

Gabriela Regina Rosa Souza Haberbeck

**NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS COMO SISTEMA DE
ENTREGA DE siRNA:
SILENCIAMENTO *IN VIVO* DO GENE *Vegf* EM CÂNCER DE
MAMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título de
Doutor em Farmácia na Área de
Concentração Fármaco-Medicamentos.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz
Creczynski Pasa
Coorientador: Prof. Dr. Frederico
Pittella Silva

Florianópolis
2019

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

Haberbeck, Gabriela Regina Rosa Souza
NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS COMO SISTEMA DE ENTREGA
DE siRNA : SILENCIAMENTO in vivo DO GENE Vegf EM
CÂNCER DE MAMA / Gabriela Regina Rosa Souza
Haberbeck ; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski
Pasa, coorientador, Frederico Pittella Silva, 2019.
107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. siVEGF. 3. PEG(ácido glutâmico).
4. Nanopartículas. 5. Câncer de Mama. I. Pasa, Tânia
Beatriz Creczynski. II. Silva, Frederico Pittella.
III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

“NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS COMO SISTEMA DE ENTREGA DE siRNA: SILENCIAMENTO in vivo DO GENE Vegf EM CÂNCER DE MAMA”

POR

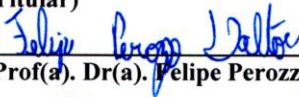
Gabriela Regina Rosa Souza Haberbeck

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). **Ângela Machado de Campos** (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). **Felipe Perozzo Daltoé** (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). **Rilton Alves de Freitas** (UFPR – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). **Tânia Beatriz Creczynski Pasa** (UFSC – Orientador)



Prof(a). Dra. **Elenara Maria Teixeira Lemos Senna**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC
PROPG/UFSC
SIAPF nº 1159704

Florianópolis, 04 de julho de 2019.

Este trabalho é dedicado à minha
família e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por me receber no seu laboratório. Obrigada pela confiança, respeito, orientação, ensinamentos, compreensão e conselhos quando eu precisava.

Ao meu coorientador professor Frederico Pittella Silva, também pela confiança, paciência, orientação e por prontamente me ajudar sempre que o procurava.

Aos membros do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pelo suporte e aos professores do programa.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro.

Agradeço a todos os colegas do laboratório Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas-GEIMM, que tive o prazer de conviver e que me ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) pela oportunidade de utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pelos aparelhos disponibilizados e suporte técnico.

Aos professores Tânia Frode e Eduardo Dalmarco da UFSC, por disponibilizarem seu laboratório para utilização.

À professora Jacy Gameiro e sua aluna Ana Gualberto, da Universidade Federal de Juiz de Fora, por toda ajuda recebida para os experimentos realizados na instituição.

Aos colegas do Laboratório do professor Frederico Pittella Silva (Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados) da Universidade Federal de Juiz de Fora, por todo o apoio recebido.

Ao professor Leônidas João de Mello Junior e à Neli Branco do Instituto Federal de Santa Catarina, por toda a parceria neste projeto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho.

Aos amigos, pelos momentos compartilhados e torcida para que tudo desse certo.

À minha família e ao meu marido Jorge, pelo carinho e confiança em mim depositados.

E por fim, agradeço à Deus pela fé e motivação em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

A utilização de moléculas de siRNA para o silenciamento gênico tem adquirido importância para o tratamento do câncer, sendo que o primeiro fármaco baseado neste princípio foi aprovado nos EUA em 2018. A abordagem consiste em impedir a expressão de proteínas essenciais para o desenvolvimento da doença, dependendo do gene alvo. Neste trabalho, o gene *Vegf* foi selecionado, por ser um fator mediador da angiogênese no câncer e pode ser uma estratégia interessante para prevenir o crescimento e proliferação de células tumorais. Porém, há barreiras que precisam ser ultrapassadas para o siRNA alcançar as células alvo e promover o silenciamento gênico, após entrega sistêmica. As principais barreiras consistem na fragilidade da molécula de siRNA na circulação, no reconhecimento pelo sistema imune, na captação intracelular deficiente e no ambiente ácido do endossoma. Assim, o objetivo desse trabalho é verificar a eficiência de um nanocarreador em proteger e promover a entrega sistêmica de siRNA para o gene *Vegf* para terapia anti-câncer com alvo específico, em um modelo de câncer de mama murino. Nanopartículas híbridas contendo íons cálcio na fase inorgânica e copolímero em bloco PEG-ácido glutâmico na fase orgânica foram preparadas e purificadas utilizando sistema Amicon® Pro Purification. As nanopartículas formam-se por um processo próprio de organização (auto-associação) em condições estequiométricas. Para determinação do tamanho e morfologia, técnicas incluindo o Espalhamento Dinâmico de Luz (do Inglês *Dynamic Light Scattering*, DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram utilizadas. A fim de verificar a quantidade de íons cálcio e fósforo removidos durante o processo de purificação, ensaios colorimétricos foram realizados. Para os estudos *in vivo*, células de câncer de mama murino 4T1 foram inoculadas por via subcutânea na glândula mamária abdominal em camundongos Balb/c fêmeas. Para o ensaio antitumoral, nanopartículas carreando siVEGF foram injetadas na veia caudal e o tamanho do tumor e massa corporal foram monitorados por 14 dias. Após administração das nanopartículas foi realizada avaliação histopatológica dos órgãos e dos tumores, analisados os parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliado o silenciamento gênico por RT-qPCR e Western Blot. Para avaliar a biodistribuição e acúmulo no tumor, nanopartículas híbridas contendo siRNA marcado com cianina 5 foram injetadas pela via intravenosa utilizando a veia caudal. A intensidade de fluorescência no fígado, baço, pulmão, coração, rins e tumor foi determinada usando o equipamento In-Vivo Xtreme, normalizada pela massa. Os nanocarreadores apresentaram tamanho e

índice de polidispersão similares antes e após processo de purificação, com remoção eficiente de cálcio e fósforo livres. As imagens obtidas por MET revelaram que as nanopartículas purificadas apresentaram tamanho relativamente esférico e homogêneo. Foi observada a diminuição do tamanho dos tumores tratados com as nanopartículas contendo siVEGF. A redução no crescimento tumoral foi relacionada ao silenciamento *in vivo* do gene *Vegf* no grupo tratado. A intensidade de fluorescência em níveis significativos foi detectada nos rins e nos tumores tratados, indicando acúmulo de siRNA no tumor pela entrega efetiva dos nanocarreadores. Os resultados indicam os sistemas híbridos aqui desenvolvidos como carreadores efetivos de moléculas de siRNA para a terapia antitumoral, com o silenciamento do gene *Vegf* no câncer de mama.

Palavras-chave: siVEGF. PEG(ácido glutâmico). Nanopartículas. Câncer de Mama.

ABSTRACT

HYBRID NANOPARTICLES AS DELIVERY SYSTEM OF siRNA: *IN VIVO Vegf* GENE SILENCING IN BREAST CANCER

The use of siRNA molecules for gene silencing has acquired importance for the cancer treatment, wherein the first drug based on this principle was approved in the US in 2018. The approach is to prevent the expression of proteins essential for the disease development, depending on the target gene. In this work, the *Vegf* gene was selected, since it is a mediating factor of angiogenesis in cancer and may be an interesting strategy to prevent the growth and proliferation of tumoral cells. However, is necessary to overcome barriers to systemically deliver siRNA to target cells and promote gene silencing. The main barriers are the fragility of siRNA in the circulation, recognition by the immune system, the inefficient cellular uptake, and the acid environment of the endosome. Thus, the aim of the present study is to verify the efficiency of a carrier system to protect and deliver siRNA to *Vegf* gene for a target-specific anti-cancer therapy in a murine breast cancer model. Hybrid nanoparticles composed of calcium ions as inorganic phase and a PEG-glutamic acid copolymer as the organic phase was prepared and purified using Amicon® Pro Purification System. The nanoparticles were formed by self-assembling of the components in stoichiometric conditions. For the determination of the size distribution and morphology of the nanocarriers, dynamic light scattering (DLS) technique and transmission electron microscopy (TEM) were carried out. To quantify the amount of calcium and phosphorus ions removed by the purification process, colorimetric assays were performed. For *in vivo* studies, female BALB/c mice were subcutaneously inoculated into the abdominal mammary gland with 4T1 breast carcinoma cells. For the antitumor activity, hybrid nanoparticles loading siVEGF were injected into the tail vein and tumor size and body weight were monitored for 14 days. After administration of the nanoparticles, histopathological evaluation of organs and tumors was performed, hematological and biochemical parameters were analyzed and gene silencing using RT-qPCR and Western Blot was evaluated. To evaluate biodistribution and tumor accumulation, hybrid nanoparticles containing Cy5-labeled siRNA were intravenously injected into the tail vein. The fluorescence intensity of the liver, spleen, lung, heart, kidneys, and tumor was determined using the In-Vivo Xtreme system and normalized to the weight. Nanocarriers were confirmed to have similar size and polydispersity index before and after the purification process

with efficient removal of free calcium and phosphorus. The TEM images revealed nanoparticles with a relatively homogenous rounded shape. The decrease in the size of the tumors treated with the nanoparticles containing siVEGF was observed. The reduction in tumor growth was related to *in vivo Vegf* gene silencing in the treated group. Significantly fluorescence intensity was detected in kidney and tumors treated, indicating enhanced tumor accumulation of siRNA by hybrid nanoparticles delivery. The results indicate the hybrid systems developed here as effective carriers of siRNA molecules for anticancer therapy with the *Vegf* gene silencing in breast cancer.

Keywords: siVEGF. PEG(glutamic acid). Nanoparticles. Breast Cancer.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estimativa para 2018 dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, por sexo, exceto pele não melanoma*..... | 28 |
| Figura 2 - Interação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no microambiente tumoral, mediando a angiogênese..... | 33 |
| Figura 3 - Interação da família VEGF com seus receptores..... | 34 |
| Figura 4 - Mecanismo de ação do siRNA..... | 38 |
| Figura 5 - Barreiras biológicas para entrega de siRNA ou RNAi..... | 41 |
| Figura 6 - Estrutura do bloco de copolímero PEG-P-ácido glutâmico (PEG-PGLU)..... | 45 |
| Figura 7 - Esquema da estrutura das nanopartículas híbridas contendo CaP e bloco de copolímero PEG-P-ácido glutâmico..... | 47 |
| Figura 8 - Caracterização das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP por DLS..... | 56 |
| Figura 9 - Caracterização das nanopartículas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP imediatamente após adição de salina..... | 57 |
| Figura 10 - Determinação da morfologia das nanopartículas híbridas purificadas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..... | 57 |
| Figura 11 - Estabilidade das nanopartículas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas e em salina..... | 58 |
| Figura 12 - Avaliação da estabilidade das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas por ultrafiltração, após 1 semana..... | 59 |
| Figura 13 - Atividade antitumoral <i>in vivo</i> | 61 |
| Figura 14 - Monitoramento temporal da massa corporal dos animais em tratamento..... | 62 |
| Figura 15 - Expressão do gene <i>Vegf</i> em tumor de mama após administração de NP PEG-PGLU/siRNA/CaP..... | 63 |
| Figura 16 - Curva de eficiência dos primers..... | 64 |
| Figura 17 - Análise por Western blot da proteína VEGF nos tumores tratados com NP PEG-PGLU/siRNA/CaP..... | 65 |
| Figura 18 - Imagens representativas das análises histopatológicas dos órgãos e do tumor após tratamento com as nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP..... | 67 |
| Figura 19 - Biodistribuição de siRNA marcado com cy-5 incorporado nas nanopartículas híbridas..... | 69 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Método utilizado para a qPCR..... | 51 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Quantidade de cálcio e fósforo antes e após processo de purificação. | 60 |
| Tabela 2 - Parâmetros hematológicos dos animais tratados com as nanopartículas híbridas NP CaP-PEG-GLU-siVEGF..... | 71 |
| Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com as nanopartículas híbridas NP CaP-PEG-GLU-siVEGF..... | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST Aspartato Aminotransferase
ALT Alanina Aminotransferase
BCL-2 Célula B de Linfoma – 2
BCL-xL Célula B de Linfoma–Extra Grande
BLAST Basic Local Alignment Search Tool
BRCA1 Breast Cancer 1, Early Onset
BRCA2 Breast Cancer 2, Early Onset
BSA Albumina sérica bovina
CaP Fosfato de Cálcio
cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar
CHCM Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
Cy-5 Cianina-5
DLS Espalhamento Dinâmico de Luz
dsRNA Double-Stranded RNA
ECM Matriz Extracelular
EDTA Ácido Etilenodiaminotetracético
EPM Erro Padrão da Média
EPR Enhanced Permeability and Retention (Aumento da Permeabilidade e Retenção)
ER Receptores para Estrogênio
FDA Food and Drug Administration
HER2 Receptor de Fator de Crescimento Epidermal Humano 2
HIF-1 Fator de Transcrição Hipóxia-Indutível-Fator-1
kDa kilodalton
KSP Proteína do Fuso de Cinesina
NRP-1 e 2 Neuropilina-1 e 2
PCR Reação em Cadeia da Polimerase
PdI Índice de Polidispersão
PEG Poli(etilenoglicol)
PEG-PGLU PEG-Poliânion metoxi-poli (etileno glicol) - (L-ácido glutâmico) [PEG-b-poli(GLU)] (5K-50DP)
PLGF Fator de Crescimento Placentário
PMSF Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PR Receptore para Progesterona
RIPA Tampão de lise (Ensaio de radioimunoprecipitação)
RISC Complexo de Indução de Silenciamento de RNA
RNA Ácido ribonucleico
RNAi RNA de interferência
RNAm RNA mensageiro

RT-qPCR RT-PCR quantitativo em tempo real
siRNA Short interfering RNA
siVEGF Short interfering RNA para o gene *Vegf*
SRE Sistema Reticuloendotelial
sVEGFR1 VEGFR-1 solúvel
TBS Tampão tris-salino
TBS-T Tampão tris-salino com tween ®20
Treg Células T Reguladoras
TSP-1 Trombospondina-1
TTR Transtirretina
VCM Volume Corpuscular Médio
VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR Receptor de VEGF

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 23 |
| 1.1 | OBJETIVOS | 25 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral..... | 25 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 25 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 27 |
| 2.1 | ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O CÂNCER DE MAMA | 27 |
| 2.1.1 | Fatores de Risco e Prevenção do Câncer de Mama..... | 30 |
| 2.1.2 | Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama | 31 |
| 2.2 | ANGIOGÊNESE E O CÂNCER..... | 33 |
| 2.3 | TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA | 36 |
| 2.4 | ENTREGA <i>IN VIVO</i> DE siRNA UTILIZANDO NANOCARREADORES | 43 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 | MATERIAIS | 45 |
| 3.2 | DESENHO DA SEQUÊNCIA DE siRNA..... | 46 |
| 3.3 | PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP..... | 46 |
| 3.4 | PURIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP..... | 47 |
| 3.5 | CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP PURIFICADAS | 47 |
| 3.6 | AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP PURIFICADAS POR MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO | 48 |
| 3.7 | ESTABILIDADE DO SISTEMA..... | 48 |
| 3.8 | QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO E FÓSFORO NA FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS | 48 |
| 3.9 | ESTUDOS <i>IN VIVO</i> | 49 |
| 3.9.1 | Aplicação do modelo de câncer de mama murino | 49 |
| 3.9.2 | Avaliação da atividade antitumoral | 49 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.9.3 | Avaliação do silenciamento do gene <i>Vegf in vivo</i> , por meio da técnica de RT-qPCR, após tratamento com as nanopartículas híbridas | 50 |
| 3.9.4 | Western blotting..... | 51 |
| 3.9.5 | Avaliação Histopatológica após administração das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP contendo siVEGF | 52 |
| 3.9.6 | Avaliação da biodistribuição e acumulação no tumor das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP <i>in vivo</i> | 52 |
| 3.9.7 | Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos após administração das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP contendo siVEGF | 52 |
| 3.10 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 53 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 4.1 | PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS | 55 |
| 4.2 | ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS | 58 |
| 4.3 | QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO E FÓSFORO NAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP PURIFICADAS..... | 59 |
| 4.4 | RESULTADOS <i>IN VIVO</i> | 60 |
| 4.4.1 | Atividade antitumoral das nanopartículas híbridas contendo siVEGF..... | 60 |
| 4.4.2 | Expressão do gene <i>Vegf in vivo</i> | 62 |
| 4.4.3 | Determinação da quantidade de proteína VEGF | 64 |
| 4.4.4 | Avaliação histopatológica..... | 65 |
| 4.4.5 | Biodistribuição das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP..... | 68 |
| 4.4.6 | Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos | 70 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 73 |
| 6 | PERSPECTIVAS..... | 75 |
| | REFERÊNCIAS | 77 |
| | ANEXO A – Comitê de Ética Protocolo PP 00892 | 99 |
| | ANEXO B – Comitê de Ética Protocolo 013/2017 | 100 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO C – Artigos | 101 |
| ANEXO D – Menção honrosa do Prêmio Newton Freire-Maia com o trabalho de doutorado | 107 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer é definido como o crescimento e proliferação celular de maneira descontrolada. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, 9,6 milhões de mortes em todo mundo tiveram como causa esta doença. O câncer de mama é o segundo mais comum e o mais frequente no sexo feminino, entre todos os tipos de câncer (WHO, 2019; INCA, 2019a).

Uma estratégia terapêutica interessante para o câncer é a utilização de terapias-alvo, valendo-se de moléculas alvo-específicas com o intuito de evitar a ativação de mecanismos de resistência aos fármacos ou de causar efeitos adversos que são comuns nas terapias convencionais (ABOU-JAWDE et al., 2003; HIGGINS; BASELGA, 2011). Entre essas moléculas, o siRNA (*short interfering RNA*) pelo efeito de RNA de interferência (RNAi) é capaz de inibir a expressão de genes envolvidos com as doenças, por silenciamento gênico pós-transcricional (ELBASHIR et al., 2001).

O silenciamento gênico promove a redução da produção de proteínas mutadas ou com a expressão inadequada (FIRE et al, 1998; KIM et al., 2008; JAIN; PATHAK; VAIDYA, 2018), sendo uma alternativa de potencial para o tratamento de doenças como o câncer. Além disso, cânceres como o de mama triplo negativo não possuem terapia alvo, pois não apresentam receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (receptor do fator de crescimento epidermal humano 2). Nesse tipo de câncer, a quimioterapia é o tratamento de escolha e apresenta resultados limitados com baixos índices de sobrevida (INCA, 2019b; ONITILLO et al., 2009).

Entre os genes com expressão anormal no câncer, encontra-se o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que é o principal mediador da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), fenômeno diretamente envolvido com o crescimento do tumor, progressão e desenvolvimento de metástases. O VEGF, estando superexpresso em células tumorais, pode ser um alvo de escolha para silenciamento gênico. Estratégias anti-VEGF para tratar o câncer são projetadas para atingir a função pró-angiogênica do VEGF e deste modo inibir a neovascularização, impedindo o fornecimento de suprimentos necessários para a proliferação celular tumoral (LIN; ZHANG; LUO, 2016; RIBATTI et al., 2016).

Entretanto, como as moléculas de siRNA possuem alta massa molecular e carga negativa, a aplicação *in vivo* não é efetiva. Além disso, quando aplicadas em um organismo para terapia por RNAi, são degradadas por enzimas endógenas, sendo necessário o uso de

nanocarreadores, o que tem mostrado eficiência para promover a proteção do ácido nucleico e garantir a respectiva entrada no citoplasma das células, onde ocorre a ação do siRNA (PECOT et al., 2010).

Entre as possibilidades de nanocarreadores, as nanopartículas baseadas em fosfato de cálcio (CaP), por serem constituídas de um componente biocompatível e por adsorverem moléculas polianiônicas, são promissoras para entrega efetiva de siRNA (ZHANG; KATAOKA, 2009). Ainda, a complexação de fosfato de cálcio com poli(etilenoglicol) (PEG), na preparação das nanopartículas, permite o controle do crescimento de cristais do sal de cálcio, além de promover benefícios quanto a aplicação sistêmica, pois minimiza as interações não específicas e aumenta a acumulação do carreador no tumor (ELSABAHY et al, 2008; KAKIZAWA et al, 2004; KAKIZAWA; KATAOKA, 2002).

