Pergamon bcl-2 PROTEIN DIFFERENTIATION IS NOT REQUIRED FOR OF MULTIDRUG

RESISTANT HL60 LEUKEMIA. **Leukemia Research**, v. 20, n. 2, p. 101–107, 1996.

BLAINE, J.; CHONCHOL, M.; LEVI, M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 7, p. 1257–1272, 2015.

BOISE, L. H. et al. Bcl-X, a Bcl-2-Related Gene That Functions As a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 597–608, 1993.

BRASIL. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

BRASIL. **Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro-Brasil: [s.n.].

CAI, R. et al. Charge reversible calcium phosphate lipid hybridnanoparticle for siRNA delivery. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 42772–42788, 2017.

CARRARO, D. M. et al. Comprehensive Analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 Germline Mutation and Tumor Characterization: A Portrait of Early-Onset Breast Cancer in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 7–9, 2013.

CASTILLA, C. et al. Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4960–4967, 2006.

CHEN, W. et al. Co-delivery of doxorubicin and siRNA with reduction and pH dually sensitive nanocarrier for synergistic cancer therapy. **Small**, v. 10, n. 13, p. 2678–2687, 2014.

CHITTENDEN, T. et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **The EMBO journal**, v. 14, n. 22, p. 5589–5596, 1995.

COTTER, T. G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. v. 9, n. july, p. 501–507, 2009.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL - 2 protein family : implications for physiology and therapy. **Molecular Cell Biology**, v.

15, n. 1, p. 49–63, 2014.

DARVISHI, B.; FARAHMAND, L.; MAJIDZADEH-A, K. Stimuli-Responsive Mesoporous Silica NPs as Non-viral Dual siRNA/Chemotherapy Carriers for Triple Negative Breast Cancer. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 7, n. June, p. 164–180, 2017.

DE FOUGEROLLES, A. et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 6, p. 443–453, 2007.

DONEPUDI, M. S. et al. Breast cancer statistics and markers. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 506–11, 2014.

EDLICH, F. et al. Bcl-xL retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. **Cell**, v. 145, n. 1, p. 104–116, 2011.

ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21 ± nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494–498, 2001.

EMBLEY, T. M.; MARTIN, W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. **Nature**, v. 440, n. 7084, p. 623–630, 2006.

EUHUS, D. et al. Tumor measurement in the nude mouse. **J Surg Oncol.**, v. 31, n. 4, p. 229–34, 1986.

FAKHR, E.; ZARE, F.; TEIMOORI-TOOLABI, L. Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing. **Cancer Gene Therapy**, v. 23, n. 4, p. 73–82, 2016.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. **IARC CancerBase**, v. 11, 2013.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FILION, M. C.; PHILLIPS, N. C. Major limitations in the use of cationic liposomes for DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 162, n. 1–2, p. 159–170, 1998.

FOX, J. L.; MACFARLANE, M. Targeting cell death signalling in cancer: minimising “Collateral damage”. **British Journal of Cancer**, n. November 2015, p. 1–7, 2016.

FRESQUET, V. et al. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. **Blood**, v. 123, n. 26, p. 4111–4119, 2014.

GONG, J. et al. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. **Journal of Controlled Release**, v. 159, n. 3, p. 312–323, 2012.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M. G.; THOMPSON, C. B. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 15, p. 5680–5689, 2000.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. . for the Assay Adenovirus of Infectivity of. **Virology**, v. 467, n. 52, p. 456–467, 1973.

GROSS, A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, p. 10–13, 2016.

HE, C. et al. Nanoscale metal-organic frameworks for the co-delivery of cisplatin and pooled siRNAs to enhance therapeutic efficacy in drug-resistant ovarian cancer cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 14, p. 5181–5184, 2014.

HONMA, N. et al. Differences in clinical importance of Bcl-2 in breast cancer according to hormone receptors status or adjuvant endocrine therapy. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 698, 2015.

HUMPHREYS, R. C. et al. Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 12, p. 4013–4022, 1996.

ICHIM, G. et al. Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. **Molecular Cell**, v. 57, n. 5, p. 860–872, 2015.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology: Gold Book**, 1997.

JEONG, S.-Y. et al. Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. **The EMBO journal**, v. 23, n. 10, p. 2146–55, 2004.

JHAVERI, A. M.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 APR, n. April, p. 1–26, 2014.