A acumulação efetiva dos nanocarreadores no tumor ocorre através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) como consequência das diferenças intrínsecas do microambiente tumoral. Um exemplo, são os espaços presentes apenas no endotélio vascular no tumor, que permitem o extravasamento de nanopartículas a partir dos vasos sanguíneos para o tecido tumoral. (MAEDA, 2010; MATSUMURA; MAEDA, 1986).

Sabe-se que existem inúmeros nanocarreadores de ácidos nucleicos constituídos por materiais diversos, porém, a maioria necessita de numerosas etapas de preparação e alta energia para a formação. Além disso, alguns apresentam baixa estabilidade e toxicidade e não conseguem atingir os tumores sólidos nos testes *in vivo* (ZHANG et al., 2018).

Diante desse cenário, neste trabalho, nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio (CaP) e blocos do copolímero PEG-ácido glutâmico (PEG-PGLU) foram produzidas e purificadas para entrega *in vivo* de siRNA, para o silenciamento do gene *Vegf* em modelo de câncer de mama murino e conseqüentemente, a realização da terapia antitumoral pelo efeito de RNAi.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Preparar e avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de um sistema nanocarreador híbrido contendo siRNA para o gene *Vegf*, usando modelo de câncer de mama murino.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Preparar, purificar e caracterizar nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP;
- b) Analisar o efeito antitumoral das nanopartículas híbridas *in vivo*, após indução do tumor;
- c) Analisar o silenciamento do gene *Vegf*, por meio da técnica de RT-qPCR, após indução do tumor e tratamento dos animais com as nanopartículas híbridas;
- d) Analisar o conteúdo da proteína VEGF após indução do tumor e tratamento dos animais com as NP PEG-PGLU/siRNA/CaP;
- e) Realizar análise histopatológica dos tumores e órgãos após tratamento dos animais com as NP PEG-PGLU/siRNA/CaP;
- f) Analisar a biodistribuição e o acúmulo das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP *in vivo*;
- g) Verificar parâmetros bioquímicos, hematológicos e antropométricos, após administração das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP *in vivo*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

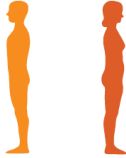
2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O CÂNCER DE MAMA

O câncer é considerado um importante problema de saúde pública. Em 2018, um número significativo de mortes em todo o mundo, estimado em 9,6 milhões, teve como causa diferentes tipos de câncer. Além disso, estimativas apontam que, em 2010, o câncer gerou um custo econômico anual de 1,16 trilhões de dólares a nível mundial (WHO, 2019).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), são esperados 600 mil novos casos para cada ano do biênio 2018-2019. Entre os tipos de câncer, os mais incidentes no Brasil são: próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto. Ainda, os mais frequentes desta relação são o de próstata para homens (aproximadamente 68 mil casos) e o de mama para mulheres (aproximadamente 60 mil casos) (Figura 1). Aproximadamente 70% dos novos casos encontram-se nas regiões Sul e Sudeste, principalmente nesta última, que representa quase a metade da incidência. Em todas as regiões do Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminino tem uma incidência preeminente, exceto na região Norte, na qual representa o segundo tumor mais incidente. Além disso, o câncer de mama é a principal causa de morte por câncer nas mulheres, tendo como estimativa 522 mil mortes em 2012 (INCA, 2019a).

O câncer caracteriza-se pelo crescimento e proliferação anormal das células de maneira incontrolável, podendo levar a alterações funcionais, além de possuir a habilidade de invadir outros órgãos e tecidos (MITRA et al., 2015; INCA, 2017). Um tumor pode ser classificado como benigno ou maligno. Um tumor benigno representa uma massa localizada de células que possuem proliferação lenta e semelhança ao tecido de origem, apresentando risco de vida baixo. Já o tumor maligno é caracterizado pela divisão agressiva e descontrolada das células, com formação de um aglomerado de células tumorais. (FENG et al., 2018, INCA, 2017).

Figura 1 - Estimativa para 2018 dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, por sexo, exceto pele não melanoma*.

| Localização Primária | Casos | % | | | Localização Primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|---|-----------------|-----------------------------|--------|-------|
| | | | Homens | Mulheres | | | |
| Próstata | 68.220 | 31,7% |  | | Mama Feminina | 59.700 | 29,5% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 18.740 | 8,7% | | | Cólon e Reto | 18.980 | 9,4% |
| Cólon e Reto | 17.380 | 8,1% | | | Colo do Útero | 16.370 | 8,1% |
| Estômago | 13.540 | 6,3% | | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.530 | 6,2% |
| Cavidade Oral | 11.200 | 5,2% | | | Glândula Tiroide | 8.040 | 4,0% |
| Esôfago | 8.240 | 3,8% | | | Estômago | 7.750 | 3,8% |
| Bexiga | 6.690 | 3,1% | | | Corpo do Útero | 6.600 | 3,3% |
| Laringe | 6.390 | 3,0% | | | Ovário | 6.150 | 3,0% |
| Leucemias | 5.940 | 2,8% | | | Sistema Nervoso Central | 5.510 | 2,7% |
| Sistema Nervoso Central | 5.810 | 2,7% | | | Leucemias | 4.860 | 2,4% |

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2019a).

Os tipos de câncer de mama mais comuns são carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo. Quando as células epiteliais que revestem órgãos e tecidos são afetadas inicialmente pelos tumores, têm-se o carcinoma. Se células epiteliais fazem parte do tecido glandular, denomina-se adenocarcinoma, podendo ter início nos ductos ou nos lóbulos. Outros tipos de câncer de mama que não são comuns incluem: câncer de mama inflamatório (tipo incomum invasivo), *phyllodes* (o desenvolvimento ocorre no tecido conjuntivo, no estroma da mama), doença de Paget (começa nos ductos mamários e espalha-se para a pele do mamilo e posteriormente para a aréola) e angiossarcomas (têm início nas células que revestem os vasos sanguíneos ou vasos linfáticos, podendo atingir o tecido mamário ou a pele da mama). Ainda, o câncer de mama pode espalhar-se para os tecidos adjacentes. Quando não se espalham são denominados de câncer de mama *in situ*, tendo como representantes o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ*. Já, quando invadem o tecido mamário adjacente, são cânceres invasivos ou infiltrantes, com possibilidade de metástase em locais distantes (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003, SIBBERING; COURTNEY, 2019; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

O carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma intraductal possui um diagnóstico relativamente comum entre mulheres que se submeteram a mamografia. Trata-se de um câncer não invasivo com alto poder de cura. No entanto, com o passar do tempo, podem ocorrer metástases para os tecidos adjacentes. No carcinoma lobular *in situ* ou neoplasia lobular, células parecidas com células cancerígenas crescem nos lóbulos das glândulas que produzem o leite, mas esse crescimento não extravasa a parede dos mesmos. Portanto, não é considerado câncer. Entretanto, é um diagnóstico importante, pois pode indicar o desenvolvimento de um

câncer de mama invasivo futuro (WEN; BROGI, 2018; WARD et al., 2015; LEE et al., 2012; KERLIKOWSKA, 2010; MALUF; KOERNER, 2001).

O carcinoma ductal invasivo é o câncer de mama mais comumente diagnosticado. No carcinoma, há a proliferação das células que revestem o ducto de leite e também crescem nos tecidos mamários próximos pelo rompimento do ducto e, a partir do sistema linfático ou da corrente sanguínea, pode levar a metástases por todo o corpo. Já o carcinoma lobular invasivo tem início nos lóbulos, e pode também espalhar-se por todo o corpo. No entanto, há outros tipos de câncer de mama invasivos que são denominados especiais, pois são incomuns e correspondem a menos de 5% do total (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os tipos de câncer de mama também podem ser identificados de acordo com a presença ou não de receptores. Hormônios como estrogênio e progesterona, por exemplo, são importantes pois, quando se ligam aos respectivos receptores, estimulam o crescimento das células do câncer, podendo-se definir a linha de tratamento com a utilização de fármacos que reduzam ou impeçam que esses hormônios se liguem aos respectivos receptores. Células de câncer de mama positivas para receptores hormonais têm receptores para estrogênio (ER) ou progesterona (PR). Possuem um crescimento lento quando comparados aos que são negativos para receptores hormonais. No caso do câncer de mama negativo para receptores de hormônios, as células não possuem receptores de estrogênio e de progesterona. Portanto, a terapia hormonal é ineficaz. O câncer de mama triplo positivo é referente a positividade aos receptores ER, PR e HER2 (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) e possui como opções o tratamento hormonal, bem como medicamentos baseados em HER2 (LOIBL; GIANNI, 2017; TURNER et al., 2017; VICI et al., 2015; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

O subtipo de câncer de mama triplo-negativo não possui receptores de estrogênio, progesterona e HER2. São mais comuns em mulheres mais jovens e em afro-americanas. São complexos e agressivos, possuem um crescimento rápido e poder de metástase maior que os outros tipos de câncer de mama. A terapia hormonal também é ineficaz, bem como a terapia envolvendo HER2. Em alguns casos, a quimioterapia pode ser útil (CAREY et al., 2010; A STEAD et al., 2009).

Os tratamentos do câncer de mama triplo negativo podem apresentar restrição quanto à eficácia, devido a heterogeneidade desse tipo de câncer. Portanto, o desenvolvimento de terapias direcionadas

eficazes é um desafio na pesquisa por novos fármacos para o câncer de mama triplo negativo (LEE; DJAMGOZ, 2018).

2.1.1 Fatores de Risco e Prevenção do Câncer de Mama

Identificado como uma doença multifatorial, o câncer de mama possui inúmeros fatores que contribuem para o seu aparecimento. Primeiramente, ser do sexo feminino é um fator de risco inerente ao câncer de mama, sendo 100 vezes maior a chance de desenvolvimento da doença aparecer em mulheres do que em homens. A idade também é importante, em que mulheres com 55 anos ou mais têm maior probabilidade de receber o diagnóstico da doença. Além disso, o fator familiar pode estar associado a doença, bem como a falta de atividade física da pós-menopausa, obesidade, excesso de álcool e uma alimentação inadequada contendo gordura saturada e baixa ingestão de frutas, legumes e verduras (FENG et al., 2018).

O câncer de mama apresenta características complexas no que diz respeito aos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Mutações genéticas, principalmente nos genes BRCA1 e BRCA2 levam ao aumento da susceptibilidade do desenvolvimento do câncer de mama. Entretanto, mesmo em mulheres que apresentam mutação em BRCA1 e 2 sem histórico familiar de primeiro grau com câncer de mama, a doença poderá se desenvolver. Outros eventos envolvidos com a causa da doença são: primeira menstruação com menos de 12 anos, menopausa após 55 anos, mulheres que nunca engravidaram, primeira gravidez após os 30 anos, uso prolongado de anticoncepcionais, terapia de reposição hormonal pós menopausa e exposição à radiação ionizante (FENG et al., 2018; METCALFE et al., 2018; DROOGER et al., 2015; STEWART; WILD, 2014; KAAKS et al., 2005; CIBULA et al., 2010).

Para mulheres com alta probabilidade de desenvolver o câncer de mama, é possível auxiliar na redução do risco de desenvolver a doença, evitando os fatores de risco e adquirindo hábitos saudáveis. Quando há a necessidade de tratamento, tamoxifeno e raloxifeno são fármacos que atuam por bloquear a ação do estrogênio na mama e podem ser uma opção, bem como inibidores da aromatase. Porém, esses medicamentos podem causar efeitos adversos e o risco/benefício deve ser analisado. Além disso, o risco aumentado de desenvolver o câncer de mama pode ser determinado pelo modelo de Gail, que mostra uma estimativa do risco de uma mulher desenvolver câncer de mama durante o intervalo de tempo especificado (GAIL et al, 1989). Os fatores de risco considerados no modelo são: idade em que a mulher teve o primeiro filho, idade da

menarca, histórico de câncer de mama em parentes de primeiro grau e número de biópsias mamárias prévias. A retirada cirúrgica da mama também pode ser uma escolha. Exames médicos para detecção precoce são importantes, principalmente para um tratamento menos deletério (YANG et al., 2016).

2.1.2 Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama

Primeiramente, detectar sintomas de câncer preditivos é importante. Nódulo no seio, assimetria, retração da pele, retração recente do mamilo, secreção mamilar com cor de sangue e alterações eczematosas na aréola são alguns deles. A redução da mortalidade por câncer de mama pode ocorrer em mais de 50% em mulheres com menos de 65 anos de idade devido ao diagnóstico precoce e tratamento efetivo menos agressivo. O diagnóstico do câncer de mama é realizado a partir de uma combinação de histórico clínico, exames físicos e visualização direta da área atingida por mamografia. Biópsia de tecidos alterados é utilizada para confirmação de diagnóstico por exame histopatológico (SIBBERING; COURTNEY, 2019; MEDEIROS; THULER; BERGMANN, 2019; WHO, 2017; STOCKTON et al., 1997).

O tratamento do câncer de mama é baseado na extensão (estadiamento) e características biológicas da doença, bem como nas características do próprio indivíduo, como idade, menopausa, comorbidades, entre outras. Pode ser dividido em local ou sistêmico. O local inclui cirurgia e radioterapia. O sistêmico tem como representantes a quimioterapia, hormônio terapia e terapia biológica.

Nos estádios iniciais da doença (I e II), em que os tumores são relativamente pequenos e não se espalham para os nódulos linfáticos ou espalham-se para nódulos linfáticos próximos, a cirurgia é predominantemente realizada, podendo ser conservadora, ou seja, é retirado somente o tumor, ou ainda radical, chamada de mastectomia, com retirada total da mama seguida ou não de reconstrução. Para melhorar o prognóstico; deve-se, ainda, realizar a avaliação dos linfonodos axilares. Em alguns casos, após esses procedimentos, a radioterapia e o tratamento sistêmico são indicados. Em pacientes que apresentam tumores maiores e localizados (estádio III), a abordagem sistêmica, com quimioterapia, na maioria dos casos, é a escolha inicial, seguido de cirurgia e radioterapia. No último estágio (IV), há presença de metástases e a modalidade sistêmica é preconizada, buscando o prolongamento da vida do paciente. Para o câncer de mama do tipo inflamatório, é indicado quimioterapia.

(SIBBERING; COURTNEY, 2019; INCA, 2019c; MORAN et al., 2014; GIULIANO, 2011)

A quimioterapia pode ser administrada por via intravenosa ou oral; ou ainda, mais raro, no líquido espinal que envolve o cérebro e a medula espinal. Em combinação de 2 ou 3 fármacos, este tipo de tratamento mostra-se mais eficaz, na maioria dos casos. Os fármacos utilizados são: antraciclinas, como doxorrubicina, doxorrubicina lisossômica peguilada, epirubicina, taxanos, como paclitaxel e docetaxel, 5-fluorouracil, ciclofosfamida, agentes de platina (cisplatina, carboplatina), vinorelbina, capecitabina, gemcitabina. Em estágios avançados do câncer de mama, a terapia única é mais frequente (CARDOSO et al., 2019; HASSAN, 2010).

Apesar dos benefícios do tratamento, a quimioterapia ainda está relacionada a muitos efeitos adversos, de simples a severos. Os mais comuns são: perda de cabelo, perda de apetite ou alterações de peso, náusea, vômito e diarreia, fadiga, dor, insônia, maior chance de infecções e fadiga. Além disso, a doxorrubicina e a epirubicina podem causar danos permanentes ao coração (cardiomiopatia), com um aumento no risco se utilizado por muito tempo ou em altas doses. Ainda, as mulheres podem apresentar problemas de concentração e memória, por muito tempo (WANG; YIN; JIA, 2019; BLOK et al., 2018; LI et al., 2017; VOROBIOF, 2016; CHATTERJEE et al., 2010; MEINARDI, 2002).

No caso dos cânceres de mama positivos para receptor de estrógeno e progesterona, a terapia hormonal é recomendada. Pode ser utilizada como terapia adjuvante após a cirurgia, para evitar recidivas; em alguns casos também pode ser utilizada antes do procedimento cirúrgico, além do uso paliativo na presença de metástases. O tempo de utilização é de pelo menos 5 anos. A terapia hormonal inclui fármacos que bloqueiam os receptores de estrógeno das células de câncer de mama, como tamoxifeno; fármacos que impedem a síntese de estrogênio, como inibidores da aromatase; fármacos que atuam na supressão do ovário como triptorelina; andrógenos e altas doses de estrogênio. Alguns efeitos adversos com o uso desta terapia são: ondas de calor, fadiga, artralgia, doença cardiovascular (BÉCOURT; ESPIÉ, 2019; BLOK et al., 2018; BENNINK et al., 2017).

Os cânceres de mama triplo-negativos não têm receptores hormonais, e, portanto, não contam com a utilização de terapia hormonal como possibilidade de tratamento. Além disso, medicamentos que têm como alvo o HER2 também não são capazes de auxiliar no tratamento. A quimioterapia é geralmente o tratamento padrão. Assim, muitos ensaios clínicos estão sendo desenvolvidos tendo como alvo as vias de

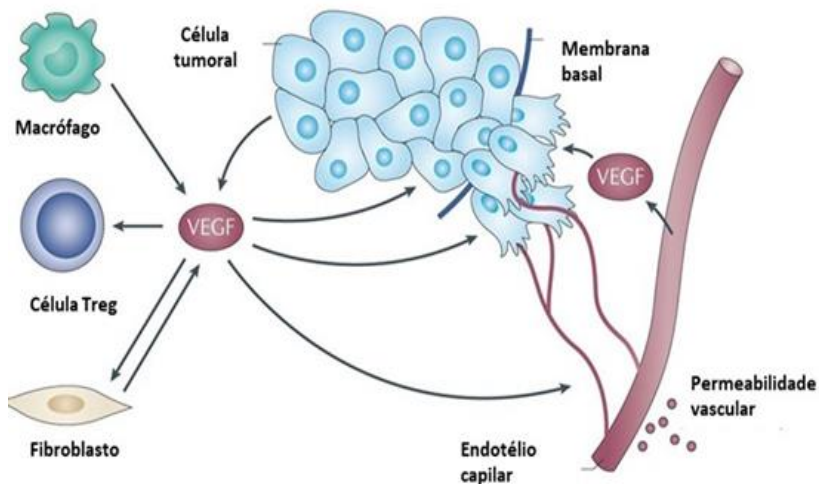
sinalizações envolvidas com esse tipo de câncer de mama (LEE; DJAMGOZ, 2018).

Entre os alvos para terapia do câncer de mama triplo negativo encontra-se o gene VEGF, que se apresenta superexpresso nesta doença e está relacionado com mau prognóstico (RIBATTI et al., 2016; LINDERHOLM et al., 2009).

2.2 ANGIOGÊNESE E O CÂNCER

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura prévia, que possui proteínas reguladoras, as quais se ligam a receptores presentes na superfície das células endoteliais (HANAHAN; FOLKMAN, 1996; HOEBEN, 2004). Dois reguladores que estimulam e inibem esse processo são, respectivamente, o VEGF (Figura 2) e a trombospondina-1 (TSP-1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 - Interação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no microambiente tumoral, mediando a angiogênese.



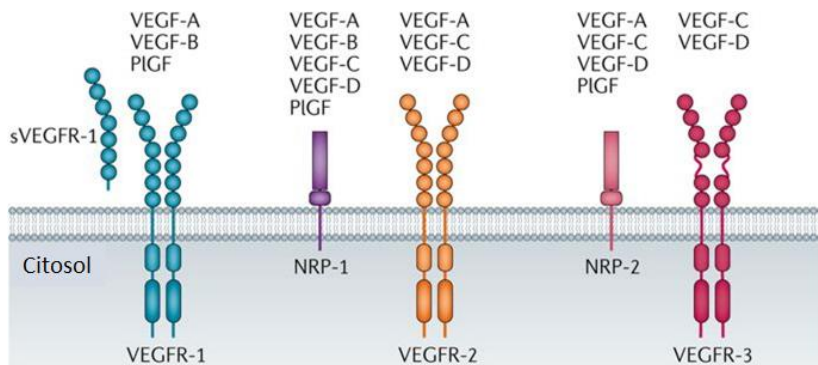
Nature Reviews | Cancer

O VEGF interage com receptores expressos (VEGFR) nas células. Pode atuar como quimioatrativo para células T reguladoras (Treg), inibindo a resposta imune

antitumoral. A secreção de VEGF pode se dar através de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais. O VEGF também altera a permeabilidade vascular, o que gera o depósito de matriz de fibrina, formando o estroma. O fator é secretado por células tumorais e leva a um fenótipo de transição epitelial-mesenquimal, com aumento da invasividade e sobrevida do tumor. As setas indicam a fonte e os alvos do VEGF nos tumores. Fonte: Goel e Mercurio (2013).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica que apresenta massa molar de aproximadamente 45 kDa. É o principal regulador da formação de novos vasos sanguíneos durante o período embrionário, pós-natal e posteriormente na homeostase das células endoteliais fisiológicas (CARMELIET, 2005). Os membros da família VEGF incluem VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD e fator de crescimento placentário (PLGF). Estes membros possuem diferenças quanto a especificidade de receptores, padrão de expressão e funções biológicas. Os receptores para VEGF são receptores tirosina cinase, VEGFR1, VEGFR2, e VEGFR3, que estão expressos nas células endoteliais vasculares e são relacionados com a sinalização de VEGF (Figura 3). VEGF é mais conhecido como VEGFA e possui maior potencial angiogênico. O gene está localizado no cromossomo 6p21.3 (VINCENTI et al., 1996) e é altamente conservado entre as espécies (HOLMES; ZACHARY, 2005). VEGFA apresenta como variantes VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆ (FERRARA; GERBER; LECOUDER, 2003; WEDDELL; IMOUKHUEDE, 2018).