JONES, D. Teaming up to tackle RNAi delivery challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 7, p. 525–526, 2009.

JUIN, P. et al. Decoding and unlocking the BCL - 2 dependency of cancer cells. **Cancer**, v. 13, n. July, 2013.

KAKIZAWA, Y.; FURUKAWA, S.; KATAOKA, K. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 2, p. 345–356, 2004.

KALLEL, I. et al. What common biomarkers characterize a triple-negative profile in breast cancer? Quels sont les biomarqueurs qui caractérisent le profil triple négatif du cancer de sein ? **Pathologie Biologie**, v. 63, p. 224–229, 2015.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 239, n. 26, p. 240–257, 1972.

KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. Biomaterials A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7138–7150, 2012.

KIM, D. H.; ROSSI, J. J. Strategies for silencing human disease. **Genetics**, v. 8, n. March, p. 173–184, 2007.

KIM, H. J. et al. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 104, p. 61–77, 2016.

KIRAZ, Y. et al. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumor Biology**, 2016.

KOBAYASHI, H.; TOMARI, Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 71–81, 2016.

KOJIMA, H. et al. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. **J Biol Chem**, v. 273, n. 27, p. 16647–16650, 1998.

KRAJEWSKA, M. et al. Elevated Expression of Bcl-X and Reduced Bak in Primary Colorectal Adenocarcinomas Elevated Expression of Bcl-X and Reduced Bak in Primary Colorectal. **Cancer Research**, v. 56, n. 619, p. 2422–2427, 1996a.

KRAJEWSKA, M. et al. Immunohistochemical Analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 Expression in Prostate Cancers. **American Journal of Pathology**, v. 148, n. 5, p. 1567–76, 1996b.

KRAJEWSKI, S. et al. Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. **Cancer Res**, v. 53, n. 19, p. 4701–14, 1993.

LEE, S. J. et al. Delivery strategies and potential targets for siRNA in major cancer types. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2016.

LEHÁR, J. et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 9, p. 864–864, 2009.

LI, H. et al. Matrine inhibited proliferation and increased apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells via upregulation of Bax and downregulation of Bcl-2. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 11, p. 14793–14799, 2015.

LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 479–89, 1997.

LIAO, W. et al. Powering up the molecular therapy of RNA

interference by novel nanoparticles. **Biomater Sci**, v. 4, p. 1051–1061, 2016.

LIU, H. T.; LU, C. L. Effect of silencing Bcl-2 expression by small interfering RNA on radiosensitivity of gastric cancer BGC823 cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 1, p. 49–52, 2013.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measure with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265–75, 1951.

MA, D. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. **Nanoscale**, v. 6, n. 12, p. 6415, 2014.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1–2, p. 271–284, 2000.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy - mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent Smancs. **Cancer Res**, v. 46, n. 12, p. 6387–6392., 1986.

MCPHERSON, K.; STEEL, C. M.; DIXON, J. M. ABC of breast diseases: Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **Bmj**, v. 321, n. 7261, p. 624–628, 2000.

MI, P. et al. A pH-activatable nanoparticle with signal-amplification capabilities for non-invasive imaging of tumour malignancy. **Nature Nanotechnology**, n. May, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTOYAMA, N. et al. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. **Science**, v. 10, n. 267, p. 1506–10, 1995.

MOUSAVI, E. et al. In vitro and in vivo assessments of two novel hydrazide compounds against breast cancer as well as mammary tumor cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 1195–1203, 2017.

National Center for Biotechnology Information (NCBI).
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

NGUYEN, M. et al. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 34, p. 25265–25268, 1993.

O'CONNOR, O. A. et al. The combination of the proteasome inhibitor bortezomib and the Bcl-2 antisense molecule oblimersen sensitizes human B-cell lymphomas to cyclophosphamide. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 9, p. 2902–2911, 2006.

O'KEANE, J. et al. Hematopoiesis in metastatic carcinoma. **Cancer**, v. 63, p. 1539–1543, 1989.

OLOPADE, O. et al. Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. **Cancer J Sci Am**, v. 3, n. 4, p. 230–7, 1997.

ORTEGA JACOME, G. P. et al. Environmental exposure and breast cancer among young women in Rio de Janeiro, Brazil. **J Toxicol Environ Health A.**, v. 73, n. 13–14, p. 858–865, 2010.

OTHMAN, N. et al. Bcl-xL silencing induces alterations in hsa-miR-608 expression and subsequent cell death in A549 and SK-LU1 human lung adenocarcinoma cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–14, 2013.

PECOT, C. RNAi in the clinic: challenges and future directions. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 1, p. 59–67, 2011.

PENET, M. F. et al. MR-Eyes for Cancer: Looking within an Impenetrable Disease. **NMR Biomed**, v. 26, n. 7, p. 745–755, 2013.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PITTELLA, F. et al. Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 3106–3114, 2011.

PITTELLA, F. et al. Systemic siRNA delivery to a spontaneous

pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 178, n. 1, p. 18–24, 2014.

POPIOŁKIEWICZ, J. et al. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. **Cancer letters**, v. 229, n. 1, p. 67–75, 2005.

PRUITT, S. K. **Immunotherapy of Melanoma With Tumor Antigen RNA and Small Inhibitory RNA Transfected Autologous Dendritic Cells**. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00672542>>.

PULASKI, B.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Curr Protoc Immunol.**, v. 20, 2001.

QIU, C. et al. Systemic delivery of siRNA by hyaluronan-functionalized calcium phosphate nanoparticles for tumor-targeted therapy. **Nanoscale**, v. 8, n. 26, p. 13033–13044, 2016.

RADISKY, D. C.; HIRAI, Y.; BISSELL, M. J. Delivering the message: epimorphin and mammary epithelial morphogenesis. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 8, p. 426–434, 2003.

RAMANATHAN, R. K. et al. A Phase 1 Dose Escalation Study of TKM-080301, a RNAi Therapeutic Directed Against PLK1, in Patients With Advanced Solid Tumors. **American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013**, p. 1–18, 2013.

RAUTUREAU, G. J. P.; DAY, C. L.; HINDS, M. G. Intrinsically disordered proteins in Bcl-2 regulated apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1808–1824, 2010.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v. 17, n. 25, p. 3225–3236, 1998.

REYNOLDS, A. et al. Rational siRNA design for RNA interference. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 326–30, 2004.

REZAEI ARAGHI, R.; KEATING, A. E. Designing helical peptide inhibitors of protein–protein interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 39, p. 27–38, 2016.

SAAD, M.; GARBUZENKO, O. B.; MINKO, T. Co-delivery of siRNA and an anticancer drug for treatment of multidrug-resistant cancer. **Lipids**, v. 3, n. 6, p. 761–776, 2009.

SAFE, S. Targeting apoptosis pathways in cancer - Letter. **Cancer Prevention Research**, v. 8, n. 4, p. 338, 2005.

SCHULTHEIS, B. et al. First-in-human phase I study of the liposomal RNA interference therapeutic Atu027 in patients with advanced solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 36, p. 4141–4148, 2014.

SHARIFI, S. et al. Doxorubicin Changes Bax /Bcl-xL Ratio, Caspase-8 and 9 in Breast Cancer Cells. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. 3, p. 351–9, 2015.

SHIMIZU, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nature cell biology**, v. 6, n. 12, p. 1221–1228, 2004.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SOCHALSKA, M. et al. Lessons from gain- and loss-of-function models of pro-survival Bcl2 family proteins: Implications for targeted therapy. **FEBS Journal**, v. 282, n. 5, p. 834–849, 2015.

SON, K. D.; KIM, Y.-J. Anticancer activity of drug-loaded calcium phosphate nanocomposites against human osteosarcoma. **Biomaterials Research**, v. 21, n. 1, p. 13, 2017.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869–74, 2001.

SOUZA, G. R. R. **DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS PARA TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA: SILENCIAMENTO DE GENES-CHAVE NA SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM CÂNCER DE MAMA.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

SUN, Y. et al. Synthesis of calcium phosphate/GPC-mPEG hybrid

porous nanospheres for drug delivery to overcome multidrug resistance in human breast cancer. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 5128–5136, 2012.

SUO, A. et al. Folate-decorated PEGylated triblock copolymer as a pH/reduction dual-responsive nanovehicle for targeted intracellular co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 659–672, 2017.

TABERNERO, J. et al. First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 4, p. 406–417, 2013.

TALAEZADEH, A. et al. Time depended Bcl-2 inhibition might be useful for a targeted drug therapy. **Cancer cell international**, v. 15, p. 105, jan. 2015.

TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC cancer**, v. 8, p. 228, 2008.