Figura 3 - Interação da família VEGF com seus receptores



A família VEGF inclui VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PLGF). Seus receptores tirosina cinase são: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3 tendo como co-receptores a neuropilina-1 (NRP-1) e neuropilina-2 (NRP-2). O efeito da ligação ao receptor na vasculatura e no

Sistema Nervoso Central (SNC) são: angiogênese, hematopoiese, recrutamento de células inflamatórias e sobrevivência neuronal, para ligação ao VEGFR-1; sobrevivência e migração das células endoteliais, vasculogênese, angiogênese, função de barreira hematoencefálica, sobrevivência e migração das células neuronais e células de Schwann, orientação axonal e proliferação de células-tronco neurais, para VEGFR-2; vasculogênese e linfangiogênese, para VEGFR-3. A ação biológica de VEGF-A, VEGF-B e PLGF pode ser reduzida a partir da captação pelo VEGFR-1 solúvel (sVEGFR1). (Adaptado de LANGE et al., 2016).

No câncer, o VEGF é o principal mediador da angiogênese, sendo regulado por múltiplos fatores de crescimento, pela hipóxia e sinalização oncogênica (GABHANN; POPEL, 2008; CARMELIET, 2005). O aumento da expressão e a ativação do fator de transcrição hipóxia-indutível-fator-1 (HIF-1) ou vias independentes do HIF-1 induz a expressão de genes que levam ao processo angiogênico (PUGH et al., 2003). A formação de uma nova vasculatura dentro e ao redor do tumor é requerida para o crescimento do câncer devido ao aporte de nutrientes e oxigênio (FERRARA, 2009; CARMELIET, 2005). Os vasos sanguíneos que compõem o microambiente tumoral, devido a rapidez com que a angiogênese ocorre para suprir as células, encontram-se distorcidos, aumentados, ramificados e com vazamentos hemorrágicos (NAGY et al., 2009; BALUK; HASHIZUME; MCDONALD, 2005; HASHIZUME et al., 2000).

Os tumores mais vascularizados estão relacionados ao mau prognóstico e desenvolvimento de metástases no câncer de mama (HORAK et al., 1992). Além disso, a falta de resposta aos tratamentos sistêmicos, como quimioterapia, pode ter relação com o aumento na expressão de VEGF em alguns pacientes, e assim, o conhecimento na expressão de VEGF no tumor pode auxiliar no tratamento personalizado, com agente antiangiogênico, combinado à terapia convencional (FOEKENS et al., 2001). Além disso, já foi encontrado uma maior expressão de VEGF em pacientes com câncer de mama triplo-negativo (LINDERHOLM et al., 2009). Receptores de VEGF nas células tumorais também estão envolvidos com o desenvolvimento dos tumores, levando a efeitos pró-tumorígenicos por sinalização autócrina na proliferação, sobrevivência, supressão da apoptose, adesão, migração celular e invasão (PERROT-APPLANAT; BENEDETTO, 2012).

Assim, devido ao papel essencial do VEGF na angiogênese tumoral, o respectivo gene torna-se um bom alvo para terapia antitumoral. Em 2004, o anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado

Bevacizumabe foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA como o primeiro inibidor da angiogênese para o tratamento do câncer colorretal metastático. A partir desse evento, muitos estudos foram desenvolvidos e estão em ensaios clínicos (WILLETT et al., 2004; HURWITZ et al., 2004).

Em um estudo clínico de fase III, a terapia combinada de bevacizumabe e paclitaxel melhorou a sobrevida livre de progressão, mas não a sobrevida global dos pacientes. Este mesmo efeito foi observado em outros estudos clínicos combinando bevacizumabe e quimioterapia (MILLER et al., 2007; BRUFISKY et al., 2011; MILES et al., 2010; ROBERT et al., 2011a. ROBERT et al., 2011b). Já com a capecitabina, houve uma melhora na taxa de resposta, porém não alterou a sobrevida dos pacientes (MILLER et al., 2005).

Fármacos que bloqueiam a ligação do VEGF aos receptores (como o bevacizumabe); anticorpos que bloqueiam a sinalização através de VEGFRs (por exemplo, ramucirumabe) e inibidores de tirosina cinase (TKIs) que bloqueiam a atividade cinase de VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3 (como o sorafenibe) são algumas abordagens aprovadas pelo FDA para o tratamento de diferentes tipos de câncer (ZIRLIK; DUYSSTER, 2018). Porém, como ainda há limitações dos inibidores da angiogênese na clínica, incluindo o desenvolvimento de resistência, aumento da hipóxia tumoral e redução da entrega do quimioterápico, a aprovação desta estratégia para o tratamento do câncer ainda é limitada (LIN; ZHANG; LUO, 2016).

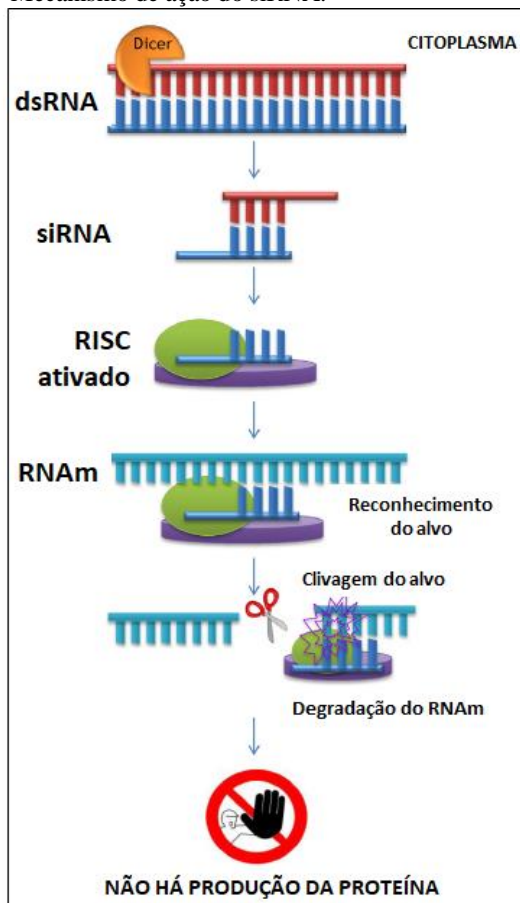
2.3 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA

A utilização da terapia por RNA de interferência tem se mostrado como uma terapia alvo com grande potencial para o tratamento do câncer. Essa terapia prevê a utilização de moléculas de siRNA para a diminuição da expressão de genes envolvidos com a doença. Desde 1998, quando o fenômeno de RNAi foi elucidado, e em 2006, com o Prêmio Nobel concedido para Andrew Z. Fire e Craig C. Mello pela descoberta da terapia por RNA de interferência (The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2006), muitos estudos vêm sendo realizados, com o intuito de reduzir a produção de proteínas de maneira específica, uma vez que as células de câncer apresentam genes superexpressos, incluindo oncogenes. Além disso, após a aprovação de Trastuzumab (Herceptin®) para tratamento de câncer de mama HER2 positivo, a aplicação de terapia alvo para o câncer de mama chamou a atenção para o desenvolvimento de estudos nessa área. (ZHANG; LI; HUANG, 2014; SCHMIDT, 2010;

ELBASHIR et al., 2001; DAVIDSON; MCCRAY, 2011; FIRE et al., 1998).

O silenciamento gênico por moléculas de siRNA ocorre fisiologicamente no citoplasma das células, onde um RNA longo de dupla fita (dsRNA) é clivado pela enzima Dicer, uma RNase tipo III, em pequenos RNAs, os siRNAs (molécula com 21-23 pares de base) (Figura 4). Essas moléculas apresentam uma fita sense e uma antisense complementar ao RNAm alvo. Após ligarem-se ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC), contendo a proteína argonauta 2, a fita sense é clivada, e a antisense liga-se ao RNAm complementar. O complexo RISC degrada o RNAm alvo, impedindo a tradução (PECOT et al., 2010; HANNON; ROSSI, 2004; MEISTER; TUSCHL, 2004; MARTINEZ et al., 2002). Moléculas de siRNA podem ser produzidas sinteticamente por um preço relativamente baixo, que aliado a alta especificidade, proporciona um grande potencial terapêutico.

Figura 4 - Mecanismo de ação do siRNA.



O silenciamento gênico ocorre no citoplasma das células. dsRNA: double-stranded RNA. siRNA: short interfering RNA. RNAm: RNA mensageiro. Fonte: CAVALLARO et al. (2017).

Para a terapia do câncer, principalmente câncer metastático, a entrega sistêmica de siRNA é essencial para ser efetiva. No entanto, os siRNAs são instáveis na circulação sanguínea, devido às propriedades das moléculas, como tamanho e carga negativa, sendo degradados por RNases séricas e eliminados rapidamente pelos rins, resultando em meia vida curta. Desta forma, ocorre um prejuízo na chegada e na penetração através das membranas celulares, além da indução de imunogenicidade quando aplicados na forma livre. Assim, para enfrentar essas barreiras, o

uso de nanocarreadores de entrega seguros e eficientes surge como uma alternativa (ZHANG et al., 2018; WITTRUP; LIEBERMAN, 2015).

Entretanto, desenvolver nanocarreadores que funcionem tanto *in vitro* quanto *in vivo*, também requer um *design* racional, devido às diversas barreiras biológicas, como o sistema imunológico, degradação nos vasos sanguíneos, penetração no tecido, entrada na célula e endossomas/lisossomas ácidos (Figura 5). (MA, 2014; PECOT et al., 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; KIM; ROSSI, 2007).

É comumente aceito que nanopartículas, por definição, apresentam pelo menos uma dimensão entre 1 e 100 nm (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2014; MASKOS; STAUBER, 2017; JEEVANANDAM et al., 2018). Uma vez nos vasos sanguíneos, as nanopartículas podem ser captadas por células do sistema imune, como monócitos, leucócitos, plaquetas e células dendríticas, processo que pode ocorrer por opsoninas e precisa ser evitado. Além disso, as propriedades físico-químicas das nanopartículas são importantes, pois dependendo do tamanho e carga superficial, efeitos como hemólise, trombogenicidade e ativação do sistema complemento podem ocorrer, causando toxicidade (PECOT et al., 2010; DOBROVOLSKAIA et al., 2008). Cargas positivas ou negativas podem induzir à fagocitose de nanopartículas por macrófagos e células de Kupffer no fígado e células dendríticas nos linfonodos. O tamanho também é importante para impedir o aprisionamento do siRNA nos sistemas reticuloendoteliais (SRE) do fígado, baço, pulmão e medula óssea. Um tamanho maior que 100 nm favorece o reconhecimento pelo SRE. Já dentro das células, as nanopartículas endocitadas podem alocar-se nos lisossomos, que possuem pH ácido e nucleases que degradam RNAs. Portanto, o escape do endossomo é importante para garantir o efeito de RNAi (DOMINSKA; DYKXHOORN, 2010; PECOT et al., 2010).

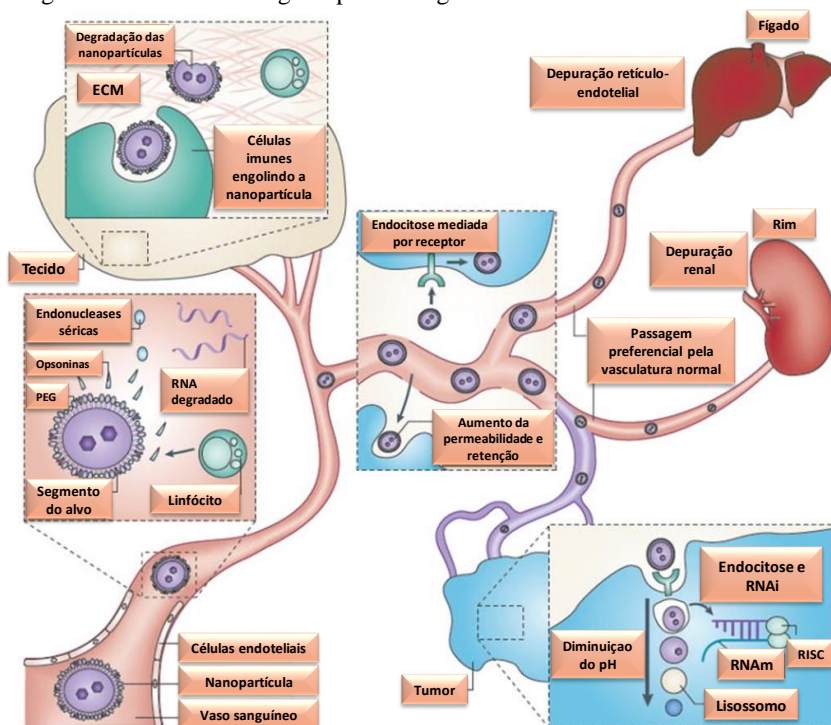
Como os tumores sólidos possuem espaços na vasculatura que os constitui e um sistema linfático insuficiente quando comparado aos tecidos saudáveis, as nanopartículas são capazes de acumular-se no tumor, fenômeno conhecido como efeito do aumento da permeabilidade e retenção (The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect) (MATSUMURA; MAEDA, 1986).

Essa diferença entre a vasculatura no tecido sadio e a tumoral pode ser explorada para alcançar a seletividade da terapia em tumores sólidos. Enquanto os vasos sanguíneos normais apresentam junções endoteliais extremamente justas, impedindo a penetração de moléculas nessa região, a alta permeabilidade, irregularidade, ausência de membrana basal e a

presença de vasos com espaços anormais no sistema vascular no tecido tumoral favorece o aumento da concentração de partículas no plasma e, conseqüentemente, acumulação passiva no tumor (GREISH, 2010).

Diversas terapias aprovadas para o câncer empregam o efeito EPR. Uma delas, o Onivyde® (Irinotecan), é um sal de sucrosfato irinotecano incorporado em lipossomas, indicado para o tratamento de adenocarcinoma metastático do pâncreas, combinado com 5-fluorouracilo e leucovorina. Um complexo de doxorubicina-citrato encapsulado em lipossomas, Myocet® (cloridrato de doxorubicina), igualmente utiliza esse efeito, em associação com ciclofosfamida, para o tratamento do câncer de mama metastático. Genexol® PM (paclitaxel) também é outro exemplo de agentes direcionados através do efeito EPR o qual consiste em uma formulação de paclitaxel em micelas poliméricas que possui como composição o monometoxi-poli (etileno glicol)-bloco-poli(D,L-láctico) (mPEG-PDLLA), com indicação para alguns tipos de câncer, inclusive o de mama (KALYANE et al., 2019).

Figura 5 - Barreiras biológicas para entrega de siRNA ou RNAi.



Caminho percorrido pela nanopartícula após administração sistêmica até incorporação ao RISC (Complexo de indução de silenciamento de RNA). Inicialmente, opsoninas nos vasos são capazes de provocar o englobamento das nanopartículas por macrófagos e as nucleases podem degradar o RNA. Uma vez fora dos vasos, a degradação pode ocorrer por células do sistema imune na matriz extracelular (ECM). Em seguida, as nanopartículas acumulam no tumor pelo efeito EPR ou por endocitose mediada por receptores. As partículas precisam evitar a depuração hepática e renal. No citoplasma da célula, o escape endossomal é essencial para que o mecanismo de ação por RNAi ocorra e proporcione o silenciamento gênico efetivo. PEG, poli(etilenoglicol). RNAm, RNA mensageiro. Fonte: PECOT et al. (2010).

Além dos aspectos relacionados às barreiras biológicas, o entendimento da biodistribuição do siRNA também é importante para avaliar o potencial desta estratégia farmacológica. Inicialmente, o siRNA distribui-se pelo sistema circulatório, nos primeiros minutos após a administração por via endovenosa. Em seguida, ocorre rápida depuração do sangue por acumulação hepática e filtração renal. A eliminação é

realizada pela urina em 5 minutos. A utilização de nanopartículas com tamanho acima de 10 nm pode evitar a rápida filtração glomerular pelos rins (WANG et al., 2017; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; WATER, 2006).

Apesar das inúmeras barreiras existentes, a terapia por RNAi aliada a alvos como o VEGF consiste em uma estratégia alternativa para terapia contra o câncer. No entanto, ainda faltam evidências científicas quanto aos resultados desta tecnologia no organismo humano (LU; XIE; WOODLE, 2005).

Em 2004, um ensaio clínico utilizando siRNA livre para o gene VEGF (bevasiranib) em pacientes com Degeneração Macular Relacionada à Idade e Edema Macular Diabético, com o objetivo de inibir a neovascularização da retina, demonstrou atividade biológica nas fases I e II, porém, foi descontinuado em 2009 na fase III, devido a interação inespecífica com receptores TLR4, que medeiam a inflamação (BURNETT; ROSSI, 2012; ClinicalTrials.gov, 2008).

Todavia, com o auxílio da nanotecnologia, é possível expandir os ensaios para entrega sistêmica (OZCAN et al., 2015). Outro ensaio clínico utilizando siRNA para VEGF verificou partículas lipídicas para entrega sistêmica em tumor sólido avançado com envolvimento hepático. Neste ensaio, dois siRNAs distintos, um para silenciamento dos genes de proteína do fuso de cinesina (KSP), e outro o VEGF, carregados pelas partículas, mostrou efeito antiangiogênico e boa tolerabilidade na fase I. No momento, um estudo de segurança em longo prazo está sendo realizado (TABERNERO et al., 2013; ClinicalTrials.gov, 2011; ClinicalTrials.gov, 2012).

Muitos estudos de fase clínica atuais utilizando nanopartículas estão em fase I, para avaliação da segurança e utilidade nos respectivos tratamentos. É importante que estudos futuros envolvam a análise do perfil de segurança de sistemas para entrega *in vivo* de siRNA, que promovam segurança e biocompatibilidade (JAIN; PATHAK; VAIDYA, 2018).

Em agosto de 2018, a Alnylam Pharmaceuticals, Inc. anunciou que o FDA aprovou a injeção do complexo lipídico ONPATRO™ (patisiran), o primeiro produto baseado em RNA de interferência (RNAi), para o tratamento da polineuropatia da amiloidose hereditária mediada por transtirretina em adultos. É uma doença rara, com rápida progressão e fatal que tem como causa a mutação no gene TTR (transtirretina). O medicamento utiliza um siRNA contra TTR no fígado, diminuindo a produção da proteína em 84%. É administrado por infusão endovenosa uma vez a cada 3 semanas, na dosagem de 0.3 mg/kg. (ADAMS et al.,

2018; PHARMACEUTICALS, 2018). A aprovação desse medicamento demonstra que a utilização de RNAi para tratamento de outras doenças crônicas e ainda sem perspectiva de cura, como vários tipos de câncer, tem um futuro próximo e promissor, e que estudos nesta área consolidam a comprovação dos benefícios da terapia.

2.4 ENTREGA *IN VIVO* DE siRNA UTILIZANDO NANOCARREADORES

Como já mencionado em sessões anteriores, um dos maiores desafios para aplicação do siRNA na clínica é a instabilidade da molécula de siRNA, além das barreiras a transpor *in vivo*. Neste sentido, a nanotecnologia torna-se opção expressiva para uma terapia efetiva, para a qual deve-se considerar a biocompatibilidade e segurança, a entrega no alvo específico, além da viabilidade econômica, fatores primordiais no desenho e planejamento de nanocarreadores (ACHARYA et al., 2017; CHOUNG et al., 2006). A nanotecnologia aliada ao tratamento do câncer é uma área de desenvolvimento em constante crescimento nos últimos anos. O uso de nanopartículas tem como vantagem possibilidades de alteração e manipulação de propriedades de materiais para o desempenho de determinadas funções. Apesar das inúmeras vantagens no uso de nanocarreadores, estudos nessa área são importantes para um maior entendimento do uso racional da nanotecnologia, com seletividade, eficácia e segurança (MISRA; ACHARYA; SAHOO, 2010). A complexidade dos nanomateriais, toxicidade em pacientes e no meio-ambiente, alto custo de produção e liberação precoce do fármaco são alguns dos problemas atuais relacionados a utilização de sistemas nanoestruturados na clínica e que precisam ser contornados para assegurar a confiança nos produtos à base de nanotecnologia (PILLAI, 2019).

Vetores virais, como retrovírus e adenovírus, podem ser utilizados com eficiência para entrega de siRNA, porém problemas com segurança, como patogenicidade do material viral utilizado e reconhecimento pelo sistema imune limitam a aplicação. Nesse contexto, os vetores não virais adquirem importância como alternativas de sistemas de entrega. Diversos materiais vêm sendo utilizados para construção de nanocarreadores, incluindo inorgânicos e orgânicos. Estes materiais interagem com o siRNA, formando uma estrutura de proteção para impedir a degradação e aumentar o tempo do ácido nucleico na circulação sanguínea (ZHANG; LI; HUANG, 2014).

Entre os materiais utilizados para a produção de nanopartículas, destaca-se o fosfato de cálcio (CaP). Como é um mineral encontrado em dentes e ossos, pode ser definido como um material inorgânico biocompatível. Além disso, precipitados de CaP são potenciais para encapsulamento de siRNA, pois podem ligar-se por interações eletrostáticas aos ácidos nucleicos e poliânions. Porém, um dos problemas está na formação de aglomerados, uma vez que, após a preparação, podem formar cristais que crescem de forma rápida e descontrolada. Este problema pode ser contornado com a utilização de polímeros como o PEG, o qual proporciona a formação de nanopartículas com tamanho controlado e estáveis (KIM et al., 2016; PITTELLA et al., 2011; PITTELLA et al., 2012).

Os polímeros são versáteis e possuem a capacidade de melhorar a farmacocinética e a biodistribuição do siRNA. A pegilação é uma estratégia importante para evitar efeitos tóxicos sistêmicos. A carga neutra do polietilenoglicol, bem como a hidratação, proporcionam a formação de uma camada hidratada de cadeias longas e flexíveis, tendo como consequência a estabilização estérica. Polímeros sintéticos, como PEG, bem como blocos de copolímeros, têm sido utilizados com sucesso para produção de nanopartículas poliméricas eficientes na entrega, com liberação controlada e estáveis na circulação sanguínea (LEE et al., 2016; CAVALLARO et al., 2017; LEE; LEE; ANDRADE, 1995).

De acordo com nossos trabalhos anteriores prévios, as nanopartículas carreadoras de siRNA constituídas de CaP e blocos de copolímeros PEG-P-ácido glutâmico foram desenvolvidas com sucesso e testes demonstraram que o sistema é eficiente para realizar a transfecção de siRNA em células de câncer de mama *in vitro* (SOUZA, 2016). Além disso, nosso grupo utilizou nanopartículas similares, também contendo CaP, para entrega de siRNA para os genes BCL-2 e BCL-XI no câncer de mama, as quais demonstraram eficiência *in vitro* e *in vivo* (MELLO et al., 2017; MELLO et al., 2018).

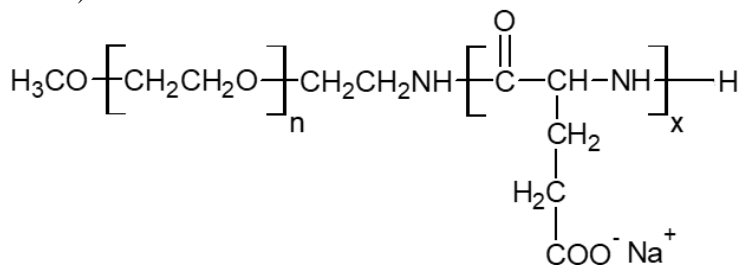
Neste trabalho, daremos continuidade aos testes *in vitro*, verificando a eficiência do nanocarreador em entregar o siRNA *in vivo* e promover o silenciamento gênico para *Vegf* em tumor de mama murino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Primers e siRNA foram adquiridos da Sigma-Aldrich® Brasil. Álcool etílico foi adquirido da Lafan Química Fina (Várzea, SP, Brasil). Fosfato de sódio tribásico (Na₃PO₄) e cloreto de cálcio (CaCl₂) foram adquiridos da Nuclear. Cloreto de Sódio (NaCl) e os tampões TRIS (2-Amino-2-hydroximetil-propano-1,3-diol) e HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico] foram adquiridos da Synth (Diadema, SP, Brasil). Os ultrafiltros Amicon® foram adquiridos da Millipore (Massachusetts, EUA). Rneasy mini kit foi adquirido da Qiagen (Valencia, CA). O kit high capacity-cDNA Reverse Transcription foi adquirido da Applied Biosystems (Califórnia, EUA). O kit Power SYBR-Green PCR Master Mix foi adquirido da Thermo Scientific (CA, EUA). O polímero PEG-Poliânion metoxi-poli (etileno glicol) - (L-ácido glutâmico) [PEG-b-poli(GLU)] (Figura 6) foi adquirido da Alamanda Polymers (Huntsville, AL, EUA).

Figura 6 - Estrutura do bloco de copolímero PEG-P-ácido glutâmico (PEG-PGLU).



O copolímero PEG-PGLU foi utilizado para a preparação das nanopartículas híbridas. n=113. x=50.

3.2 DESENHO DA SEQUÊNCIA DE siRNA

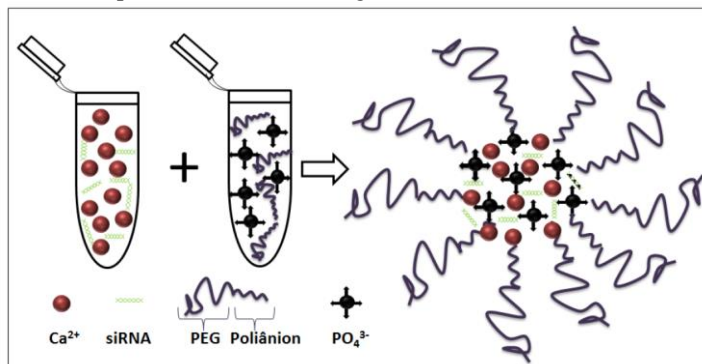
A ferramenta Whitehead siRNA Selection Server, seguida de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), foi utilizada para desenhar a molécula de siRNA complementar ao gene *Vegf*, observando critérios para obter-se uma sequência efetiva. Os critérios para seleção da sequência foram: localização em 50 a 100 nucleotídeos do códon inicial (ATG); sequência padrão AA (N19) TT ou NA (N21), ou NAR (N17)YNN, (em que N é qualquer nucleotídeo, R representa purina (A, G) e Y é pirimidina (C, U)); teor de guanina e citosina entre 30-52%; trechos de quatro ou mais repetições de nucleotídeos, sequências que partilham certo grau de homologia com outros genes e diferença de energia de ligação (fita sense e antisense) positiva foram evitados (REYNOLDS et al., 2004; YUAN et al., 2004; KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2003; SCHWARZ et al, 2003). A sequência de siRNA para o gene *Vegf* (*Vegfa*) escolhida foi 5' GAUAUCCGUAGUACAUAU dTdT- 3' sense e 5' AUAUGUACUACGGAAUAUC dTdT - 3' antisense.

3.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP

Para a preparação das nanopartículas, um método simples, envolvendo apenas mistura de componentes, foi utilizado, para que os íons presentes em solução se auto-associem (*self-assembly*) por interações eletrostáticas, e assim ocorra a complexação do siRNA.

Portanto, as seguintes soluções foram preparadas: 2,5M de CaCl₂, 10mM de TRIS pH 10 e TRIS pH 7,4, 10mM de HEPES, pH 7,4 e 50mM de HEPES-fosfato pH 7,4, contendo 1,5mM de Na₃PO₄ e 140mM de NaCl. Inicialmente, diluiu-se o polímero PEG-Poliânion metoxi-poli (etileno glicol) – bloco-poli (L- sal de sódio de ácido glutâmico) [PEG-b-poli(GLU)] (5K-50DP) (PEG-PGLU) em TRIS pH 7,4 em uma concentração de 1000 µg/mL e o siRNA em HEPES pH 7,4, em uma concentração de 15 µM. Então, misturou-se as soluções de CaCl₂, TRIS pH 10 e siRNA com outra de HEPES-fosfato e PEG-PGLU, em uma concentração final de siRNA de 2,25 µM, de acordo com SOUZA, 2016 (Figura 7). Após 20 segundos, as nanopartículas preparadas foram imediatamente submetidas ao processo de purificação, caracterizadas e utilizadas para os experimentos.

Figura 7 - Esquema da estrutura das nanopartículas híbridas contendo CaP e bloco de copolímero PEG-P-ácido glutâmico.



As nanopartículas se formam por auto-associação devido as cargas dos componentes cálcio, siRNA, PEG-P-ácido glutâmico e fosfato. Fonte: (SOUZA, 2016).

3.4 PURIFICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP

Foi utilizado um sistema de ultrafiltração com um dispositivo Amicon (peso molecular de *cut-off* (MWCO): 10 kDa) para purificar as nanopartículas contendo siRNA e PEG-PGLU, imediatamente após a preparação, removendo o excesso de íons cálcio livre. O filtro foi previamente lavado 1 \times com água deionizada para reduzir as interações não específicas com a membrana. A centrifugação foi realizada a 3,000 \times g, 4° C durante 30 min. Com esta operação de purificação, a remoção do excesso de íons ocorre pela passagem através do filtro e as nanopartículas acima do *cut-off* são coletadas e utilizadas para os experimentos futuros.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP PURIFICADAS

Após a purificação das nanopartículas, foi realizada a determinação do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PdI), a partir de medidas de DLS no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), a 25°C, ângulo de detecção de 173° com um laser He-Ne (633 nm). Os resultados foram analisados a partir da velocidade de decaimento da função de correlação de fótons. Já a carga superficial foi verificada por medidas de potencial zeta das nanopartículas purificadas,

posteriormente restituídas ao volume inicial em água, na qual a migração é analisada devido a um campo elétrico presente que as orienta ao moverem-se em direção a um eletrodo de carga oposta. Também foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS. Para análise dos resultados, foi utilizado o software Zetasizer 7.12.

3.6 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOPARTÍCULAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP PURIFICADAS POR MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE TRANSMISSÃO

O Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) foi utilizado para avaliar a morfologia das nanopartículas após o processo de purificação. Para isso, foi utilizado o equipamento JEM-1011 TEM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC. As amostras foram aplicadas em grids de níquel de malha 200 revestidos com Parlodion® e carbono amorfo e deixadas por 24h a temperatura ambiente para posterior análise.

3.7 ESTABILIDADE DO SISTEMA

A estabilidade coloidal das nanopartículas PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas (puras e diluídas em salina) foi verificada por meio do aspecto macroscópico e da medida de tamanho por DLS, depois de armazenadas a 4°C, conforme descrito no item 3.5, em diferentes tempos.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO E FÓSFORO NA FORMULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

Como as nanopartículas foram purificadas para remoção de íons cálcio livre, a quantidade de cálcio foi determinada na solução de nanopartículas purificadas e não purificadas pelo laboratório CITOVET, utilizando kit comercial (Biotécnica, Minas Gerais), pelo método de Arsenazo. Os valores obtidos foram utilizados para calcular a eficiência de remoção dos íons cálcio em solução.

A quantificação de fósforo, que é um componente na estrutura de CaP, antes e depois da purificação também foi realizada, pelo laboratório CITOVET, pelo método de fosfomolibdato.

3.9 ESTUDOS *IN VIVO*

Para os estudos *in vivo*, foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas com aproximadamente 4-8 semanas de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas próprias, de plástico, cobertas com serragem, que foram substituídas a cada três dias, em ambiente interno adequado com livre acesso à água e comida e temperatura controlada de $23\pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12h. Durante todo o período experimental, foram realizadas observações para avaliar dor, estresse e desconforto que pudessem aparecer nos animais, para determinar o ponto final humanitário. Os seguintes aspectos foram verificados: alterações de massa corporal, mudanças no consumo de água e comida, aparência física, sinais clínicos (como defecação e mudanças no batimento cardíaco e no ritmo respiratório), mudanças comportamentais não induzidas e respostas a estímulos externos relacionadas ao comportamento. Os experimentos seguiram de acordo com os preceitos éticos para experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Santa Catarina, sob parecer número PP00892 (anexo A) e da Universidade Federal de Juiz de Fora, (protocolo 013/2017), anexo B.

Os animais foram anestesiados com solução de quetamina e xilazina antes da eutanásia (ponto final experimental), para posterior retirada dos órgãos.

3.9.1 Aplicação do modelo de câncer de mama murino

Neste modelo de câncer de mama murino, 5×10^4 células de adenocarcinoma de mama murino (4T1) foram inoculadas no tecido subcutâneo da mama inferior abdominal direita dos camundongos BALB/c fêmeas, de acordo com Pulaski e Ostrand-Rosenberg (2001), com modificações. Os tumores foram monitorados durante 20 dias, até crescimento, quando os animais foram separados randomicamente em grupos com tamanho similar de tumor.

3.9.2 Avaliação da atividade antitumoral

Após o crescimento dos tumores, os animais receberam injeção intravenosa, por veia lateral da cauda, com NP PEG-PGLU/siRNA/CaP (25 μg de siRNA para *Vegf* em 200 μL de injeção, n=4). No grupo controle foi injetado solução de salina estéril (200 μL por injeção). As injeções foram realizadas de maneira lenta e cuidadosa, nos dias 1, 4, 7 e 12. Os

parâmetros avaliados foram o tamanho do tumor e a massa de cada animal, verificados a cada dois dias, até o 14^o dia, quando os animais foram eutanasiados. Um paquímetro foi empregado para dimensionar os tumores e a seguinte fórmula adaptada (EUHUS et al., 1986) foi utilizada para calcular o volume do tumor:

$$volume = \frac{1}{2} (comprimento \times largura^2)$$

3.9.3 Avaliação do silenciamento do gene *Vegf* *in vivo*, por meio da técnica de RT-qPCR, após tratamento com as nanopartículas híbridas

A avaliação do silenciamento do gene *Vegf* *in vivo* foi realizada a partir do processamento de uma amostra do tecido tumoral, após 24 h da administração de NP PEG-PGLU/siRNA/CaP (25µg de siRNA para *Vegf* em 200 µL de injeção), utilizando o kit RNeasy® Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop light spectrophotometer (Thermo Scientific Inc., CA, USA) e o cDNA foi sintetizado, utilizando o kit high capacity-cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Califórnia, EUA). A avaliação foi realizada por RT-qPCR no equipamento StepOne Plus Real-time PCR (Applied Biosystems) (Quadro 1). Para a reação, utilizou-se SYBR Green. A expressão gênica foi normalizada pela beta-actina murina (gene constitutivo). As sequências murinas (5'-3') dos primers usados foram: GCACTGGACCCTGGCTTTAC (*Vegf* forward) e GGACTTCTGCTCTCCTTCTGTC (*Vegf* reverse) e TCAGCAAGCAGGAGTACGATG (β-actina forward) e AACGCAGCTCAGTAACAGTCC (β-actina reverse). A eficiência dos primers também foi verificada utilizando o StepOne software 2.3.

Quadro 1 - Método utilizado para a qPCR.

| | Holding Stage | | Cycling Stage (40 ciclos) | | | Melt Curve Stage | | | |
|-------|------------------|-------|------------------------------|-----|-----|------------------|------|-----|----|
| | Temperatura (°C) | 50 | 95 | 95 | 60 | 72 | 95 | 60 | 95 |
| Tempo | 2 min | 2 min | 15 s | 30s | 38s | 15 s | 1min | 15s | ∞ |

3.9.4 Western blotting

Para verificar a quantidade de proteína VEGF no tumor, após 24 h da aplicação das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP (25µg de siRNA para VEGF em 200 µL de injeção), análise por Western blotting do tumor processado foi realizada. Para isso, 100 mg do tumor foi homogeneizado com 500 µL de tampão RIPA contendo inibidores de protease (pepstatina 1 µL/mL, leupeptina 1 µL/mL, aprotinina 2.5 µL/mL e PMSF 5 µL/mL), usando o equipamento 10 Basic Ultra Turrax (IKA®). As amostras foram colocadas em gelo e homogeneizadas em vórtex 4 vezes por 30 min. Então, foram centrifugadas a 3000 × g, 10 min, 4 °C. A concentração de proteínas no sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Para a eletroforese, 35 µg de proteínas totais foram utilizadas e um gel de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sódio a 15% foi preparado. Após a separação das proteínas, foi realizada a eletrotransferência em membranas de nitrocelulose. O bloqueio das membranas foi realizado com BSA (5% em TBS- solução salina Tris-tamponada) por 1h sob agitação e posteriormente realizou-se 3 lavagens com TBS-T (TBS com Tween 20). A incubação das membranas com os anticorpos primários específicos para VEGF (1:100 in TBS-T e 2% de BSA) e β-actina (1:2000 em TBS-T e 2% de BSA) (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) foi realizada overnight a 4 °C sob agitação suave. As membranas foram lavadas 4 vezes com TBS-T e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (1:10.000 em TBS-T e 1% de BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência, utilizando Amersham ECL™ e visualizadas no equipamento ChemiDoc MP (Bio-Rad). A quantificação das proteínas foi normalizada com a β-actina, através do software da Bio-Rad (Image Lab).

3.9.5 Avaliação Histopatológica após administração das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP contendo siVEGF

Os órgãos (fígado, baço, pulmão, coração, rins) e o tumor foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 h e desidratados em álcool para análise histopatológica. As amostras foram embebidas em blocos de parafina, seccionadas com diâmetro de 5 µm e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas histológicas foram analisadas e as imagens foram obtidas em Digitalizador de Lâminas AXIO SCAN (Zeiss, Alemanha) e software ZEN versão 8.1.

3.9.6 Avaliação da biodistribuição e acumulação no tumor das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP *in vivo*

Nanopartículas encapsulando siRNA com marcador Cianina 5 ligado na fita sense 5' (25µg em 200 µL de injeção, n=4) foram injetadas na veia caudal. Transcorrido o período de três horas após a aplicação sistêmica das nanopartículas, os animais anestesiados foram eutanasiados e os órgãos (fígado, baço, pulmão, coração, rins) e os tumores, extraídos. A verificação da biodistribuição do siRNA marcado com cianina 5 ocorreu através da análise da fluorescência por contagem de fótons, no equipamento In-Vivo Xtreme®. Os resultados foram expressos como contagem total da fluorescência normalizado pela massa de cada órgão e tumor.

3.9.7 Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos após administração das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP contendo siVEGF

Após 24 horas da administração das nanopartículas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP (25µg de siRNA para *Vegf* em 200 µL de injeção, n=10) e de salina, foi realizada a coleta por punção cardíaca, nos animais previamente anestesiados pela via intraperitoneal, com quetamina e xilazina, em tubos BD Vacutainer® *blood collection tubes* (Becton Dickenson, UK) contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético). O perfil hematológico dos animais foi determinado a partir de amostras de sangue total, processadas em equipamento SDH-3 (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais). Foram realizadas as contagens de leucócitos totais e diferencial, plaquetas, hemácias, além da determinação da concentração de hemoglobina e da porcentagem de hematócrito dos animais, VCM

(Volume Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média).