TEKEDERELI, I. et al. Therapeutic Silencing of Bcl-2 by Systemically Administered siRNA Nanotherapeutics Inhibits Tumor Growth by Autophagy and Apoptosis and Enhances the Efficacy of Chemotherapy in Orthotopic Xenograft Models of ER (-) and ER (+) Breast Cancer. **Molecular therapy. Nucleic acids**, v. 2, n. May, p. e121, 2013.

THOMAS, S. et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 17, n. 1, p. 61–75, 2013.

TSUJIMOTO, Y. et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science**, v. 226, n. 4678, p. 1097–1099, 1984.

TSUJIMOTO, Y. et al. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 228, p. 1440–1443, 1985.

TU, Y. et al. BCL-X Expression in Multiple Myeloma : Possible Indicator of Chemoresistance1. **Cancer Research**, v. 58, n. 2, p. 256–262, 1998.

TURNER, J. J. et al. MALDI-TOF mass spectral analysis of siRNA

degradation in serum confirms an RNase A-like activity. **Mol. BioSyst.**, v. 3, n. 1, p. 43–50, 2007.

TYSON, J. J. et al. Dynamic modeling of estrogen signaling and cell fate in breast cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 7, p. 523–532, 2011.

UM, H. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. v. 7, n. 5, 2015.

VAN KESSEL, K. E. M. et al. Targeted therapies in bladder cancer: an overview of in vivo research. **Nature reviews. Urology**, v. 12, n. December, p. 1–14, 2015.

VEIS, D. et al. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 229–40, 1993.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p. 12–21, 2010.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 1995.

VIEDMA-RODRÍGUEZ, R. et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). **Oncology Reports**, v. 32, n. 1, p. 3–15, 2014.

WALTON, K. D. et al. Conditional deletion of the bcl-x gene from mouse mammary epithelium results in accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. **Mechanisms of Development**, v. 109, n. 2, p. 281–293, 2001.

WATER, F. M. VAN DE et al. Intravenously Administered Short Interfering Rna Accumulates in the Kidney and Selectively Suppresses Gene Function in Renal Proximal Tubules Abstract : **Pharmacology**, v. 34, n. 8, p. 1393–1397, 2006.

WATSON, C. J. Key stages in mammary gland development - Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland

from milk factory to a quiescent organ. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 203, 2006.

WEI, G. et al. Chemical Genomics Identifies Small-Molecule MCL1 Repressors and BCL-xL as a Predictor of MCL1 Dependency. **Cancer Cell**, v. 21, n. 4, p. 547–562, 2012.

WEI, M. C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 727–730, 2011.

WELLER, M. et al. Protooncogene bcl-2 gene transfer abrogates Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of human malignant glioma cells and confers resistance to chemotherapeutic drugs and therapeutic irradiation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 6, p. 2633–2643, 1995.

WHO, W. H. O. **World Health Statistics**. [s.l.: s.n.]. v. 27

WILLIAMS, M. M.; COOK, R. S. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3519–30, 2015.

WOLTER, K. G. et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 5, p. 1281–1292, 1997.

YANG, S.; ZHANG, J. J.; HUANG, X.-Y. Mouse Models for Tumor Metastasis. **Methods Mol Biol**, v. 928, p. 221–228, 2012.

YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6398–6406, 2008.

YOSEF, R. et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. **Nature communications**, v. 7, p. 11190, 2016.

YOSHIMINE, S. et al. Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma. **British journal of cancer**, v. 108, n. 11, p. 2312–2320, 2013.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 47–59, 2008.

ZHANG, J.; LI, X.; HUANG, L. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 440–450, 2014.

ZHANG, M.; KATAOKA, K. Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **Nano Today**, v. 4, n. 6, p. 508–517, 2009.

ZHOU, F.; YANG, Y.; XING, D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. **FEBS Journal**, v. 278, n. 3, p. 403–413, 2011.

ZUCKERMAN, J. E.; DAVIS, M. E. Clinical experiences with systemically therapeutics in cancer. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 12, p. 843–856, 2015.

9 ANEXOS

ANEXO A
Parecer do comitê de ética no uso de animais.