Para avaliação do perfil bioquímico dos animais, foram utilizados kits comerciais veterinários (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais) e equipamento automatizado Labmax Plenno (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais) para determinação de AST (Aspartato Aminotransferase), ALT (Alanina Aminotransferase), ureia e creatinina e proteína plasmática.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A menos que indicado, os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando o software GraphPad Prism®. Primeiramente, para definir se a amostra possui distribuição normal (Gaussiana), foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Assim, teste t de student e Mann-Whitney t test foram utilizados. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

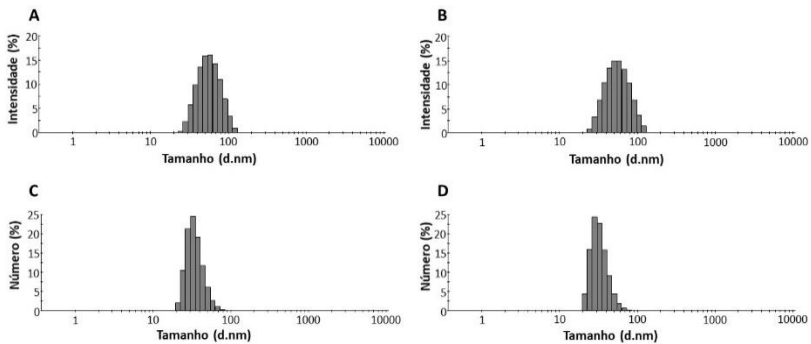
As nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP foram preparadas por simples mistura dos componentes incluindo cálcio, fosfato, siVEGF e PEG-PGLU, que se autoassociam por interações eletrostáticas. O processo de purificação utilizando o dispositivo filtrante Amicon® foi realizado a fim de remover íons cálcio livres em excesso das soluções.

As NP PEG-PGLU/siRNA/CaP apresentaram um tamanho médio de 53 ± 4 nm em diâmetro e PdI de $0,09 \pm 0,02$ (média \pm desvio padrão) antes da purificação (SOUZA, 2016) e de $48 \pm 9,6$ nm em diâmetro e PdI de $0,13 \pm 0,02$ após o processo de purificação. Com os histogramas apresentados na figura 8 é possível observar que a purificação não alterou as propriedades de tamanho e índice de polidispersão das partículas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Pittella et al. 2012, que, a partir do processo de purificação, obtiveram nanopartículas com distribuição de tamanho estreita, comparável àquelas não purificadas. Este dispositivo de ultrafiltração já foi utilizado também em outros trabalhos envolvendo nanopartículas contendo cálcio, para purificação e aplicação *in vivo* (LOC et al., 2017; TOBIN et al., 2013). Além disso, o tamanho obtido das estruturas parece adequado para aplicação *in vivo*, uma vez que foi possível controlar o crescimento dos cristais de CaP. O controle do tamanho é importante já que quanto maior o tamanho das partículas, maior a probabilidade de reconhecimento e eliminação pelas células hepáticas e fagocíticas do RES, reduzindo a eficácia de um tratamento. Além disso, a rápida depuração pode ser evitada pela estratégia de revestimento das partículas com polímeros como o polietileno glicol (PEG). Ainda, nanopartículas com tamanho menor que 10 nm podem ser eliminadas de maneira rápida pelos rins, enquanto as maiores de 200 nm podem ser removidas pela ativação do sistema complemento (HOSHAYAR et al., 2016; PILLAI, 2019; KULKARNI; FENG, 2013; ZUCKERMAN et al., 2012).

O potencial zeta das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP permaneceu próximo da neutralidade (-1,6 mV) devido à presença de PEG na superfície. Partículas que apresentam carga neutra possuem uma menor taxa de opsonização quando comparadas às partículas carregadas e aumento no tempo de circulação, devido ao revestimento hidrofílico e ao impedimento estérico proporcionado pelo PEG (AGGARWAL et al.,

2009; OWENSIII; PEPPAS, 2006; ROSER; FISCHER; KISSEL, 1998). Sabe-se que a fagocitose das nanopartículas pode ocorrer pela adsorção de certos componentes do sangue na superfície das partículas, como as opsoninas. Outro obstáculo que pode ser evitado quando da administração de nanopartículas revestidas com PEG é a interação com o RES. Assim, o fármaco pode atingir o local desejado e ser liberado, uma vez que o aumento no tempo de circulação sanguínea pode ser alcançado (GREF et al., 2012).

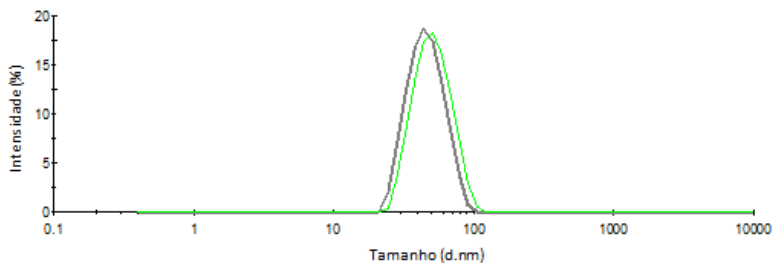
Figura 8 - Caracterização das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP por DLS.



Histograma de distribuição de tamanho por intensidade em (A) antes da purificação e (B) após a purificação, e por número em (C) antes da purificação e (D) após a purificação.

Uma vez que as nanopartículas foram administradas com salina, também foram observados o tamanho e PDI após exposição a esta condição. Como verificado na figura 9, não houve mudança significativa quanto a estes parâmetros imediatamente após adição de salina, o que é desejável para assegurar a eficácia da administração sistêmica.

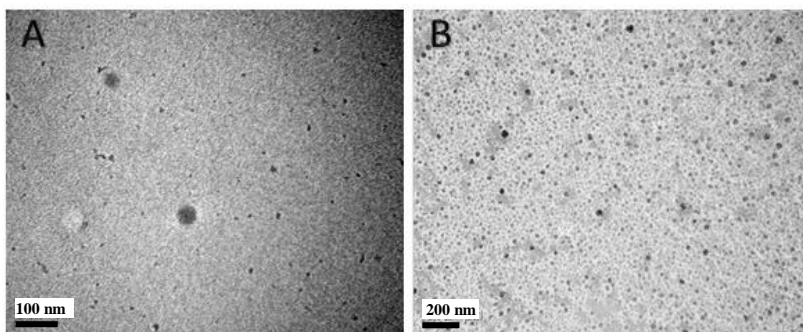
Figura 9 - Caracterização das nanopartículas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP imediatamente após adição de salina.



Curva de frequência de tamanho por intensidade (%) em cinza (antes da adição de salina) e em verde (após adição de salina), medida por DLS.

A microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas purificadas revelou uma forma relativamente esférica (Figura 10), também muito semelhante às não purificadas (SOUZA, 2016). Nanopartículas esféricas apresentam facilidade de internalização, devido a simetria, e ainda, são capazes de deslocarem-se em direção às paredes dos vasos e extravasar a partir do vaso para o tumor, pelos espaços presentes entre as células endoteliais, visto que a neovascularização nos tumores apresenta espaços intercelulares maiores do que em vasos de tecidos saudáveis (TOY et al., 2014; GREISH, 2010).

Figura 10 - Determinação da morfologia das nanopartículas híbridas purificadas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

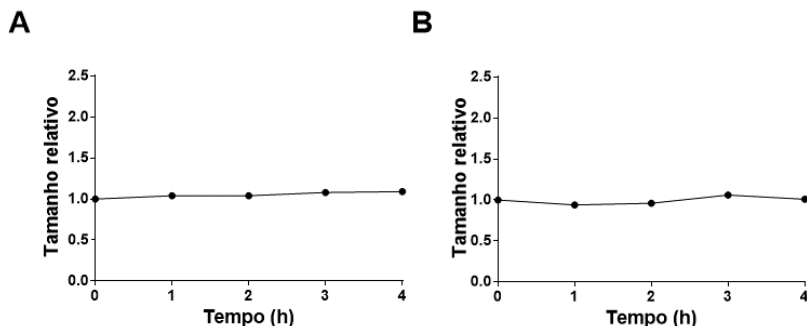


As partículas apresentaram forma relativamente esférica, na revelação por TEM. A: escala em 100nm. B: escala em 200nm.

4.2 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

As NP PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas foram armazenadas a 4°C para a verificação da estabilidade do sistema em relação a estocagem. Como observado na figura 11, tanto as nanopartículas não purificadas, quanto as purificadas após adição de salina, permaneceram estáveis após 4 horas de armazenamento.

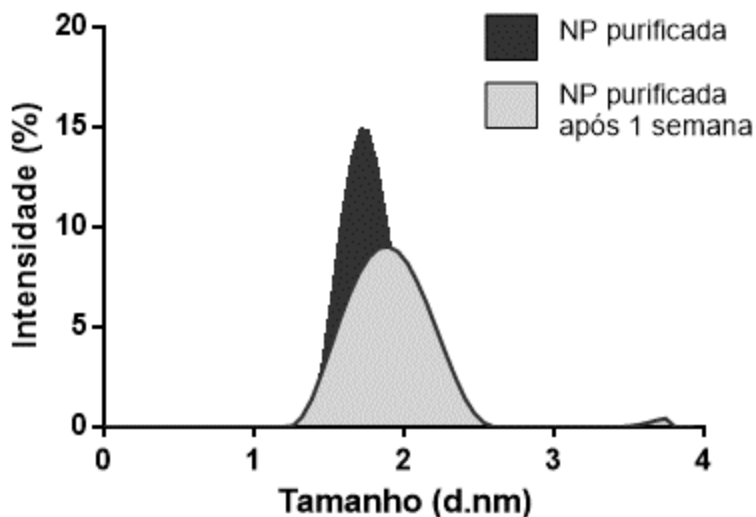
Figura 11 - Estabilidade das nanopartículas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas e em salina



A estabilidade da nanopartícula purificada (A) e purificada com adição de salina (B) armazenadas a 4°C foi determinada por DLS. Eixo Y: tamanho relativo. Eixo X: tempo em horas. Desvio padrão da média no tempo 0 de 0,002 para purificada e de 0,02 para purificada com adição de salina:

Após uma semana de armazenamento (figura 12), houve um aumento no tamanho e índice de polidispersão, com as nanopartículas apresentando 72 ± 4 nm e PdI $0,29 \pm 0,07$ (média \pm desvio padrão). O processo de purificação pode alterar a estabilidade do sistema, uma vez que as nanopartículas não purificadas apresentaram uma estabilidade de até 28 dias em geladeira (SOUZA, 2016). Pittella et al (2012) verificou que, após 96h, nanopartículas híbridas purificadas utilizando PEG-CCP (*charge-conversional polymer*) apresentaram aumento de tamanho devido a formação de agregados e comprometimento da estabilidade coloidal por dissolução do polímero. Neste caso, a técnica de liofilização pode ser uma ferramenta para aumentar a estabilidade dessa formulação após purificação, processo no qual a água é removida após ser congelada e colocada sob vácuo, condição em que o gelo muda do estado sólido para vapor de maneira direta (ABDELWAHED et al., 2006).

Figura 12 - Avaliação da estabilidade das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas por ultrafiltração, após 1 semana.



Mudança na distribuição de tamanho por intensidade após uma semana de armazenamento a 4°C. Análise por DLS. Em preto, histograma da nanopartícula purificada. Em cinza, histograma da nanopartícula purificada após armazenamento. Eixo Y: Intensidade (%). Eixo X tamanho em d.nm em escala logarítmica.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO E FÓSFORO NAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS NP PEG-PGLU/siRNA/CaP PURIFICADAS

O processo de purificação realizado permite o processamento rápido da formulação das nanopartículas, com recuperação da amostra, através de filtros de ultrafiltração. O método colorimétrico arsenazo foi utilizado para quantificação de cálcio antes e após a purificação. O método de purificação demonstrou-se eficiente, com remoção de 88% da quantidade de cálcio original, sendo que, o restante está contido na estrutura das nanopartículas híbridas. Resultado similar foi encontrado por Pittella et al. (2012), com uma eficiência de 84%. A purificação também foi capaz de remover 56% do fósforo presente na formulação de nanopartículas. Na tabela 1, é possível verificar a quantidade de cálcio em mmol antes e após o processo de purificação.

Tabela 1 - Quantidade de cálcio e fósforo antes e após processo de purificação.

| | Antes da purificação | Após a purificação | Eficiência de remoção |
|---------|----------------------|--------------------|-----------------------|
| Cálcio | 77 mmol | 9,5 mmol | 88% |
| Fósforo | 0,48 mmol | 0,21 mmol | 56% |

4.4 RESULTADOS *IN VIVO*

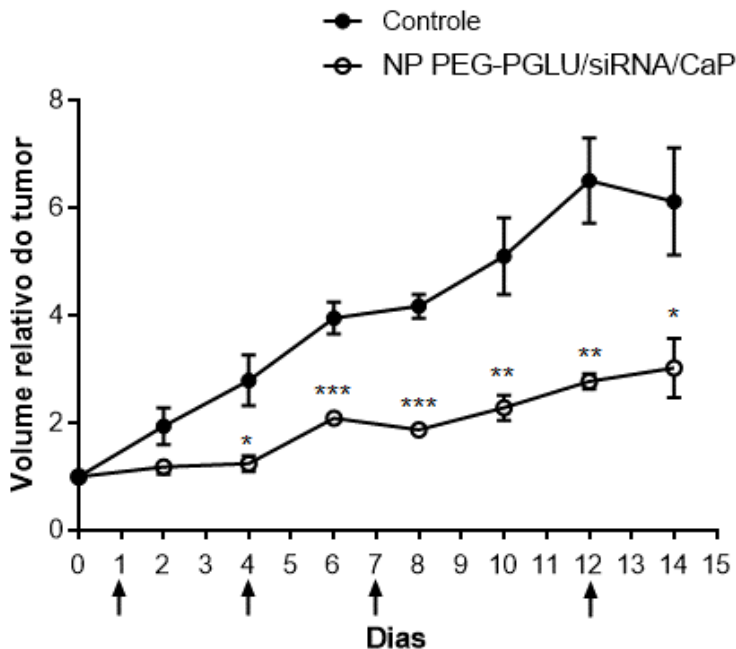
4.4.1 Atividade antitumoral das nanopartículas híbridas contendo siVEGF

Foi identificado inibição no crescimento do tumor nos animais tratados com as NP PEG-PGLU/siRNA/CaP, em relação àqueles tratados apenas com salina, verificado pela redução na variação do volume do tumor a partir da primeira injeção da formulação (figura 13). Destacam-se os dias 4, 6, 8, 10, 12 e 14, em que foram encontradas diferenças significativas. Esse resultado sugere que as nanopartículas foram eficientes em entregar o siRNA ao tumor. Vale destacar que o modelo de câncer de mama 4T1 utilizado é altamente tumorigênico e invasivo e mimetiza as condições desenvolvidas em humanos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

Ainda, como observado na figura 14, não foi observada perda de massa durante os 14 dias de tratamento, quando comparados os animais dos grupos controle e tratado. Durante o estudo, os animais alimentaram-se normalmente e não apresentaram mudanças comportamentais relacionadas ao estresse, indicando ausência de toxicidade aguda ou grave resultante do tratamento. Esses resultados sugerem que as NP PEG-PGLU/siRNA/CaP purificadas não apresentaram toxicidade sistêmica quando administradas endovenosamente. Vale mencionar que o fosfato de cálcio é um componente que pode fazer parte da constituição de organismos eucariotos. Além disso, está presente em diversas formas como hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato octacálcico, fosfato dicálcico e fosfato de cálcio amorfo, os quais têm sido utilizados na clínica para diferentes aplicações terapêuticas (EPPLÉ, 2018; LU; YU; CHEN, 2018; HABRAKEN et al., 2016). A utilização do PEG na composição das nanopartículas para controlar os cristais de fosfato de cálcio é essencial, uma vez que este polímero é o mais encontrado em sistemas para liberação de fármacos utilizados na clínica, por ser um componente hidrofílico, não interagir ou interagir fracamente com os

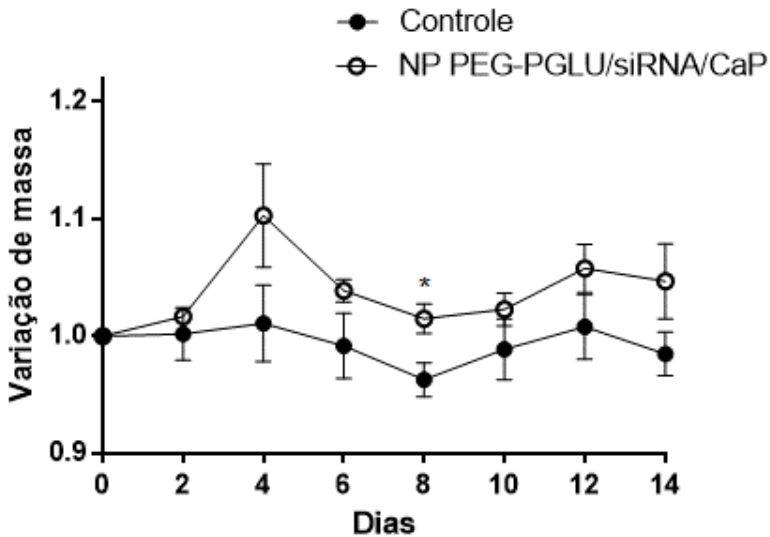
elementos do sangue e apresentar biocompatibilidade (KNOP et al., 2010).

Figura 13 - Atividade antitumoral *in vivo*.



Administração intravenosa de NP PEG-PGLU/siRNA/CaP em camundongos Balb/c. Tempo de monitoramento de 14 dias. Círculo fechado e aberto indicam grupos tratados com salina e NP PEG-PGLU/siRNA/CaP para *Vegf*, respectivamente. As setas no eixo x indicam os dias de injeção. O volume do tumor de cada animal foi normalizado pelo volume do primeiro dia. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média (EPM), n=4. Teste t de Student por dia de tratamento. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001.

Figura 14 - Monitoramento temporal da massa corporal dos animais em tratamento.

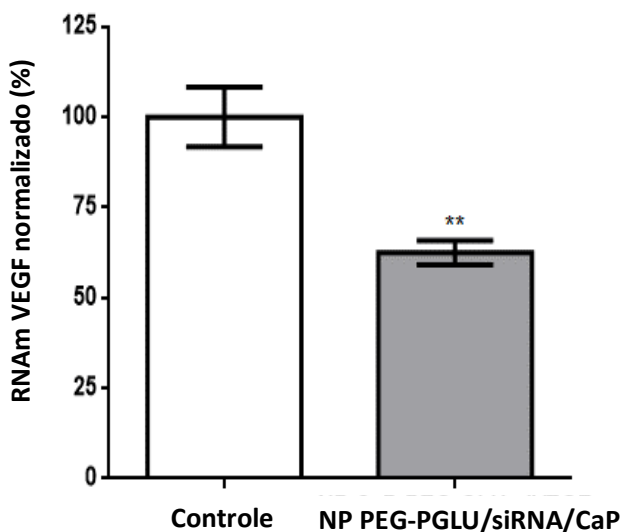


Tempo de monitoramento de 14 dias. Círculo fechado e aberto indicam grupos tratados com salina e NP PEG-PGLU/siRNA/CaP, respectivamente. NP PEG-PGLU/siRNA/CaP: animais tratados com nanopartícula híbrida carregando siVEGF; Controle: animais tratados com salina. A massa de cada animal foi normalizada pela massa do primeiro dia. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média (EPM), $n=4$. Teste t de Student por dia de tratamento; * $p < 0,05$.

4.4.2 Expressão do gene *Vegf* *in vivo*

Para verificar se a redução do volume do tumor estava relacionada a um possível efeito de RNAi, a avaliação da expressão do gene *Vegf* foi realizada 24 horas após tratamento de um grupo de animais com as NP PEG-PGLU/siRNA/CaP. Foi possível observar redução em ~38%, na expressão do gene *Vegf* *in vivo* nos animais tratados quando comparado ao grupo controle (Figura 15). Na figura 16, estão demonstradas as curvas de eficiência dos primers utilizados.

Figura 15 - Expressão do gene *Vegf* em tumor de mama após administração de NP PEG-PGLU/siRNA/CaP.

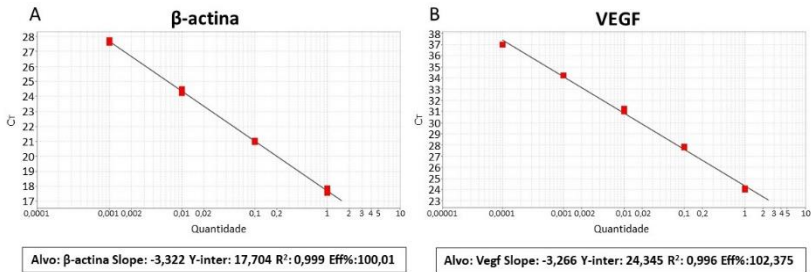


Medidas nos tumores removidos dos animais. A análise quantitativa do silenciamento gênico foi realizada por qPCR e β -actina foi usada como o gene house-keeper. NP PEG-PGLU/siRNA/CaP: animais tratados com nanopartícula híbrida carregando siVEGF; Controle: animais tratados com salina. Os resultados são expressos como média e erro padrão da média (EPM); Teste t de Student, (n=6), **p < 0,01.

Este resultado de silenciamento gênico confirma o efeito antitumoral obtido *in vivo* com a injeção das nanopartículas carregando siRNA para o gene *Vegf* e demonstra a capacidade do carreador em entregar o siRNA e alterar o crescimento de novos vasos para nutrir o tumor a partir do efeito de RNA de interferência. Os resultados obtidos nos testes *in vivo* vão ao encontro dos testes *in vitro* que mostraram a habilidade deste sistema em entregar siRNA para as células tumorais e promover o silenciamento gênico (SOUZA, 2016). O silenciamento está atrelado a diversos fatores que influenciam na efetividade do processo, como barreiras biológicas, tempo de meia vida da proteína e o efeito transitório que é exercido por RNAi. O efeito biológico (antitumoral) tem sido observado inclusive em casos em que não ocorre o silenciamento total dos genes. Pittella et al. (2012), em um estudo *in vivo* com modelo de tumor de pâncreas em camundongos imunodeprimidos, verificou

silenciamento cumulativo do gene VEGF em aproximadamente 68%, após 24 h da última injeção, bem como atividade antitumoral. Kanazawa et al. (2012) observaram redução de aproximadamente 40% na secreção de VEGF no tumor após 24 horas da última injeção de 25 μ g de siRNA para VEGF em nanomicelas. Este efeito parcial de silenciamento é explicado pela natureza do efeito de RNA de interferência, uma vez que a síntese do RNAm não é afetada.

Figura 16 - Curva de eficiência dos primers.

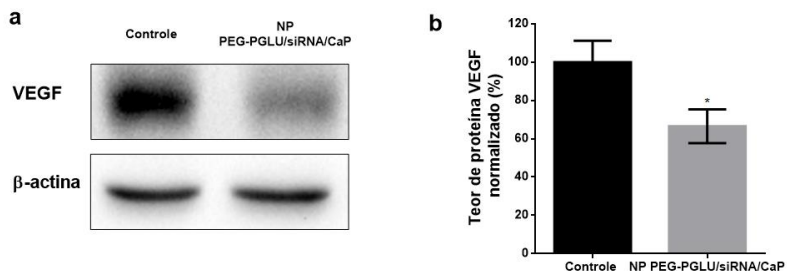


Curvas de eficiência dos iniciadores em A para o primer β -actina e B para o primer *Vegf*. Eixo X: Quantidade de cDNA. Eixo Y: Cts (cycles threshold). Eff %: eficiência do primer.

4.4.3 Determinação da quantidade de proteína VEGF

A detecção da proteína VEGF foi realizada pela técnica de western blotting, tendo como amostras os tumores obtidos após 24h da administração das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP (Figura 17). A expressão de VEGF foi significativamente menor no grupo tratado em comparação ao grupo controle. Esses resultados são consistentes com o resultado de qPCR que demonstrou diminuição em nível transcricional. Neste sentido, fica evidenciado que as nanopartículas foram capazes de entregar o siRNA para interferência na expressão de VEGF e que a diminuição no conteúdo de VEGF foi importante para a diminuição no crescimento do tumor em 4T1.

Figura 17 - Análise por Western blot da proteína VEGF nos tumores tratados com NP PEG-PGLU/siRNA/CaP.



Análise nos tumores removidos dos animais. A: bandas representativas das proteínas VEGF e β -actina. B: Quantificação normalizada da proteína VEGF. A análise quantitativa da proteína VEGF foi analisada por western blot e a β -actina foi usada como normalizador. NP PEG-PGLU/siRNA/CaP: animais tratados com nanopartícula híbrida carregando siVEGF; Controle: animais tratados com salina. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM); Teste t de Student, (n = 6), * p < 0,05.

4.4.4 Avaliação histopatológica

Após a injeção endovenosa das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP, os órgãos como o pulmão, rim, coração, fígado e baço, e os tumores foram removidos dos animais e analisados sob o ponto de vista histopatológico, a fim de verificar alterações microscópicas referentes ao tratamento (Figura 18).

No pulmão, foi observada infiltração de células neoplásicas epiteliais em três dos quatro animais do grupo controle (3/4) e do grupo tratado (3/4), que pode ser explicada em função das metástases geradas, considerando o modelo tumoral utilizado. O modelo de tumor 4T1 é capaz de causar metástases espontâneas a partir do tumor primário na glândula mamária para múltiplos locais distantes, incluindo linfonodos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e osso (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

Ainda no pulmão, também foi encontrado infiltrado polimorfonuclear em dois animais do grupo controle (2/4) e em um animal do grupo tratado (1/4), caracterizando a presença de inflamação. Ainda, um animal do grupo tratado apresentou infiltrado inflamatório mononuclear moderado (1/4). Já no fígado, os infiltrados neoplásicos foram observados em todas as amostras e infiltrado polimorfonuclear em todas as amostras controle.

No baço, um animal do grupo controle (1/4) teve a presença de células epiteliais neoplásicas com infiltrado polimorfonuclear, o que não foi observado no grupo tratado. Ainda no baço, observou-se a presença de hematopoese extra medular em 2 animais do grupo controle (2/4) e em 3 do grupo tratado (3/4).

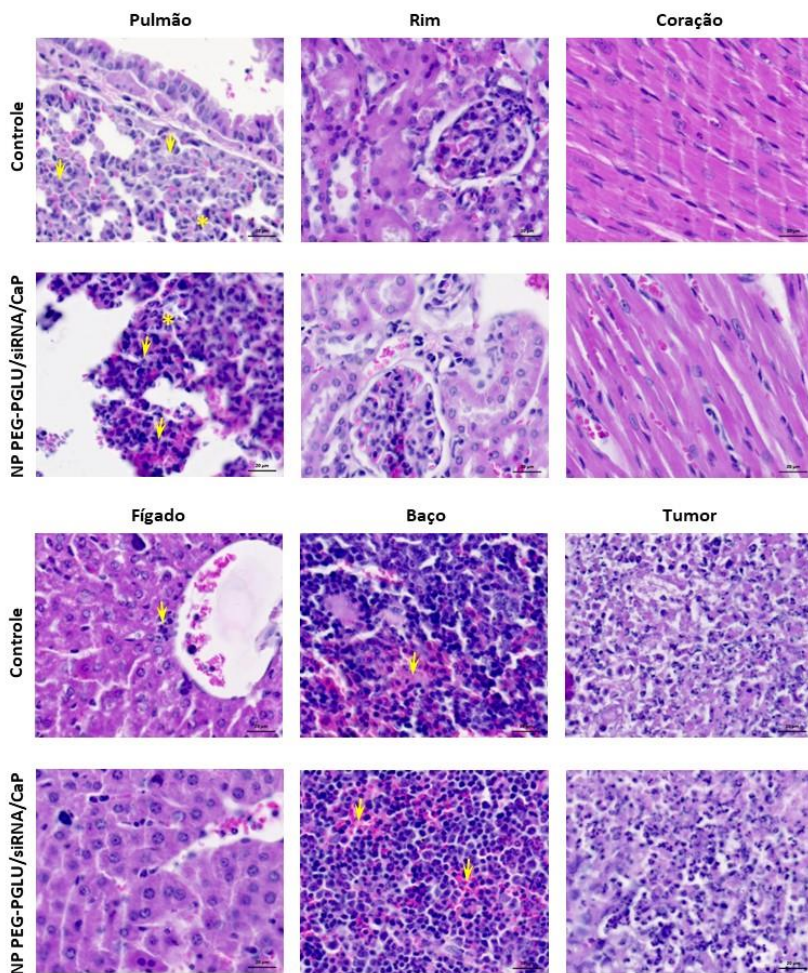
No coração, um animal do grupo controle apresentou infiltrado polimorfonuclear leve (1/4). Nenhuma alteração foi observada nos tecidos cardíacos dos animais tratados.

Nos rins, nenhuma alteração foi observada no grupo controle, sendo que no grupo tratado um animal apresentou tumefação das células renais moderada e hemorragia leve (1/4) e outro animal apresentou infiltrado mononuclear subcapsular leve (1/4).

No tumor, três animais do grupo controle apresentaram células epiteliais neoplásicas com atividade mitótica moderada, delimitada, não encapsulada (3/4), e essa alteração foi observada em dois animais do grupo tratado (2/4). A maioria das alterações encontradas provavelmente está relacionada à presença do tumor e metástases.

Portanto, não foi identificada uma possível toxicidade causada pelo tratamento com NP PEG-PGLU/siRNA/CaP. Como já mencionado, CaP é um mineral comum encontrado nos ossos, considerado biocompatível. O crescimento descontrolado de cristais de CaP é evitado pela complexação com PEG-poliânion e siRNA (KAKIZAWA et al., 2006). Estudos de toxicidade com nanopartículas de fosfato de cálcio e polímero vêm mostrando ausência de toxicidade aguda após administração endovenosa (PITTELLA et al., 2012; MELLO et al., 2018).

Figura 18 - Imagens representativas das análises histopatológicas dos órgãos e do tumor após tratamento com as nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP.



Imagens obtidas por microscopia de luz, coloração por hematoxilina-eosina. Pulmão: infiltrado de células epiteliais neoplásicas (seta) e infiltrado polimorfonuclear (asterisco). Fígado controle: infiltrado polimorfonuclear (seta). Baço: hematopoiese extramedular (seta). n=4. Escala = 20µm.

4.4.5 Biodistribuição das nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP.

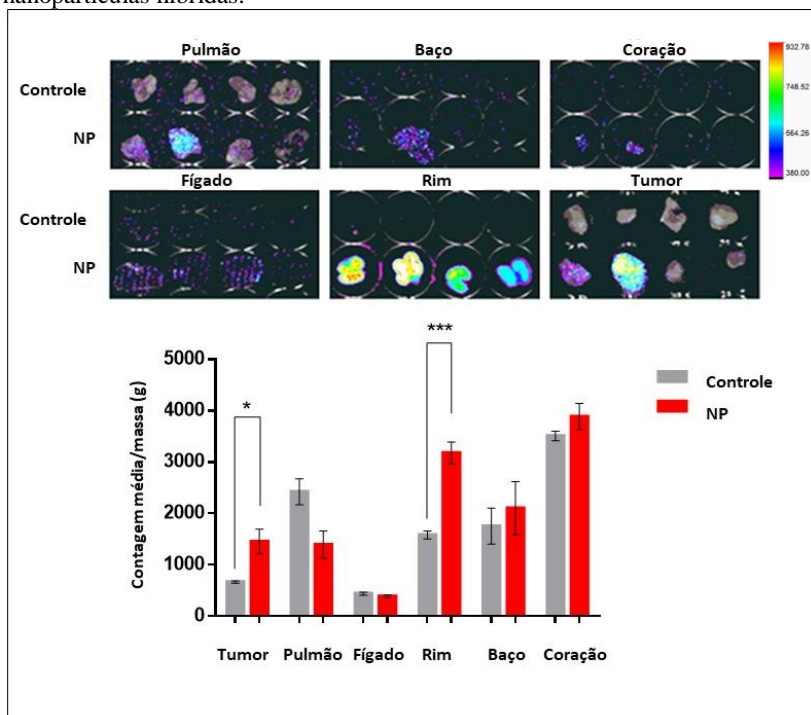
O monitoramento da fluorescência nos órgãos (fígado, baço, pulmão, coração, rim) e no tumor foi realizado após 3h da administração das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP, no entanto, contendo siRNA marcado com cianina 5 (Figura 19). A fluorescência total foi normalizada pela massa de cada órgão em gramas.

Foi verificado presença de intensidades de fluorescência significativas nos tumores e nos rins. A alta intensidade detectada nos rins ocorreu, pois, uma grande parte de siRNA é excretado pelo glomérulo, seguido de reabsorção pelo túbulo proximal. Adicionalmente, já foi observado que a acumulação de siRNA livre no rim é 40 vezes maior do que em qualquer outro órgão, após 1 hora da administração (WATER, 2006). Estudos têm relatado maior captação de siRNA pelo rim, pois este órgão desempenha um papel chave na eliminação do ácido nucleico (HOWARD, 2013). Além disso, geralmente as nanopartículas tendem a acumular-se no fígado e baço rapidamente, o que não foi observado aqui (HOSHYAR et al., 2016).

A alta intensidade de fluorescência encontrada nos tumores tratados com as nanopartículas híbridas contendo siRNA marcado com cianina 5 demonstra que as nanopartículas entregaram o siRNA de maneira eficiente no tumor, que permaneceu retido nessa região.

Yi et al. (2016) também encontraram acumulação no tumor em 2, 4 e 6 horas após administração de nanopartículas contendo siRNA marcado, em camundongos com modelo de tumor subcutâneo com células Hela, no entanto, tratava-se de nanopartículas de ouro com blocos de copolímero.

Figura 19 - Biodistribuição de siRNA marcado com cy-5 incorporado nas nanopartículas híbridas.



Resultados são expressos como média \pm EPM. NP: nanopartícula híbrida NP PEG-PGLU/siRNA/CaP carregando siRNA marcado com cianina 5. Controle: salina. Teste t de Student. (* $p < 0,05$) e (***) $p < 0,001$).

A acumulação majoritária no tumor, depois do rim, deve-se provavelmente ao efeito EPR no câncer e pela capacidade das nanopartículas de escapar da degradação na circulação sanguínea por não serem reconhecidas pelo sistema imune. Os tumores sólidos apresentam sistema vascular defeituoso, drenagem linfática insuficiente e redução da captação de líquido intersticial. Com estas características, juntamente com o aumento do tempo de circulação sanguínea devido a presença do polímero, as nanopartículas acumulam-se nos tumores (QUADER; KATAOKA, 2017).

4.4.6 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Nas tabelas 2 e 3 encontram-se os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, respectivamente, dos animais tratados com as NP PEG-PGLU/siRNA/CaP contendo siRNA para VEGF, em comparação ao controle, após 24 horas. É possível verificar que, referente aos parâmetros hematológicos, houve um pequeno aumento nos valores de VCM (~3,1%) e CHCM (~5,4%) nos animais que receberam o tratamento. De acordo com valores de referência para camundongos Balb/c fêmeas, os valores de VCM podem variar de 50,8 a 64,1 fl, já o CHCM de 23,9 a 33,1% (CHARLES RIVER LABORATORIES, 2019; BARBOSA et al., 2017). Portanto, como a diferença encontrada é muito pequena entre o grupo controle e o tratado, e muito próximos dos valores de referência, aparentemente não reflete em alterações clínicas causadas pelo tratamento (BARBOSA et al., 2017). Importante destacar que não foram verificadas alterações em hemácias nos animais que receberam o tratamento, quando comparado ao grupo controle.

Verificou-se uma diminuição do número de monócitos no grupo que recebeu o tratamento. Os monócitos do sangue periférico são precursores de macrófagos teciduais, portanto, a concentração reduzida pode indicar aumento no recrutamento de fagócitos nos órgãos imunológicos periféricos (MAŁACZEWSKA, 2014). Um aumento no número de plaquetas foi observado, mas o valor encontra-se dentro dos limites de referência encontrados na literatura (CHARLES RIVER LABORATORIES, 2019; BARBOSA et al., 2017). No entanto, é necessário verificar se as alterações observadas mantêm-se com o passar do tempo, após sucessivas administrações das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP.

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos dos animais tratados com as nanopartículas híbridas NP CaP-PEG-GLU-siVEGF

| Parâmetros | Controle | NP CaP-PEG-GLU-siVEGF |
|---|---------------------|--------------------------|
| Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$) | 5,99 \pm 0,14 | 5,67 \pm 0,18 |
| Hematócrito (%) | 37,5 \pm 0,98 | 36,5 \pm 0,93 |
| Hemoglobina (g/dL) | 12,16 \pm 0,31 | 12,48 \pm 0,32 |
| VCM (fL) | 62,57 \pm 0,31 | 64,51 \pm 0,60* |
| CHCM (%) | 32,45 \pm 0,28 | 34,19 \pm 0,25*** |
| Leucócitos ($/\mu\text{L}$) | 23210 \pm 7125,78 | 11270 \pm 1682,40 |
| Basófilo (%) | - | - |
| Eosinófilo (%) | 0,6 \pm 0,27 | - |
| Neutrófilo (%) | - | - |
| Mielócito (%) | - | - |
| Metamielócito (%) | - | - |
| Bastão (%) | 0,6 \pm 0,16 | 0,1 \pm 0,10 |
| Segmentado (%) | 72,7 \pm 3,56 | 66,6 \pm 2,69 |
| Linfócito (%) | 22,6 \pm 3,51 | 31,6 \pm 2,72 |
| Monócito (%) | 3,5 \pm 0,45 | 1,7 \pm 0,42** |
| Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) | 503 \pm 50,87 | 680 \pm 44,59* |

Resultados expressos como média \pm EPM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos dos animais tratados com as nanopartículas híbridas NP CaP-PEG-GLU-siVEGF

| Parâmetros | Controle | NP CaP-PEG-GLU-siVEGF |
|----------------------------|----------------|--------------------------|
| Ureia (mg/dL) | 52,7 ± 1,87 | 67,7 ± 3,98** |
| Creatinina (mg/dL) | 0,44 ± 0,02 | 0,56 ± 0,03** |
| AST (UI/l) | 374,1 ± 132,39 | 302,7 ± 40,96 |
| ALT (UI/l) | 49,3 ± 17,30 | 49,1 ± 8,24 |
| Proteína Plasmática (g/dL) | 5,24 ± 0,11 | 5,3 ± 0,10 |

Resultados expressos como média ± EPM. **p < 0.01.

Já para os parâmetros bioquímicos, observou-se aumento na concentração de ureia e creatinina nos animais que receberam o tratamento, quando comparado com o grupo controle. A concentração sanguínea de ureia e creatinina é um importante indicador da função renal (CHOUDHURY; AHMED, 2006). O aumento da função renal pode estar relacionado à rota de excreção do siRNA, como discutido anteriormente. Como verificado no ensaio de biodistribuição, houve acúmulo de siRNA nos rins. Para estudos futuros, é importante o monitoramento, uma vez que tais dados podem indicar uma possível evolução para toxicidade renal ou uma toxicidade já instalada. É também necessário verificar a possível reversão da toxicidade, uma vez que, após 14 dias de tratamento, não houve toxicidade significativa observada no resultado histopatológico para os rins. Já em relação ao fígado, a concentração de ALT e AST não se apresentou alterada em função do tratamento, sugerindo ausência de toxicidade hepática aguda relacionada a administração das NP PEG-PGLU/siRNA/CaP. Este resultado é importante, uma vez que o fígado é o local de metabolismo de primeira passagem, sendo comumente susceptível à toxicidade induzida por nanopartículas (YILDIRIMER et al., 2011).

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados mostraram que a formulação purificada foi desenvolvida com sucesso e os testes realizados *in vivo* evidenciaram que, quando comparado com o controle, as nanopartículas híbridas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP reduziram o crescimento tumoral durante o tratamento, sem alteração da massa corporal, acompanhado do silenciamento gênico. As NP PEG-PGLU/siRNA/CaP também foram capazes de entregar o siRNA de maneira significativa no tumor, evidenciado quando da utilização do ácido nucleico marcado com cianina 5. Não foi verificada toxicidade aguda relacionada ao tratamento com as nanopartículas NP PEG-PGLU/siRNA/CaP, evidenciado pelos resultados obtidos nas avaliações histopatológica e antropométrica. Entretanto, alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos precisam ser verificadas em estudos adicionais, após administrações sucessivas das nanopartículas em um longo período de tempo.

Assim, como a aplicação do efeito de RNAi na clínica necessita de proteção ou estabilização da molécula efetora (siRNA), torna-se evidente o estímulo para o desenvolvimento de sistemas baseados em nanotecnologia. Desta forma, a terapia por RNAi aliada a nanotecnologia representa atualmente o ápice da pesquisa nesse tema e tem sido predita como uma alternativa inovadora para o tratamento do câncer.

Os resultados obtidos até o momento demonstram que o sistema desenvolvido pode ser um candidato promissor para a entrega de siRNA para o câncer de mama triplo negativo. No entanto, estudos adicionais estão planejados, incluindo a co-entrega de siRNAs buscando uma sinergia entre importantes alvos relacionados a doença e diminuição de toxicidade.

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para futuros trabalhos, espera-se:

- a) Avaliar, por imuno-histoquímica, as células endoteliais vasculares e VEGF no tumor;
- b) Verificar a farmacocinética do siRNA, em diferentes tempos de administração de siRNA marcado com cianina 5, com a quantificação sanguínea de cálcio, fósforo e verificação do tempo de meia vida;
- c) Avaliar a toxicidade das nanopartículas utilizadas em longo prazo;
- d) Co-entregar diferentes siRNAs em um único sistema para verificar o efeito anticâncer sinérgico *in vivo*.

REFERÊNCIAS

A STEAD, Lesley et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 11, n. 2, 25 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2242>.

ABDELWAHED, W et al. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 58, n. 15, p.1688-1713, 30 dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>.

ABOU-JAWDE, R. et al. An overview of targeted treatments in cancer. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 8, p. 2121-2133, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0149-2918\(03\)80209-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0149-2918(03)80209-6).

ACHARYA, Rituparna et al. SiRNA-nanoparticle conjugate in gene silencing: A future cure to deadly diseases?. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 76, p.1378-1400, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.009>.

ADAMS, David et al. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 379, n. 1, p.11-21, 5 jul. 2018. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1716153>.

AGGARWAL, Parag et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 61, n. 6, p.428-437, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer**. Disponível em:< <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

BALUK, Peter; HASHIZUME, Hiroya; MCDONALD, Donald M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. **Current Opinion In Genetics & Development**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.102-111, fev. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.005>.

BANDYOPADHYAY, Sudeshna; BLUTH, Martin H.; ALI-FEHMI, Rouba. Breast Carcinoma. **Clinics In Laboratory Medicine**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.401-420, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2018.02.006>.

BARBOSA, Brenna de Sousa et al. Haematological and Biochemical Profile of Balb-c Mice. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v. 45, n. 1, 8 2017. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://dx.doi.org/10.22456/1679-9216.80473>.

BÉCOURT, Stéphanie; ESPIÉ, Marc. Hormonal Treatment of Breast Cancer. **Encyclopedia Of Endocrine Diseases**, [s.l.], p.646-655, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.64351-9>.

BENNINK, Herjan J.t. Coelingh et al. The use of high-dose estrogens for the treatment of breast cancer. **Maturitas**, [s.l.], v. 95, p.11-23, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.10.010>.

BLOK, Erik J. et al. Treatment decisions and the impact of adverse events before and during extended endocrine therapy in postmenopausal early breast cancer. **European Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 95, p.59-67, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2018.03.014>.

BRUFISKY, Adam M. et al. RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 29, n. 32, p.4286-4293, 10 nov. 2011. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.34.1255>.

BURNETT, John c.; ROSSI, John j.. RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.60-71, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.12.008>.

CARDOSO, F et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals Of Oncology**, [s.l.], p.1-1, 4 jun. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz173>.

CAREY, Lisa et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.683-692, 28 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.154>.

CARMELIET, Peter. VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. **Oncology**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.4-10, 2005. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000088478>.

CAVALLARO, Gennara et al. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery: Production and applications. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 525, n. 2, p.313-333, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.008>.

CHARLES RIVER LABORATORIES. **BALB/c Nude Mouse Hematology: BALB/c Nude Mouse Biochemistry**. Disponível em: <<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/BALBcNudeMouseClinicalPathologyData.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

CHATTERJEE, Kanu et al. Doxorubicin Cardiomyopathy. **Cardiology**, [s.l.], v. 115, n. 2, p.155-162, 2010. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000265166>.

CHOUDHURY, Devasmita; AHMED, Ziauddin. Drug-associated renal dysfunction and injury. **Nature Clinical Practice Nephrology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p.80-91, fev. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncpneph0076>.

CHOUNG, Sorim et al. Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 342, n. 3, p.919-927, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.049>.

CIBULA, D. et al. Hormonal contraception and risk of cancer. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.631-650, 12 jun. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmq022>.

ClinicalTrials.gov. **Dose Escalation Trial to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous ALN-VSP02 In Patients With Advanced Solid Tumors With Liver Involvement.** 2011. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00882180>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

ClinicalTrials.gov. **Multi-center, Open Label, Extension Study of ALN-VSP02 in Cancer Patients Who Have Responded to ALN-VSP02 Treatment.** 2012. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01158079>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

ClinicalTrials.gov. **Open Label Study for the Evaluation of Tolerability of Five Dose Levels of Cand5.** 2008. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00722384>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

DAVIDSON, Beverly L.; MCCRAY, Paul B.. Current prospects for RNA interference-based therapies. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.329-340, 18 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2968>.

DOBROVOLSKAIA, Marina A. et al. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.487-495, 30 maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/mp800032f>.

DOMINSKA, M.; DYKXHOORN, D. M.. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape. **Journal Of Cell Science**, [s.l.], v. 123, n. 8, p.1183-1189, 31 mar. 2010. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.066399>.

DROOGER, Jan C. et al. Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: A critical review of the literature. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.187-196, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.12.002>.

ELBASHIR, Sayda M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, [s.l.], v. 411, n. 6836, p.494-498, 24 maio 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35078107>.

ELSABAHY, M. et al. Synthesis and Enzymatic Stability of PEGylated Oligonucleotide Duplexes and their Self-assemblies with Polyamidoamine Dendrimers. **Soft Matter**, v. 4, n. 2, p. 294-302, 2008. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b714221h>.

EPPLE, Matthias. Review of potential health risks associated with nanoscopic calcium phosphate. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], v. 77, p.1-14, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.036>.

EUHUS, David M. et al. Tumor measurement in the nude mouse. **Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 31, n. 4, p.229-234, abr. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jso.2930310402>.

FENG, Yixiao et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.77-106, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

FERRARA, Napoleone. Vascular Endothelial Growth Factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.789-791, jun. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.108.179663>.

FERRARA, Napoleone; GERBER, Hans-peter; LECOUTER, Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.669-676, jun. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-669>.

FIRE, Andrew et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [s.l.], v. 391, n. 6669, p.806-811, fev. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>.

FOEKENS, John A. et al. High Tumor Levels of Vascular Endothelial Growth Factor Predict Poor Response to Systemic Therapy in Advanced Breast Cancer. **Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 61, p.5407-5414, jul. 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Org.). **Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology**, (2014) Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/88423/download>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

GABHANN, Feilim Mac; POPEL, Aleksander S.. Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. **Microcirculation**, [s.l.], v. 15, n. 8, p.715-738, jan. 2008. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1080/10739680802095964>.

GAIL, M. H. et al. Projecting Individualized Probabilities of Developing Breast Cancer for White Females Who Are Being Examined Annually. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 81, n. 24, p.1879-1886, 20 dez. 1989. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/jnci/81.24.1879>.

GIULIANO, Armando E.. Axillary Dissection vs No Axillary Dissection in Women With Invasive Breast Cancer and Sentinel Node Metastasis. **Jama**, [s.l.], v. 305, n. 6, p.569, 9 fev. 2011. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2011.90>.

GOEL, Hira Lal; MERCURIO, Arthur M.. VEGF targets the tumour cell. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 12, p.871-882, 22 nov. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3627>.

GRAF, R. et al. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 64, p.316-326, dez. 2012. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.008>.

GREISH, Khaled. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.25-37, 2010. Humana Press.
http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_3.

HABRAKEN, Wouter et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?. **Materials Today**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.69-87, mar. 2016. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.

HANAHAN, Douglas; FOLKMAN, Judah. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. **Cell**, [s.l.], v. 86, n. 3, p.353-364, ago. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80108-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7).

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a.. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANNON, Gregory J.; ROSSI, John J.. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. **Nature**, [s.l.], v. 431, n. 7006, p.371-378, set. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02870>.

HASHIZUME, Hiroya et al. Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 156, n. 4, p.1363-1380, abr. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65006-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65006-7).

HASSAN. Chemotherapy for breast cancer (Review). **Oncology Reports**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.1121-1131, 27 set. 2010. Spandidos Publications. http://dx.doi.org/10.3892/or_00000963.

HIGGINS, Michaela J.; BASELGA, José. Targeted therapies for breast cancer. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 121, n. 10, p.3797-3803, 2011. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci57152>.

HOEBEN, A.. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. **Pharmacological Reviews**, [s.l.], v. 56, n. 4, p.549-580, 1 dez. 2004. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/pr.56.4.3>.

HOLMES, David Ir; ZACHARY, Ian. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. **Genome Biology**, [s.l.], v. 6, n. 2, 209, 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-209>.

HORAK, E.r. et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. **The Lancet**, [s.l.], v. 340, n. 8828, p.1120-1124, nov. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)93150-1](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(92)93150-1).

HOSHYAR, Nazanin et al. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.673-692, mar. 2016. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/nmm.16.5>.

HOWARD, Kenneth A. (Ed.). RNA Interference from Biology to Therapeutics. **Advances In Delivery Science And Technology**, [s.l.], p.1-336, 2013. Springer US. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4744-3>.

HURWITZ, Herbert et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 350, n. 23, p.2335-2342, 3 jun. 2004. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa032691>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; organização Mario Jorge Sobreira da Silva.– 3. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2017. 108 p.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. 2019a. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Contra o triplo-negativo**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2019b. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/es/node/1674> >. Acesso em: 10 jun. 2019.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.

Tratamento para o câncer de mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2019c. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/en/node/1211>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

JAIN, Shweta; PATHAK, Kamla; VAIDYA, Ankur. Molecular therapy using siRNA: Recent trends and advances of multi target inhibition of cancer growth. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 116, p.880-892, set. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.077>.

JEEVANANDAM, Jaison et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal Of Nanotechnology**, [s.l.], v. 9, p.1050-1074, 3 abr. 2018. Beilstein Institut. <http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.9.98>.

KAAKS, R et al. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. **Endocrine-related Cancer**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.1071-1082, dez. 2005. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1677/erc.1.01038>.

KAKIZAWA, Yoshinori et al. Organic–inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anioner. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.368-370, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.004>.

KAKIZAWA, Yoshinori et al. Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid). **Advanced Materials**, v.16, n. 8, p.699-702, abr. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200305782>.

KAKIZAWA, Yoshinori; KATAOKA, Kazunori. Block Copolymer Self-Assembly into Monodisperse Nanoparticles with Hybrid Core of Antisense DNA and Calcium Phosphate. **Langmuir**, [s.l.], v. 18, n. 12, p.4539-4543, jun. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la011736s>.

KALYANE, Dnyaneshwar et al. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 98, p.1252-1276, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.066>.

KANAZAWA, Takanori et al. Suppression of tumor growth by systemic delivery of anti-VEGF siRNA with cell-penetrating peptide-modified MPEG–PCL nanomicelles. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.470-477, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.04.021>.

KERLIKOWSKA, K.. Epidemiology of Ductal Carcinoma In Situ. **Jnci Monographs**, [s.l.], v. 2010, n. 41, p.139-141, 1 out. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jncimonographs/lgq027>.

KHVOROVA, A., REYNOLDS, A., JAYASENA, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell.**, v. 115, n. 2, p. 209-216, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00801-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00801-8).

KIM, Daniel H.; ROSSI, John J.. Strategies for silencing human disease using RNA interference. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.173-184, mar. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2006>.

KIM, Hyun Jin et al. Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 104, p.61-77, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.011>.

KIM, Sun Hwa et al. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 129, n. 2, p.107-116, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.03.008>.

KNOP, Katrin et al. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 49, n. 36, p.6288-6308, 20 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200902672>.

KULKARNI, Sneha A.; FENG, Si-shen. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 30, n. 10, p.2512-2522, 12 jan. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-012-0958-3>.

LANGE, Christian et al. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.439-454, 1 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.88>.

LEE, Alice; DJAMGOZ, Mustafa B.a.. Triple negative breast cancer: Emerging therapeutic modalities and novel combination therapies. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 62, p.110-122, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.003>.

LEE, J; LEE, H; ANDRADE, J. Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. **Progress In Polymer Science**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.1043-1079, 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700\(95\)00011-4](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700(95)00011-4).

LEE, Richard J. et al. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. **International Journal Of Surgical Oncology**, [s.l.], v. 2012, p.1-12, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/123549>.

LEE, So Jin et al. Delivery strategies and potential targets for siRNA in major cancer types. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 104, p.2-15, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.010>.

LI, Wen et al. Chemotherapy-induced prospective memory impairment in breast cancer patients with different hormone receptor expression. **Medicine**, [s.l.], v. 96, n. 13, p.6514-111, mar. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/md.0000000000006514>.

LIN, Zhexuan; ZHANG, Quanwei; LUO, Wenhong. Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 793, p.76-81, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.10.039>.

LINDERHOLM, B. K. et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. **Annals Of Oncology**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.1639-1646, 23 jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdp062>.

LOC, Welley S. et al. Effective encapsulation and biological activity of phosphorylated chemotherapeutics in calcium phosphosilicate nanoparticles for the treatment of pancreatic cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 7, p.2313-2324, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.017>.

LOIBL, Sibylle; GIANNI, Luca. HER2-positive breast cancer. **The Lancet**, [s.l.], v. 389, n. 10087, p.2415-2429, jun. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32417-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32417-5).

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

LU, Jingyi; YU, Huijun; CHEN, Chuanzhong. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.2015-2033, 2018. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c7ra11278e>.

LU, Patrick Y.; XIE, Frank Y.; WOODLE, Martin C.. Modulation of angiogenesis with siRNA inhibitors for novel therapeutics. **Trends In Molecular Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.104-113, mar. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2005.01.005>.

MA, da. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. **Nanoscale**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.6415-6425, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c4nr00018h>.

MAEDA, H. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 5, p.797-802, maio 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bc100070g>.

MAŁACZEWSKA, J.. Effect of 28-day oral administration of silver nanocolloid on the peripheral blood leukocytes in mice. **Polish Journal Of Veterinary Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.263-273, 1 jun. 2014. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/pjvs-2014-0037>.

MALUF, Horacio; KOERNER, Frederick. Lobular Carcinoma in Situ and Infiltrating Ductal Carcinoma: Frequent Presence of DCIS as a Precursor Lesion. **International Journal Of Surgical Pathology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.127-131, abr. 2001. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/106689690100900206>.

MARTINEZ, Javier et al. Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. **Cell**, [s.l.], v. 110, n. 5, p.563-574, set. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00908-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00908-x).

MASKOS, M.; STAUBER, R.h.. 3.21 Characterization of Nanoparticles in Biological Environments ☆. **Comprehensive Biomaterials Ii**, [s.l.], p.467-481, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.09823-4>.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer-chemotherapy: mechanisms of tumorigenic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387-6392, dez. 1986.

MEDEIROS, G.c.; THULER, L.c.s.; BERGMANN, A.. Delay in breast cancer diagnosis: a Brazilian cohort study. **Public Health**, [s.l.], v. 167, p.88-95, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.puhe.2018.10.012>.

MEINARDI, M T. Evaluation of long term cardiotoxicity after epirubicin containing adjuvant chemotherapy and locoregional radiotherapy for breast cancer using various detection techniques. **Heart**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.81-82, 1 jul. 2002. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/heart.88.1.81>.

MEISTER, Gunter; TUSCHL, Thomas. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, [s.l.], v. 431, n. 7006, p.343-349, set. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02873>.

MELLO, Leônidas J. de et al. In vivo antiapoptotic gene silencing: hybrid nanoparticles as delivery system. **Ifac-papersonline**, [s.l.], v. 51, n. 27, p.10-15, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifacol.2018.11.666>.

MELLO, Leônidas João de et al. Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 17, p.1-13, 4 abr. 2017. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1361-6528/aa6283>.

METCALFE, K.a. et al. The risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers without a first-degree relative with breast cancer. **Clinical Genetics**, [s.l.], v. 93, n. 5, p.1063-1068, 25 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/cge.13191>.

MILES, David W. et al. Phase III Study of Bevacizumab Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel for the First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 28, n. 20, p.3239-3247, 10 jul. 2010. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.21.6457>.

MILLER, Kathy D. et al. Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 357, n. 26, p.2666-2676, 27 dez. 2007. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa072113>.

MILLER, Kathy D. et al. Randomized Phase III Trial of Capecitabine Compared With Bevacizumab Plus Capecitabine in Patients With Previously Treated Metastatic Breast Cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.792-799, fev. 2005. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.05.098>.

MISRA, Ranjita; ACHARYA, Sarbari; SAHOO, Sanjeeb K.. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 15, n. 19-20, p.842-850, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.006>.

MITRA, Ashim K. et al. Novel delivery approaches for cancer therapeutics. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 219, p.248-268, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.067>.

MORAN, Meena S. et al. Society of Surgical Oncology–American Society for Radiation Oncology Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery With Whole-Breast Irradiation in Stages I and II Invasive Breast Cancer. **International Journal Of Radiation Oncology*biology*physics**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.553-564, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2013.11.012>.

NAGY, J.A., et al. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? **British Journal of Cancer**, v. 100, n. 6, p. 865-869, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604929>.

ONITILLO, A. A. et al. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. **Clinical Medicine & Research**, [s.l.], v. 7, n. 1-2, p.4-13, 1 jun. 2009. Marshfield Clinic Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.3121/cmr.2009.825>.

OWENSIII, D; PEPPAS, N. Oposonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 307, n. 1, p.93-102, 3 jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.

OZCAN, Gulnihal et al. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 87, p.108-119, jun. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.007>.

PECOT, Chad V. et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.59-67, 16 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2966>.

PERROT-APPLANAT, Martine; BENEDETTO, Melanie di. Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells. **Cell Adhesion & Migration**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.547-553, 17 nov. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cam.23332>.

PHARMACEUTICALS, Alnylam. **HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION**. 2018. Disponível em: <<http://www.alnylam.com/wp-content/uploads/2018/08/ONPATTRO-Prescribing-Information.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

PILLAI, Gopalakrishna. Nanotechnology Toward Treating Cancer. **Applications Of Targeted Nano Drugs And Delivery Systems**, [s.l.], p.221-256, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814029-1.00009-0>.

PITTELLA, F. et al. Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 161, n. 3, p. 868-874, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.005>.

PITTELLA, Frederico 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**, [s.l.], v. 32, n. 11, p.3106-3114, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.12.057>.

PUGH, Christopher W; RATCLIFFE, Peter J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 6, p.677-684, jun. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0603-677>.

PULASKI, Beth A.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols In Immunology**, [s.l.], maio 2001. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>.

QUADER, Sabina; KATAOKA, Kazunori. Nanomaterial-Enabled Cancer Therapy. **Molecular Therapy**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1501-1513, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.026>.

REYNOLDS, Angela et al. Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.326-330, 1 fev. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt936>.

RIBATTI, Domenico et al. Angiogenesis and Antiangiogenesis in Triple-Negative Breast cancer. **Translational Oncology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.453-457, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2016.07.002>.

ROBERT, Nicholas J. et al. RIBBON-1: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab for First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative, Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer (2011a). **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 29, n. 10, p.1252-1260, abr. 2011. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2010.28.0982>.

ROBERT, Nicholas J. et al. Sunitinib Plus Paclitaxel Versus Bevacizumab Plus Paclitaxel for First-Line Treatment of Patients With Advanced Breast Cancer: A Phase III, Randomized, Open-Label Trial (2011b). **Clinical Breast Cancer**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.82-92, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2011.03.005>.

ROSER, Marianne; FISCHER, Dagmar; KISSEL, Thomas. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres. II: effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.255-263, nov. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411\(98\)00038-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411(98)00038-1).

SCHMIDT, C.. How Do You Tell Whether a Breast Cancer is HER2 Positive? Ongoing Studies Keep Debate in High Gear. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 103, n. 2, p.87-89, 29 dez. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djq557>.

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, out. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00759-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00759-1).

SIBBERING, Mark; COURTNEY, Carol-ann. Management of breast cancer: basic principles. **Surgery (oxford)**, [s.l.], v. 37, n. 3, p.157-163, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.01.004>.

SOUZA, Gabriela Regina Rosa. **DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS PARA TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA: SILENCIAMENTO DE GENES-CHAVE NA SOBREVIVÊNCIA CELULAR EM CÂNCER DE MAMA**. 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). **World Cancer Report**: 2014. Lyon: IARC, 2014.

STOCKTON, D. et al. Retrospective study of reasons for improved survival in patients with breast cancer in East Anglia: earlier diagnosis or better treatment?. **Bmj**, [s.l.], v. 314, n. 7079, p.472-472, 15 fev. 1997. *BMJ*. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.314.7079.472>.

TABERNERO, Josep et al. First-in-Humans Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement. **Cancer Discovery**, [s.l.], v. 3, n. 4, p.406-417, 28 jan. 2013. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-12-0429>.

TAVASSOLI F.A., DEVILEE P.(Eds.): **World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. IARC Press: Lyon 2003.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006. **NobelPrize.org**. Nobel Media AB 2019. Sun. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/>, jun. 2019.

TOBIN, Lisa A. et al. Pegylated siRNA-loaded calcium phosphate nanoparticle-driven amplification of cancer cell internalization in vivo. **Biomaterials**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.2980-2990, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.046>.

TOY, Randall et al. Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. **Nanomedicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.121-134, jan. 2014. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.13.191>.

TURNER, Nicholas C et al. Advances in the treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer. **The Lancet**, [s.l.], v. 389, n. 10087, p.2403-2414, jun. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32419-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32419-9).

VICI, Patrizia et al. Triple positive breast cancer: A distinct subtype?. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.69-76, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.12.005>.

VINCENTI, Valeria et al. Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3. *Circulation*, [s.l.], v. 93, n. 8, p.1493-1495, 15 abr. 1996. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.93.8.1493>. In: TAKAHASHI, Hiroyuki; SHIBUYA, Masabumi. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, [s.l.], v. 109, n. 3, p.227-241, 1 set. 2005. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20040370>.

VOROBIOF, Daniel A.. Recent advances in the medical treatment of breast cancer. **F1000research**, [s.l.], v. 5, p.2786, 29 nov. 2016. F1000 (Faculty of 1000 Ltd). <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.9619.1>.

WANG, Tao et al. Challenges and opportunities for siRNA-based cancer treatment. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 387, p.77-83, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.03.045>.

WANG, Zhaoxia; YIN, Guimei; JIA, Rufu. Impacts of self-care education on adverse events and mental health related quality of life in breast cancer patients under chemotherapy. **Complementary Therapies In Medicine**, [s.l.], v. 43, p.165-169, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2019.01.027>.

WARD, Elizabeth M. et al. Cancer statistics: Breast cancer in situ. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.481-495, 2 out. 2015. American Cancer Society. Wiley. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21321>.

WATER, F. M. van de. Intravenously administered short interfering RNA accumulates in the kidney and selectively suppresses gene function in renal proximal tubules. **Drug Metabolism And Disposition**, [s.l.], v. 34, n. 8, p.1393-1397, 19 maio 2006. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/dmd.106.009555>.

WEDDELL, J.c.; IMOUKHUEDE, P.i.. Computational Systems Biology for the VEGF Family in Angiogenesis. **Encyclopedia Of Cardiovascular Research And Medicine**, [s.l.], p.659-676, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809657-4.99548-6>.

WEN, Hannah Y.; BROGI, Edi. Lobular Carcinoma In Situ. **Surgical Pathology Clinics**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.123-145, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.path.2017.09.009>.

WHITEHEAD, Kathryn A.; LANGER, Robert; ANDERSON, Daniel G.. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.129-138, fev. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2742>.

WHO. World Health Organization. **GUIDE TO CANCER EARLY DIAGNOSIS**. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. **Cancer**. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

WILLETT, Christopher G et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.145-147, 25 jan. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm988>.

WITTRUP, Anders; LIEBERMAN, Judy. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.543-552, 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3978>.

YANG, Y. Tony et al. The rise in bilateral mastectomies: Evidence, ethics, and physician's role. **The Breast**, [s.l.], v. 29, p.160-162, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.breast.2016.07.024>.

YI, Yu et al. Targeted systemic delivery of siRNA to cervical cancer model using cyclic RGD-installed unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 244, p.247-256, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.041>.

YILDIRIMER, Lara et al. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. **Nano Today**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.585-607, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2011.10.001>.

YUAN, B. et al. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p.w130-w134, jul. 2004. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh366>.

ZHANG, Jing; LI, Xiang; HUANG, Leaf. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 190, p.440-450, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.037>.

ZHANG, Mingzhen; KATAOKA, Kazunori. Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **Nano Today**, [s.l.], v. 4, n. 6, p.508-517, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2009.10.009>.

ZHANG, Penghui et al. Recent advances in siRNA delivery for cancer therapy using smart nanocarriers. **Drug Discovery Today**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.900-911, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.042>.

ZIRLIK, Katja; DUYSSTER, Justus. Anti-Angiogenics: Current Situation and Future Perspectives. **Oncology Research And Treatment**, [s.l.], v. 41, n. 4, p.166-171, 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000488087>.

ZUCKERMAN, J. E. et al. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 8, p.3137-3142, 6 fev. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1200718109>.

ANEXO A – Comitê de Ética Protocolo PP 00892

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 – Comitê de Ética Protocolo 013/2017



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 013/2017 – CEUA sobre "Atividade antitumoral e biodistribuição de nanopartículas contendo ativos contra tumor subcutâneo de mama em camundongo Balb/c", projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Frederico Pittella Silva com a colaboração de Jacy Gameiro, Talyanne Cardoso Caldas, Ana Cristina Moura Gualberto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 14/11/2017. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 96 camundongos isogênico Balb/c (fêmeas) de 4-6 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período 04/12/2017 a 04/12/2018.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 013/2017 – CEUA about Atividade antitumoral e biodistribuição de nanopartículas contendo ativos contra tumor subcutâneo de mama em camundongo Balb/c", under responsibility of Frederico Pittella Silva and collaboration of Jacy Gameiro, Talyanne Cardoso Caldas, Ana Cristina Moura Gualberto is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 14/11/2017. For the development of this research 96 Balb / c isogenic mice (females) from 4-6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 04/12/2017 to 04/12/2018.

Juiz de Fora, 29 de novembro de 2017



Vice-coordenadora
CEUA



Coordenadora
CEUA

ANEXO C – Artigos

a) Artigo publicado como primeiro autor, durante o doutorado, contendo assunto da tese

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

IFAC PapersOnline 51-27 (2018) 10–15

**In vivo antiapoptotic gene silencing: hybrid nanoparticles as delivery system**

Leônidas J. de Mello Junior*^a, Gabriela R.R. Souza**^a, Adny H. Silva***^a, Ana C.M. Gualberto****^a, Jacy Gameiro*****^a, Dalton Dittz Júnior*****^a, Neli B. de Miranda*****^a, Frederico Pittella*****^a, Tânia B. Creczynski-Pasa*****^a

^aDepartment of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil (leonidajmj@gmail.com)

** Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil (gabrielarregina@gmail.com)

*** Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil (adnyh@yahoo.com.br)

**** Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil (anamouragualberto@gmail.com)

***** Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil (jacy.gameiro@gmail.com)

***** Department of Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil (daltondittz@gmail.com)

***** Regional University of Blumenau (FURB), Blumenau, SC, Brazil (neli@furb.br)

***** Department of Pharmaceutical Sciences and Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil (fredpittella@gmail.com)

***** Department of Pharmaceutical Sciences and Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil (tania.pasa@ufsc.br)

* Both authors contributed equally to this work

Abstract: Silencing important genes related to tumorigenesis by RNA interference has emerged as promising alternative to cancer therapy. Targeted delivery of short interfering RNA (siRNA) to tumors is necessary, given the nucleic acid vulnerability in circulation. Here we used purified hybrid nanoparticles based on calcium phosphate for siRNA delivery against *BCL-2* gene in murine breast tumors. Although biodistribution studies suggested that siRNA molecules carried by nanoparticles were found in heart, kidney and tumor, reduction in tumor volume and *BCL-2* knockdown were observed. The results suggest that silencing antiapoptotic genes using siRNA-loaded hybrid nanoparticles is a powerful tool for cancer therapy.

© 2018, IFAC (International Federation of Automatic Control) Hosting by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nanoparticle, Polymer, Short Interfering RNA, Breast Cancer, Apoptosis, *In vivo*

1. INTRODUCTION

Changes in the expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic genes have been shown to play an important role in cancer development. Resistance to apoptosis can lead to cellular survival and lack of response to anti-cancer treatment. Consequently, drugs that have apoptosis as a target can re-establish cell death and eliminate neoplastic cells (Yaacoub et al., 2016; Hassan et al., 2014). Overexpression of anti-apoptotic proteins, such as B-cell lymphoma 2 (*BCL-2*), is related to resistance to apoptosis, culminating in tumorigenesis (Chen et al. 2014; Fekouli et al. 2004). Thus, *BCL-2* family of proteins has been studied at the physiology and cancer progression, and it is currently evaluated as an interesting target for the treatment of this disease (Garner et al., 2017).

One of the strategies to reach and impede the expression of the *BCL-2* gene in cancer is the use of siRNA (short interfering RNA) as RNA interference therapy (RNAi). The siRNA molecules are double-stranded RNAs capable of

binding to messenger RNA and inhibit gene expression to promote reduced target protein production (Fire et al., 1998; Elbashir et al., 2001). Short interfering RNA molecules are unstable in biological fluids and have rapid clearance when administered systemically (Turner et al., 2007; Hauptenthal et al., 2006; van de Water, 2006). Thus, the application of efficient carrier systems that have the ability to deliver the siRNA directly into the tumor, promoting the silencing of overexpressed oncogenes, is necessary.

Nucleic acid carriers are divided into viral or non-viral nanoparticles. Several viral vectors have been presented as efficient in the transport of nucleic acids (Merten and Gaillet, 2016). However, due to problems with safety and high cost, the application is limited. Therefore, non-viral vectors appear as an interesting alternative since they are considered safe, with reduced toxicity due to low immunogenicity and the possibility of large scale production, which increases their clinical application (Zhou et al., 2017; Morrison, 2015; Gunn et al. 2013).

b) Artigo publicado como coautor, durante o doutorado, contendo assunto da tese

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

Leônidas João de Mello Jr.^{1,2}, Gabriela Regina Rosa Souza¹, Evelyn Winter¹, Adny Henrique Silva¹, Frederico Pittella³ and Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{1,3}

¹ Post-graduation Course in Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Rua Pio Duarte Silva, 241, 88037-000 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 Curitibanos-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)

Abbreviations

ANOVA analysis of variance
BSA bovine serum albumin

CaP

CC₅₀

calcium phosphate

the concentration of drug that results in toxicity for 50% of the cells

c) Artigo publicado como coautor, durante o doutorado, contendo assunto da tese

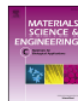
Materials Science & Engineering C 99 (2019) 1182–1190



Contents lists available at ScienceDirect

Materials Science & Engineering C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msec



Magnetically responsive hybrid nanoparticles for *in vitro* siRNA delivery to breast cancer cells



Milene Dalmina^{a,1,2}, Frederico Pittella^{a,b,1}, Jelver Alexander Sierra^{c,3},
Gabriela Regina Rosa Souza^a, Adny Henrique Silva^a, André Avelino Pasa^{a,c},
Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{a,b}

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330 Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Department of Mechanical Engineering PGMAT, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^d Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

^e Department of Physics, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Magnetic hybrid nanoparticles
Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
Calcium phosphate
Block copolymer
Short-interfering RNA
Breast cancer

ABSTRACT

Short interfering RNA (siRNA) showed to be a viable alternative to a better prognosis in cancer therapy. Nevertheless, the successful application of this strategy still depends on the development of nanocarriers for the safe delivery of siRNA into the diseased tissue, which mostly occurs by passive accumulation. When an external magnetic field is applied, magnetic nanoparticles biodistribution is partially modulated to favor accumulation in a target tissue. In this work we designed a novel magnetic responsive siRNA nanocarrier. The new delivery system is composed of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) coated with calcium phosphate (CaP) and PEG-polylactide block copolymers, which are known to be biocompatible. The nanoparticles presented rounded shape with small size and narrow distribution suitable for biomedical applications. TEM images showed dark spheres in the core surrounded by a lower electron density material in the corona. The X-ray photoelectron spectra (XPS) confirmed CaP-polymer coating of the magnetic core. In addition, the coating procedure did not affect the superparamagnetic property as showed using a vibrating sample magnetometer (VSM). With a high loading efficiency (80%), the nanoparticles enhanced vascular endothelium growth factor (VEGF) silencing in breast cancer cells *in vitro*, at gene and protein levels (~60% and 40%, respectively), without associated toxicity. Iron and siRNA quantification showed that the novel nanoparticles move towards a magnetic source carrying siRNA molecules. Therefore, these novel nanoparticles are a promising tool for cancer therapy based on RNAi effect, added by a magnetic capability to further modulate siRNA accumulation in the target tissue.

1. Introduction

The RNA interference (RNAi)-based therapies have emerged as promising alternatives to traditional chemotherapy in cancer treatments by selectively silence pathology-related genes and thus reduce undesired off-target effects. The delivery of short interfering RNA (siRNA) molecules precisely to cancer cells is crucial to the success of the therapy and causes sequence specific degradation of messenger RNA (mRNA) in the transfected cells for the modulation of protein expression [1,2]. However, there are several drawbacks in naked siRNA

delivery attempts, including fast enzymatic degradation, polyanionic molecular behavior and lack of cell specificity [3]. To avoid degradation, inefficient penetration across biological obstacles and unwanted side effects, siRNA nanocarriers are usually designed to overpass the barriers and subsequently deliver RNAi effector molecules to the cytoplasm of cancer cells. Most of the developed nanocarriers reach the tumor tissue by passive accumulation through the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect [4–6]. On the other hand, active-targeted nanocarriers are able to accumulate specifically in the tumor loci, thereby enhancing the delivery specificity [7,8].

* Corresponding author.

E-mail address: tania.pasa@ufsc.br (T.B. Creczynski-Pasa).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: School of Chemistry, Newcastle University, NE1 7RU Newcastle, Tyne and Wear, United Kingdom.

³ Present address: Vitarium – Research Center in Nutrition, Healthy and Well Being, Calle 8 sur #50-67 Medellín, Colombia.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.026>

Received 30 August 2018; Received in revised form 25 January 2019; Accepted 8 February 2019

Available online 10 February 2019

0928-4931/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

d) Artigo publicado como coautor, durante o doutorado

Science of the Total Environment 660 (2019) 1264–1273



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Genetic, reproductive and oxidative damage in mice triggered by co-exposure of nanoparticles: From a hypothetical scenario to a real concern



Okunola Adenrele Alabi^{a,c,*}, Adny Henrique Silva^b, Louise Rubia Probst Pumhagen^c, Gabriela Regina Rosa Souza^c, Leônidas João de Mello Júnior^b, Fabíola Branco Filippin-Monteiro^d, Milene Dalmina^c, Frederico Pittella^e, Adekunle Akanji Bakare^f, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa^{c,e}

^a Department of Biology, Federal University of Technology, Akure, Ondo State, Nigeria

^b Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^c Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^d Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

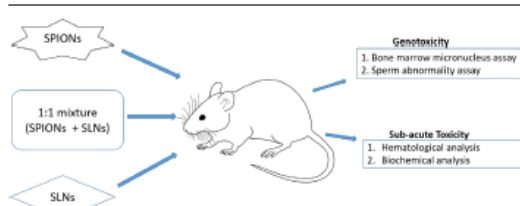
^e Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

^f Cell Biology and Genetics Unit, Department of Zoology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria

HIGHLIGHTS

- SPIONs, SLNs and their mixture were genotoxic to germ and somatic cells of mice.
- The mixture of SPIONs and SLNs induced the highest genotoxicity in cells.
- Significant alteration in hematological parameters was observed in mice exposed to the nanoparticles.
- Increased activities of AST were observed in the mice treated with the nanoparticles.
- Possible synergistic effect of SPIONs + SLNs in the induction of genetic and reproductive alterations

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2018

Received in revised form 5 December 2018

Accepted 5 January 2019

Available online 7 January 2019

Editor: Kevin V. Thomas

Keywords:

Solid lipid nanoparticles

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles

Genotoxicity

Micronucleus and sperm morphology

Co-exposure

ABSTRACT

Humans are potentially exposed to multiple nanoparticles kinds through nanotechnology-based consumer products. There is insufficient data on the *in vivo* toxicity of nanotechnology products, as well as no data on the possible toxicity, including genotoxicity and reproductive toxicity of co-exposure to different kind of nanoparticles. In this work, solid lipid nanoparticles (SLNs) and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were selected for evaluation of a hypothetical condition of *in vivo* co-exposure. Genotoxicity of SPIONs and SLNs was performed separately and in 1:1 mixture in mice. Bone marrow micronucleus assay, sperm morphology test, and sperm count were carried out. Also, the serum ALT and AST activities; and hematological parameters of the treated mice were analyzed. The results showed a significant increase ($p < 0.05$) in micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and nuclear abnormalities (NA) in SPIONs, SLNs and their mixture treated mice. The mixture induced the highest frequency of MNPCE and NA. A similar result was observed in the sperm morphology test, with the mixture inducing the highest sperm abnormalities, followed by SLNs and the least by SPIONs. Significant alteration to RDW, MCHC, MCV, GRAN, and platelets, as well as increased activities of serum AST were observed in the mice treated with a mixture of the two kinds of nanoparticles. Calculation of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: oaalabi@ufjf.edu.br, alabiokunola@yahoo.com (O.A. Alabi), tania.pasa@ufsc.br (T.B. Creczynski-Pasa).

e) Artigo submetido como coautor, durante o doutorado

Gabriela Souza <gabrielaereginars@gmail.com>

Your co-authored submission

1 mensagem

Annual Reviews in Control <Evisesupport@elsevier.com>

18 de abril de 2019 14:48

Responder a: system@evise.com

Para: gabrielaereginars@gmail.com

Dear Dr. Souza,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Annual Reviews in Control

Title: Nanomedicine Strategies for Addressing Major Needs in Neglected Tropical Diseases

Corresponding Author: Frederico Pittella

Co-Authors: María José Morilla, E.L. Romero, Maria Julia Altube, Camila Quinetti Paes, Ana Valle, Gabriela Regina Rosa Souza, Horacio Cabral, Tânia Creczynski-Pasa, Takuya Miyazaki, Adny Henrique Silva

Frederico Pittella submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ARC

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page:http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at fredpittella@gmail.com.Thank you,
Annual Reviews in Control**This message was sent automatically. Please do not reply**

f) Artigos a serem submetidos durante o doutorado

PEGylated calcium phosphate hybrid nanoparticles for delivery of siRNA to breast cancer

Gabriela Regina Rosa Souza ^a, Jelver Alexander Sierra Restrepo ^b, Leônidas João de Mello Junior ^c, Adny Henrique Silva ^c, Milene Dalmina ^a, Ana Gualberto ^d, Jacy Gameiro ^d, Dalton Ditz Júnior ^e, Frederico Pittella ^f, Tânia Beatriz Creczynski Pasa ^a

^a Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil

^b Department of Mechanical Engineering, PGMat, Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil

^c Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, SC, Brazil

^d Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, MG, Brazil

^e Department of Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, MG, Brazil

^f Department of Pharmaceutical Sciences and Graduate Program in Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, MG, Brazil

Evaluation of long-term bioaccumulation and effects of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles mPEG2000-coated

Adny H. Silva, Gabriela R. R. Souza, Louise R. P. Purnhagen, Leônidas J. de Mello Jr., Junior E. Lima Jr, Tânia B. Creczynski-Pasa.

ANEXO D – Menção honrosa do Prêmio Newton Freire-Maia com o trabalho de doutorado



GENÉTICA²⁰¹⁷
BRAZILIAN-INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS

SEPTEMBER 12-15, 2017
MONTE REAL RESORT - ÁGUAS DE LINDÓIA/SP - BRAZIL

Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética concede a **GABRIELA REGINA ROSA SOUZA HABERBECK** menção honrosa pela participação no PRÊMIO NEWTON FREIRE-MAIA na área de GENÉTICA HUMANA, com o trabalho intitulado "DEVELOPMENT OF HYBRID NANOPARTICLES AND ANTITUMORAL ACTIVITY OF DELIVERED VEGF SIRNA TO BREAST CANCER" autoria de SOUZA, G.R.R.; MELLO JUNIOR, L.J.; SILVA, A.H.; SIERRA, J.A.; GUALBERTO, A.; PITTELLA, F.; CRECZYNSKI-PASA, T.B., apresentado durante o *GENÉTICA 2017 - Brazilian-International Congress of Genetics*, em Águas de Lindóia, SP, período de 12 a 15 de Setembro de 2017.

Patrocinador: Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia

GH101

Leonor
Marta Maria A.P. Margis
Presidente da SBG

SBG SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA

Newton Freire Maia
Newton Freire Maia Rost
Prêmio Newton Freire Maia da SBG