Protocolo PP 00892/Ofício 121/CEUA/PROPESQ2013

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00892

Título

Avaliação das propriedades antitumorais e antiadipogênicas de compostos sintéticos, semissintéticos e nanoestruturados: estudos agudos e subagudos

Data de Entrada

17/10/2013

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

01/11/2013

Considerações

Ofício nº 121/CEUA/PROPESQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Tânia Beatriz Creczynski Pasa, Departamento de Farmácia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de um mil e seiscentos camundongos (*Mus musculus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC e laboratórios de modelos biológicos.

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 13/02/2018

Data 13/11/2013

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
 PRESIDENTE

ANEXO B

Artigo publicado como primeiro autor, contendo dados da tese.

Mello LJ, Souza GR, Winter E, Silva AH, Pittella F, Creczynski-Pasa TB. Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. *Nanotechnology*. 2017 Apr 28;28(17):175101. doi: 10.1088/1361-6528/aa6283. Epub 2017 Feb 23. PubMed PMID: 28230534.

IOP Publishing

Nanotechnology

Nanotechnology 28 (2017) 175101 (13pp)

<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa6283>

Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles

Leônidas João de Mello Jr^{1,2}, Gabriela Regina Rosa Souza³, Evelyn Winter⁴, Adny Henrique Silva¹, Frederico Pittella⁵ and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{1,3}

¹ Post-graduation Course in Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Rua Pio Duarte Silva, 241, 88037-900 Florianópolis-SC, Brazil

² Biology Department, Federal Institute of Education, Science and Technology, Rua Mauro Ramos, 89020-300 Florianópolis-SC, Brazil

³ Post-graduation Course in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Rua Delfino Conti, s/n, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil

⁴ Department of Biosciences and Health, Federal University of Santa Catarina, PO Box 101; Rod. Ulysses Gaboardi, Km 3, 89520-000 Curitiba-SC, Brazil

⁵ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330, Juiz de Fora-MG, Brazil

E-mail: tania.pasa@ufsc.br

Received 21 December 2016, revised 18 February 2017

Accepted for publication 23 February 2017

Published 4 April 2017



CrossMark

Abstract

Tumorigenesis is related to an imbalance in controlling mechanisms of apoptosis. Expression of the genes BCL-2 and BCL-xL results in the promotion of cell survival by inhibiting apoptosis. Thus, a novel approach to suppress antiapoptotic genes is the use of small interfering RNA (siRNA) in cancer cells. However, there are some limitations for the application of siRNA such as the need for vectors to pass the cell membrane and deliver the nucleic acid. In this study CaP-siRNA-PEG-polyanion hybrid nanoparticles were developed to promote siRNA delivery to cultured human breast cancer cells (MCF-7) in order to evaluate whether the silencing of antiapoptotic genes BCL-2 and BCL-xL by siRNA would increase cancer cell death. After 48 h of incubation the expression of BCL-2 and BCL-xL genes decreased to 49% and 23%, respectively. The siRNA sequence used induced cancer cell death at a concentration of 200 nM siRNA after 72 h of incubation. As the targeted proteins are related to the resistance to chemotherapeutic drugs, the nanocarriers systems were also tested in the presence of doxorubicin (DOX). The results showed a significant reduction in the CC₅₀ of the DOX, after silencing the antiapoptotic genes. In addition, an increase in apoptotic cell counts for both incubations conditions was observed as well. In conclusion, silencing antiapoptotic genes such as BCL-2 and BCL-xL through the use of siRNA carried by hybrid nanoparticles showed to be effective *in vitro*, and presents a promising strategy for pre-clinical analysis, especially when combined with DOX against breast cancer.

Keywords: breast cancer, siRNA, nanoparticles, BCL-2, BCL-xL, apoptosis

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

ANEXO C

Artigo pulcado como coautor, contendo assunto da tese.

Silihe KK, Zingue S, Winter E, Awounfack CF, Bishayee A, Desai NN, João Mello L, Michel T, Tankeu FN, Ndinteh DT, Honorine Riwom S, Njamen D, Creczynski-Pasa TB. *Ficus umbellata* Vahl. (Moraceae) Stem Bark Extracts Exert Antitumor Activities In Vitro and In Vivo. **Int J Mol Sci.** 2017 May 23;18(6). pii: E1073.doi: 10.3390/ijms18061073. PubMed PMID: 28545243; PubMed Central PMCID:PMC5485928.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Ficus umbellata Vahl. (Moraceae) Stem Bark Extracts Exert Antitumor Activities In Vitro and In Vivo

Kevine Kanga Silihe ¹, Stéphane Zingue ^{2,3,4,5}, Evelyn Winter ⁴, Charline Florence Awounfack ³, Anupam Bishayee ^{6,*}, Nishil N. Desai ⁶, Leônidas João Mello Jr. ⁴, Thomas Michel ⁷, Francine Nzufu Tankeu ¹, Derek Tantoh Ndinteh ⁵, Sara Honorine Riwom ¹, Dieudonné Njamen ^{3,5} and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa ^{4,*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, Yaoundé 812, Cameroon; kamlievne@yahoo.com (K.K.S.); yereza2003@yahoo.fr (E.N.T.); sarariwom@yahoo.fr (S.H.R.)

² Department of Life and Earth Sciences, Higher Teachers' Training College, University of Maroua, Maroua 55, Cameroon; stephanezingue@gmail.com

³ Department of Animal Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé 812, Cameroon; c.awounfack@yahoo.fr (C.F.A.); dnjamen@gmail.com (D.N.)

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences and Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, Brazil; eve_winter@hotmail.com (E.W.); leonidasjm@gmail.com (L.J.M.)

⁵ Department of Applied Chemistry, Faculty of Sciences, University of Johannesburg, Doornfontein 2028, South Africa; tantohantoh@gmail.com

⁶ Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Larkin University, Miami, FL 33169, USA; ndesai@ularkin.org

⁷ Institute of Chemistry of Nice, Faculty of Sciences, University Côte d'Azur, Nice F-06108 Nice CEDEX 2, France; thomasmichel.prof@hotmail.fr

* Correspondence: abishayee@ularkin.org or abishayee@gmail.com (A.B.); tania.pasa@ufsc.br (T.B.C.-P.); Tel.: +1-305-760-7511 (A.B.)

Academic Editor: Leticia M. Estevinho

Received: 29 March 2017; Accepted: 3 May 2017; Published: 23 May 2017

Abstract: *A Ficus umbellata* is used to treat cancer. The present work was therefore designed to assess antitumor potentials of *F. umbellata* extracts in nine different cell lines. Cell cycle, apoptosis, cell migration/invasion, levels of reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (MMP), caspases activities as well as Bcl-2 and Bcl-xL protein content were assessed in MDA-MB-231 cells. The 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced carcinogenesis in rats were also used to investigate antitumor potential of *F. umbellata* extracts. The *F. umbellata* methanol extract exhibited a CC₅₀ of 180 µg/mL in MDA-MB-231 cells after 24 h. It induced apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, while it did not alter their cell cycle phases. Further, it induced a decrease in MMP, an increase in ROS levels and caspases activities as well as a downregulation in Bcl-2 and Bcl-xL protein contents in MDA-MB-231 cells. In vivo, *F. umbellata* aqueous (200 mg/kg) and methanol (50 mg/kg) extracts significantly ($p < 0.001$) reduced ovarian tumor incidence (10%), total tumor burden (58% and 46%, respectively), average tumor weight (57.8% and 45.6%, respectively) as compared to DMBA control group. These results suggest antitumor potential of *F. umbellata* constituents possibly due to apoptosis induction mediated through ROS-dependent mitochondrial pathway.

Keywords: *Ficus umbellata*; apoptosis; estrogen-dependent tumors; DMBA; cell invasion

1. Introduction

Cancer is a group of diseases characterized by the unregulated proliferation of abnormal cells that invade and disrupt surrounding tissues [1]. It is a source of significant morbidity worldwide, responsible for over 8.2 million deaths per year and a serious public health problem in both developed

ANEXO D

Artigos a serem submetidos como coautor, contendo assunto da tese.

1. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry

Methyl(Z)-2-(isothioureidomethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoate hydrobromide induces ROS stress leading to autophagy and cell death in cancer cell lines. Laura Sartori Assunção, Iara Kretzer, Jelver Alexander Sierra Restrepo, Leônidas João de Mello Junior, Misael Ferreira, Macus Mandolesi Sá, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa.

2. Chemico-Biological Interactions

Antitumor activity of methyl (Z)-2-(isothioureidomethyl)-2-pentenoate hydrobromide through mitotic arrest and extrinsic apoptotic pathway in leukemia cell lines. Laura Sartori Assunção, Iara Kretzer, Jelver Alexander Sierra Restrepo, Leônidas João de Mello Junior, Misael Ferreira, Macus Mandolesi Sá, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa.