



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO, PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA O CARREAMENTO
DE siRNA PARA INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DO GENE
VEGF EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA**

Milene Dalmina

Orientadora: Profa. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Co-orientador: Prof. Frederico Pittella Silva

Florianópolis
2015.

Milene Dalmina

**DESENVOLVIMENTO, PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA O CARREAMENTO
DE siRNA PARA INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DO GENE
VEGF EM LINHAGEM CELULAR DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito à obtenção do título de
Mestre em Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz
Creczynski-Pasa
Co-orientador: Prof. Dr. Frederico
Pittella Silva

Florianópolis
2015

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

DALMINA, MILENE
DESENVOLVIMENTO, PREPARAÇÃO E APLICAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA O CARREAMENTO DE siRNA PARA
INTERFERÊNCIA NA EXPRESSÃO DO GENE VEGF EM LINHAGEM
CELULAR DE CÂNCER DE MAMA / MILENE DALMINA ; orientadora,
TÂNIA BEATRIZ CRECZYNSKI-PASA ; coorientador, FREDERICO
PITTELLA SILVA. - Florianópolis, SC, 2015.
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. siRNA. 3. SPIONS. 4. FOSFATO DE CÁLCIO.
5. CÂNCER DE MAMA. I. CRECZYNSKI-PASA, TÂNIA BEATRIZ. II.
PITTELLA SILVA, FREDERICO. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

MILENE DALMINA

Dissertação julgada adequada para a obtenção do Título de MESTRE em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 17 de março de 2015.

Prof. Dr^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação

Comissão Examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Membro Titular

Prof^a. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Membro Titular

Dra. Evelyn Winter
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) - Membro Titular

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a minha mãe Elaíce, minha avó Amélia e minhas irmãs Camila e Sofia pelo amor e dedicação a mim, pelo apoio, incentivo e compreensão sempre presentes durante toda a minha trajetória.

A minha orientadora Tânia B. Creczynski-Pasa pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, por acreditar e confiar em mim, permitindo que eu desenvolvesse meu projeto, estando sempre disponível para me ajudar quaisquer que fossem os problemas.

Ao meu co-orientador Frederico pela paciência em ensinar e guiar meus passos na pesquisa. Obrigada pela troca de conhecimentos, pelo tempo disponibilizado para ajudar, inclusive na bancada, mas principalmente obrigada pela amizade construída durante este período.

À professora Fabíola por todas as discussões científicas.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Jelver e Gabriela, por todas as discussões científicas, ensinamentos, colaboração, companheirismo e grande ajuda durante o desenvolvimento deste projeto. Agradeço também ao Jelver por me auxiliar na caracterização das nanopartículas utilizando as técnicas de TEM, Raman e XPS.

Aos colegas do “*Nanogroup*” Leonidas e Tatiane, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar, inclusive no desenvolvimento desta dissertação.

À professora Evelyn pela ajuda na microscopia confocal.

Ao ex-colega Caio Vanoni, pela amizade e comprometimento no desenvolvimento das nanopartículas de óxido de ferro.

À toda família GEIMM, Ivonete, Iara, Heloiza, Julia, Daiane, Alex, Débora, Leontina, Jefferson, Najla, Debie, Maria Fernanda, Anne e demais colegas pela troca de conhecimentos, amizade e boas risadas.

Às além de colegas, grandes amigas, Adny e Laura, que além de ajudar de forma científica, sempre estiveram do meu lado nos momentos difíceis. Obrigada pelos “*coffee-breaks*” que tivemos, em que sempre pude colocar as idéias em ordem e desenvolver meu trabalho.

Aos amigos aqui não citados que sempre apoiaram e respeitaram minhas escolhas.

Aos professores Tânia Frode e Eduardo Dalmarco por disponibilizar o laboratório para as análises de qPCR.

Ao professor Márcio Martinez Alvarez por permitir as quantificações de RNA em seu laboratório.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) pela oportunidade de utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão e do Microscópio de Confocal. Em especial, gostaria de agradecer a Eliana Oliveira por todas as sessões realizadas no LCME e principalmente pelo breve treinamento oferecido.

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

Ao programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC, que possibilitou o envolvimento desta dissertação.

Ao CNPQ, CAPES e FAPESC, pelo suporte financeiro;

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

“Ter Fé é acreditar naquilo que você não vê;
A recompensa por essa Fé,
É ver aquilo em que você acredita.”

Santo Agostinho (354 – 430 d.C.)

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente, atingindo 1.7 milhões de mulheres no mundo. É caracterizado pelo crescimento e proliferação celular desordenado, podendo ocorrer migração das células tumorais, invasão e metástase para outros tecidos e órgãos. Os tratamentos convencionais para o câncer não atingem somente as células tumorais, mas também os tecidos saudáveis apresentando uma série de efeitos adversos que podem levar a complicações severas. Com o avanço do entendimento da genética do câncer e a identificação de genes alvo, a aplicação do efeito de RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como alternativa viável para a melhora do prognóstico. A estratégia anti-angiogênica com a introdução de siRNA contra proteína-chave da angiogênese surge como opção entre os genes alvo superexpressos no câncer de mama. Porém, o sucesso da aplicação de RNAi na terapêutica depende do desenvolvimento de nanocarreadores de siRNA efetivos no transporte e na proteção da molécula contra a rápida degradação na circulação. Desta forma, neste trabalho foram preparados dois tipos de suspensão de nanopartículas carreadoras em diferentes pHs (NP1 e NP2), constituídos de 3 componentes (SPIONs, CaP e copolímero PEG-PAsp) responsáveis por realizar funções distintas desde a formação das nanopartículas até a liberação controlada no citoplasma de células de carcinoma de mama. As nanopartículas foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz, apresentando diâmetro hidrodinâmico médio entre 120 nm e 140 nm em distribuição por intensidade, e índice de polidispersão (Pdl) entre 0,05 e 0,15. A avaliação do tamanho e da morfologia por microscopia eletrônica de transmissão corroborou os resultados de caracterização pela comparação com o histograma em número. As nanopartículas se apresentaram com alto potencial magnético, verificado pela capacidade de magnetização dos mesmos, sugerindo estruturas cristalinas de magnetita e maghemita. De acordo com os estudos de citotoxicidade realizados por MTT, ambas NP1 e NP2 não foram citotóxicas em células de câncer de mama MDA-MB 231. A avaliação da eficácia em promover o escape endossomal e entregar o siRNA para o silenciamento foi estudada por microscopia confocal e RT-qPCR. A microscopia confocal confirmou a habilidade dos sistemas nanocarreadores em promover o escape endossomal, enquanto que a partir do ensaio de qPCR foi possível observar a redução da expressão do gene VEGF em cerca de 60% em relação aos controles. Diante deste cenário, as nanopartículas carreadoras NP1 e NP2 apresentam-se como alternativas viáveis para aplicação do efeito de RNA de interferência *in*

vivo, devido a sua capacidade de carregamento ativo de siRNA no campo magnético, ausência de citotoxicidade, e eficiência na entrega ao citoplasma celular para o silenciamento do gene VEGF objetivando a terapia anti-angiogênica contra o câncer de mama.

Palavras-chave: SPIONs, fosfato de cálcio, siRNA, terapia anti-angiogênica, VEGF, câncer de mama.

ABSTRACT

Development, characterization and application of magnetic nanoparticles for siRNA delivery for interference in VEGF gene in breast cancer cell line

Breast cancer is the second most common cancer, affecting 1.7 million women. It is characterized by disordered cell growth and proliferation, tumor cells migration, invasion and metastasis. Conventional cancer treatments affect not only tumor cells but also healthy tissue presenting a series of adverse effects that may lead to severe poisoning. With the advancement of the understanding of the cancer genetics and the identification of target genes, application of interference RNA (RNAi) effect is presented as a viable alternative to a better prognosis. The anti-angiogenic strategy with the introduction of siRNA against key protein of angiogenesis appears as an option between the target genes overexpressed in breast cancer. However, the successful application of RNAi depends exclusively on the development of effective siRNA nanocarriers to transport and to protect the molecule against rapid degradation in the blood circulation. Thus, in this work were prepared two kinds of nanoparticles at different pHs (NP1 and NP2), consisting of 3 components (SPIONs, CaP and PEG-PAsp copolymer) responsible for performing different functions from the formation of nanoparticles to controlled release in the cytoplasm of breast carcinoma cells. The nanoparticles were characterized by dynamic light scattering, with hydrodynamic average diameter between 120 nm and 140 nm by intensity distribution and polydispersity index (PDI) of 0.05 to 0.15. The evaluation of the size and morphology by transmission electron microscopy confirmed the characterization results by comparison with the histogram in number. Nanoparticles presented high magnetic potential, verified by magnetizing capacity thereof, suggesting crystal structures of magnetite and maghemite. According to the cytotoxicity by MTT studies, both NP1 and NP2 are not cytotoxic in the MDA-MB 231 breast cancer cells. The efficacy in promoting endosomal escape and deliver siRNA for silencing was studied by confocal microscopy and RT-qPCR. Confocal microscopy confirmed the ability of nanocarriers to promote endosomal escape, while the qPCR assay was possible to observe a reduction in the expression of VEGF gene in about 60% compared to controls. In this scenario, the NP1 and NP2 nanoparticles are presented as a viable alternative carrier for application in RNA interference *in vivo*, due to its capacity of carrying siRNA by active targeting with application of a magnetic field, lack of

cytotoxicity, and efficiency in delivery to cell cytoplasm to silencing of VEGF gene with the objective of anti-angiogenic therapy against breast cancer.

Keywords: SPIONs, calcium phosphate, siRNA, anti angiogenic therapy, VEGF, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carcinoma ductal <i>in situ</i>	30
Figura 2: Carcinoma lobular <i>in situ</i>	31
Figura 3: Via de RNAi em células de mamíferos.....	35
Figura 4: Via do silenciamento gênico em células eucarióticas através de siRNA.....	36
Figura 5: Angiogênese na progressão do tumor	38
Figura 6: Vascularização após terapia anti-angiogênica	39
Figura 7: Ligação específica dos membros da família VEGF e seus receptores	39
Figura 8: Exemplos de sistemas nanocarreadores	41
Figura 9: Acumulação passiva através do efeito EPR.....	44
Figura 10: Acumulação ativa através de campo magnético	45
Figura 11: Escape endossomal de nanocarreadores	47
Figura 12: Estrutura química do PEG-PAsp	49
Figura 13: Representação gráfica da célula de vácuo utilizada para a síntese de SPIONs	53
Figura 14: Esquema de preparação das NP1	55
Figura 15: Esquema de preparação das NP2.....	56
Figura 16: Representação esquemático do ensaio de responsividade ao campo magnético.....	60
Figura 17: Tamanho e morfologia de nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs).....	67
Figura 18: Potencial zeta das SPIONs.....	68
Figura 19: Representação gráfica das nanopartículas 1 e 2.....	69
Figura 20: Histogramas de tamanho em nm determinado por medidas de DLS	71
Figura 21: Morfologia das nanopartículas NP1 e NP2 por TEM.	72
Figura 22: Estabilidade coloidal das NP1 e NP2 a 4 °C.....	73
Figura 23: Curva-padrão de siRNA.....	75
Figura 24: Medidas de XPS das NP 2	76
Figura 25: Espectroscopia Raman dos sistemas nanoparticulados.....	78
Figura 26: Quantificação de ferro após aplicação de campo magnético externo.....	79
Figura 27: Quantificação de siRNA após aplicação de campo magnético externo.....	80
Figura 28: Citotoxicidade dos sistemas NP1 e NP2 em células de câncer de mama	82
Figura 29: Expressão do gene VEGF em células de câncer de mama após tratamento com os nanocarreadores contendo siVEGF.....	84

Figura 30: Localização intracelular das NP1 por microscopia confocal⁸⁷

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Condições da reação de qPCR	63
-----------	-----------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de iniciadores utilizados na reação de qPCR	64
Tabela 2: Determinação do ponto isoelétrico de SPIONs	68
Tabela 3: Medidas de DLS e potencial zeta após liofilização.	74
Tabela 4: Medidas de DLS e PdI após campo magnético externo.	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO2	Proteína do complexo RISC Argonauta 2
ANOVA	Análise de variância
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CaP	Fosfato de cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
Cy5	Fluorocromo Cianina 5
DAPI	4'-6- diamidino -2- phenylindole
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPR	Aumento da permeabilidade e retenção
ER+	Receptor de Estrogênio positivo
eV	Elétron volt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe II	Íons ferro II
Fe III	Íons ferro III
FeCl ₂	Cloreto de ferro II
FeCl ₃	Cloreto de ferro III
Fe ₃ O ₄	Óxidos de ferro na forma cristalina magnetita
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
HAP	Hidroxiapatita
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
HER2+	Receptor do fator de crescimento epidérmico HER2 positivo
mM	Milimolar
M	Molar
MDA-MB 231	Linhagem celular humana de adenocarcinoma de mama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
Mock	Sistema nanoparticulado sem siRNA
mRNA	RNA mensageiro
ml	Mililitro
mV	Milivolt
MTT	Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Naked siRNA	siRNA não incorporado a nanocarreadores

nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₂ OH. HCl	Cloridrato de hidroxilamina
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
NP1	Sistema nanoparticulado 1
NP2	Sistema nanoparticulado 2
PdI	Índice de polidispersão
PEG	Poli etileno glicol
PEG-PAsp	Poli (etileno glicol) -bloco- poli aspartato
pH	Potencial de Hidrogênio
PM	Peso molecular
PR+	Receptor de progesterona positivo
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
siVEGF	<i>Small interfering</i> RNA específico para o gene VEGF
siVEGF_Cy5'	<i>Small interfering</i> RNA específico para o gene VEGF marcado com cianina 5
siSCR	<i>Scramble Small interfering</i> RNA - siRNA controle negativo
SPIONs	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TMAOH	Hidróxido de tetrametil amônio
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR1	Receptor para VEGF tipo 1
VEGFR2	Receptor para VEGF tipo 2
XPS	Espectroscopia de emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X
γ -Fe ₂ O ₃	Óxidos de ferro na forma cristalina maghemita
⁰ C	Grau centígrado
μ L	Microlitro
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1.	Câncer de Mama.....	27
2.1.1.	Fatores de risco.....	28
2.1.2.	Sintomas e Detecção.....	29
2.1.3.	Classificação Histológica do Câncer de Mama.....	29
2.1.4.	Classificação Molecular do Câncer de Mama.....	31
2.1.5.	Tratamento do câncer de mama.....	32
2.3.	Terapia Anti-angiogênica.....	37
2.4.	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF).....	39
2.5.	Nanocarreadores para a entrega de siRNA.....	40
2.6.	Acumulação passiva e ativa nas células e tecidos alvos.....	43
2.7.	Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas (SPIONs).....	45
2.8.	Fosfato de Cálcio (CaP).....	46
2.9.	Bloco de copolímero poli (etileno glicol) -bloco- poli aspartato [PEG-PAsp].....	48
3.	OBJETIVOS.....	50
3.1.	Objetivo Geral.....	50
3.2.	Objetivos Específicos.....	50
4.	MATERIAS E MÉTODOS.....	51
4.1.	Reagentes e cultura celular.....	51
4.2.	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs).....	52
4.3.	Síntese das nanopartículas.....	53
4.3.1.	Nanopartículas 1 (NP1).....	54
4.3.2.	Nanopartículas 2 (NP2).....	55
4.4.	Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão.....	56
4.5.	Determinação da carga superficial das partículas.....	57
4.6.	Avaliação morfológica dos sistemas nanoparticulados.....	57
4.7.	Estudo de estabilidade coloidal.....	57
4.8.	Estudo preliminar de liofilização das formulações.....	57
4.9.	Avaliação da eficiência de incorporação.....	58
4.10.	Avaliação da superfície das partículas.....	58

4.10.1.	Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS).....	59
4.10.2.	Espectroscopia Raman.....	59
4.11.	Estudo de responsividade ao campo magnético.....	60
4.11.1.	Quantificação de ferro.....	60
4.11.2.	Quantificação de siRNA.....	61
4.12.	Verificação da atividade <i>in vitro</i>	61
4.12.1.	Cultura Celular.....	62
4.12.2.	Avaliação da citotoxicidade.....	62
4.12.3.	Avaliação do silenciamento gênico.....	63
4.12.4.	Extração de RNA.....	63
4.12.5.	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	63
4.12.6.	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....	64
4.12.7.	Avaliação da endocitose de nanopartículas.....	64
4.13.	Análise Estatística.....	65
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1.	Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs).....	66
5.2.	Preparação dos sistemas nanoparticulados NP1 e NP2.....	68
5.3.	Caracterização das NP1 e NP2.....	70
5.4.	Avaliação da morfologia dos nanocarreadores.....	71
5.5.	Estabilidade coloidal.....	72
5.6.	Estudo preliminar de liofilização.....	73
5.7.	Avaliação da Eficiência de Incorporação.....	74
5.8.	Análise de superfície.....	75
5.8.1.	Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS).....	75
5.8.2.	Espectroscopia Raman.....	76
5.9.	Avaliação da Responsividade ao campo magnético.....	78
5.9.1.	Quantificação de Ferro.....	78
5.9.2.	Quantificação de siRNA.....	79
5.10.	Avaliação da toxicidade celular.....	81
5.11.	Avaliação do silenciamento gênico.....	83
5.12.	Avaliação da endocitose dos sistemas em células de câncer de mama.....	85
6.	CONCLUSÕES.....	88
7.	PERSPECTIVAS.....	89
	REFERÊNCIAS.....	91

APÊNDICE A – Curva-padrão	105
APÊNDICE B – Curva de eficiência dos iniciadores	106
APÊNDICE C – Processo de submissão ao INPI para pedido de proteção a propriedade intelectual	107

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o termo genérico para um grande grupo de doenças capazes de atingir qualquer parte do organismo tendo como principal característica o crescimento celular descontrolado (WHO, 2015). É o termo utilizado para designar malignidade celular. O avanço da doença para outros tecidos e órgãos, caracteriza o processo de metástase, que está intimamente relacionado com o mau prognóstico do paciente (SUDHAKAR, 2009).

O câncer é uma doença multifatorial com severos impactos na saúde humana. Dados epidemiológicos o apontam como responsável pela morte de oito milhões de pessoas anualmente em todo o mundo, vítimas de suas diversas formas de manifestação: mama, pulmão, fígado, cérebro e outros tipos (WHO, 2012; PENET *et al.*, 2013; YANG e WANG, 2013). Somente na união europeia, para o ano de 2015, são previstas 1.359,100 mortes por câncer (MALVEZZI *et al.*, 2015). Nos últimos 50 anos, a incidência de câncer no mundo aumentou significativamente, sendo que, com os incrementos anuais, estima-se que em 2030 o número de mortes alcance 17 milhões (DONEPUDI *et al.*, 2014).

Entre todos os tipos de câncer, o de mama ocupa o quinto lugar na escala de mortalidade. No gênero feminino, no entanto, o câncer de mama responde pela maior taxa de mortalidade mundial (0,5 milhões/ano) (WHO, 2014). Malvezzi *et al* (2015), corroboram esta informação e estimam 90.800 mortes por câncer de mama na união europeia em 2015, número que ocupa o primeiro lugar em mortalidade entre mulheres daquela região.

Os tratamentos convencionais para o câncer não atingem somente as células tumorais, mas também os tecidos saudáveis apresentando uma série de efeitos adversos que podem levar a complicações severas. Diversas alternativas terapêuticas vêm sendo pesquisadas no decorrer dos anos em busca de tratamentos menos agressivos e mais eficazes (LEE *et al.*, 2012).

Devido ao avanço do entendimento da genética do câncer e a identificação de genes alvos, a aplicação do efeito de RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como alternativa viável para a melhora do prognóstico. A terapia com RNAi poderá possibilitar o controle da produção de proteínas através da interferência na expressão de genes endógenos a partir da utilização de sequências curtas de RNA, moléculas chamadas de *small* (ou *short*) *interfering*

RNA (siRNA) (HANNON, 2002). Neste sentido, vários estudos vêm sendo realizados para possibilitar o uso do efeito de RNA interferência no tratamento do câncer, visando a melhora dos procedimentos convencionais terapêuticos (MONAGHAN e PANDIT, 2011; PITTELLA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2014).

A compreensão dos mecanismos genéticos do câncer facilita a identificação dos genes chaves que iniciam e regulam a progressão da doença. Genes envolvidos nas vias de oncogênese, apoptose, regulação do ciclo e senescência celular, interação tumor-hospedeiro, resistência às terapias convencionais e angiogênese podem se constituir como alvos terapêuticos valiosos (MASIERO *et al.*, 2007). A angiogênese, em particular, representada pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), apresenta-se como via interessante para aplicação do efeito de RNAi, uma vez que células tumorais superexpressam tal proteína chave (WYSOCKI *et al.*, 2002).

Considerando o potencial terapêutico dos siRNA especialmente contra o câncer e o alto grau de suscetibilidade destas substâncias à ataques enzimáticos, é providencial desenvolver veículos eficientes de entrega as células e/ou tecidos alvos. Adiciona-se às hostilidades do meio, a necessidade de transpor a membrana celular do alvo para alcançar o efeito eficiente de RNAi (MIYATA *et al.*, 2012). Moléculas de siRNAs livres são facilmente degradadas por nucleases e são fracamente absorvidas para o meio intracelular, de forma que vetores, como sistemas nanoestruturados incluindo nanopartículas, são necessários para a proteção e entrega à célula alvo. Assim, a ausência de um apropriado sistema de entrega de siRNA tem sido apontada como um grande obstáculo neste tipo de estratégia terapêutica (ZHANG e KATAOKA, 2009; MIYATA *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012).

Diante deste cenário, considerando a importância epidemiológica do câncer de mama e o difícil tratamento disponível atualmente, este trabalho visa à preparação de nanopartículas magnéticas para a aplicação terapêutica de siRNA anti-angiogênico contra o câncer de mama.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente no sexo feminino. Atinge indivíduos em países desenvolvidos e em desenvolvimento sendo um grupo heterogêneo de doenças, com comportamentos distintos. No ano de 2012, foi responsável por 25% do total de casos de câncer em mulheres no mundo, representando 1,7 milhões de novos casos (WCRF, 2013). A incidência e a taxa de mortalidade do câncer de mama apresentam crescimento ascendente, devido ao aumento da expectativa de vida e mudanças na rotina diária (INCA, 2012a).

Na América do Sul, o número estimado de novos casos anuais de câncer de mama é de 88,4 mil. Para efeito de comparação, o norte da África tem 28 mil novos casos/ano, e a América do Norte 205,5 mil casos. A alta incidência em países desenvolvidos é atribuída, segundo Benson e Jatou (2012) a fatores como: estilo de vida, aspectos reprodutivos, dieta, sedentarismo e reposição hormonal, realizada por mulheres com maior potencial econômico. Nestes países, observam estes autores, houve declínio da mortalidade desde os anos 90, relacionado com o acesso ao diagnóstico precoce e terapêutica adequada (BENSON e JATOI, 2012). Corroborar para esta assertiva o índice de sobrevida médio após cinco anos do diagnóstico: entre 10-40% em países em desenvolvimento, contra mais de 80% em países desenvolvidos (WHO, 2014).

No Brasil, a incidência de câncer de mama no sexo feminino (53 mil casos novos/ano) ocupa o segundo lugar, entre todos os tipos de câncer, precedido pelo câncer de pele não melanoma (71 mil casos novos/ano). No entanto, esta prevalência não se comporta da mesma forma quando a análise é regional: O câncer de mama lidera, considerando o universo feminino, nas regiões Sudeste (69/100 mil), Sul (65/100 mil), Centro-Oeste (48/100 mil). Na região Norte do país é o segundo tumor mais frequente (19/100 mil) (INCA, 2012b). Em relação à mortalidade, o câncer de mama no Brasil adere ao panorama mundial, sendo o câncer com maior taxa de mortalidade no gênero feminino, com mais de 13.000 mortes anuais no país (INCA, 2013), apresentando taxa de sobrevida de 58% (LIEDKE *et al.*, 2014).

2.1.1. Fatores de risco

O câncer de mama é uma doença heterogênea, originada por distintos fatores, de ordem genética e/ou ambiental, de forma que os vários subtipos descritos apresentam diferentes respostas teciduais e terapêuticas (GRIMM *et al.*, 2011). A história familiar do câncer de mama está relacionada a um aumento de duas a três vezes o risco de desenvolver a doença. Mesmo ao fator genético é atribuída uma heterogeneidade frente ao envolvimento de diferentes genes e expressões destes. Mutações em genes relacionados à regulação hormonal e reparos no DNA (P53, BRCA1, BRCA2), por exemplo, são as mais comumente encontradas correlacionadas à gênese da neoplasia (CARRARO *et al.*, 2013). Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 constituem o principal fator hereditário relacionado ao desenvolvimento do câncer de mama (EROLES *et al.*, 2012). Estes genes são classificados como genes supressores de tumor e desempenham importantes funções nos mecanismos de reparação celular, incluindo a ativação e a regulação transcricional, o reparo de lesões no DNA, além do controle do ciclo celular, da proliferação e diferenciação celular (LIEBENS *et al.*, 2007).

A idade segue sendo o principal fator de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta (INCA, 2012b). Considerando os casos de câncer de mama precoce, o Brasil possui uma incidência em ascensão desde os anos 80. Esta forma de câncer de mama subiu de 6,4 para 7,8 (para cada 100.000 indivíduos) entre as mulheres de 25 – 29 anos. Para a idade entre 30 – 34 anos, a taxa de incidência teve acréscimo de 19 para 27,6 (ORTEGA JACOME *et al.*, 2010). Segundo Carraro *et al.*, em um estudo sobre o câncer de mama precoce no Brasil, nesta faixa etária (25 – 34 anos) o câncer é mais invasivo e requer terapias mais agressivas (CARRARO *et al.*, 2013).

Entre outros fatores que podem favorecer o desenvolvimento do câncer de mama, pode-se citar a influência da longa exposição ao hormônio estrogênio, como ocorre em situações de menarca precoce, menopausa tardia, gravidez em idade avançada, bem como no uso de hormônios sintéticos. Hábitos não saudáveis como uso abusivo de álcool, sedentarismo e obesidade também podem influenciar no desenvolvimento do câncer (DANAEI *et al.*, 2005; LACEY *et al.*, 2009).

2.1.2. Sintomas e Detecção

Os sintomas do câncer de mama normalmente são detectados quando a doença já está em estágio avançado. Clinicamente, é possível observar alterações na pele que recobre a mama, como abaulamentos, retrações ou aspecto semelhante à casca de laranja, inclusive no mamilo (INCA, 2014a). O nódulo (caroço) no seio, acompanhado ou não de dor mamária, é o sintoma mais comum da doença e está relacionado diretamente com o desenvolvimento e o tamanho de tumores sólidos. Estes nódulos são normalmente palpáveis e passíveis de surgimento também nas axilas (ACS, 2014a). O exame clínico das mamas, quando realizado por profissional treinado, pode detectar tumores superficiais de até 1 cm (INCA, 2014a). Além do exame clínico e auto exame das mamas, o diagnóstico de confirmação do câncer de mama deve ser realizado de diferentes maneiras, como mamografia, ultrassom e ressonância magnética por imagem (ACS, 2014a). A mamografia permite a detecção precoce do câncer ao mostrar lesões em fase inicial muito pequenas. Deve ser realizada a cada dois anos, por mulheres entre 50 e 69 anos ou segundo recomendação médica (INCA, 2014b). Quando se observa presença de nódulos através da mamografia, a biopsia é realizada para determinar a malignidade do tumor e o tratamento adequado, podendo reduzir a mortalidade em 20 a 30% em mulheres acima dos 50 anos (IARC, 2008).

2.1.3. Classificação Histológica do Câncer de Mama

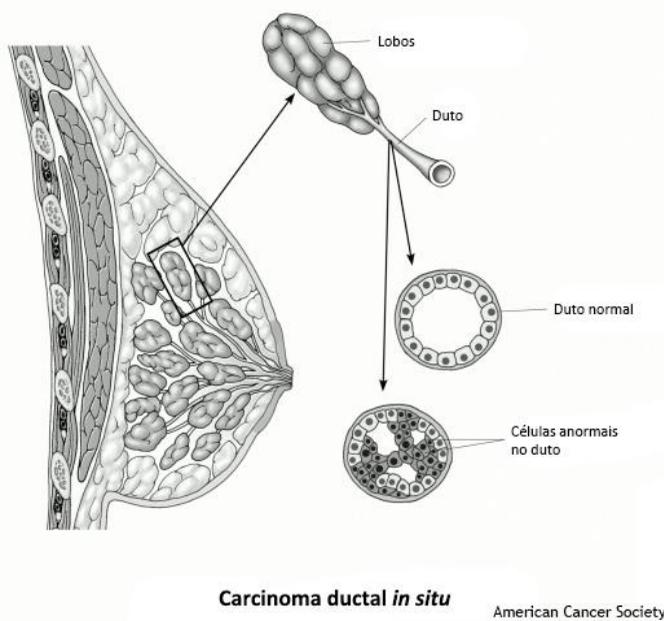
O câncer de mama pode ser classificado considerando aspectos morfológicos e histológicos ou ainda baseado nas características moleculares, como a expressão de marcadores tumorais (LI *et al.*, 2005).

A maioria dos cânceres de mama são classificados como carcinomas de mama (tipo de câncer que se inicia no tecido glandular). A classificação histológica compreende principalmente o carcinoma ductal e lobular *in situ*, e o carcinoma ductal e lobular invasivo (ONCOGUIA, 2014).

O carcinoma ductal *in situ*, também conhecido como carcinoma intraductal, é considerado não invasivo. A diferenciação celular ocorre no duto do leite da mama como descrito na Figura 1. A diferença entre este tipo de câncer e o carcinoma ductal invasivo, é

que as células tumorais não se espalham através dos dutos para o tecido mamário adjacente. É considerado um pré-câncer, pois em alguns casos pode se tornar um câncer invasivo.

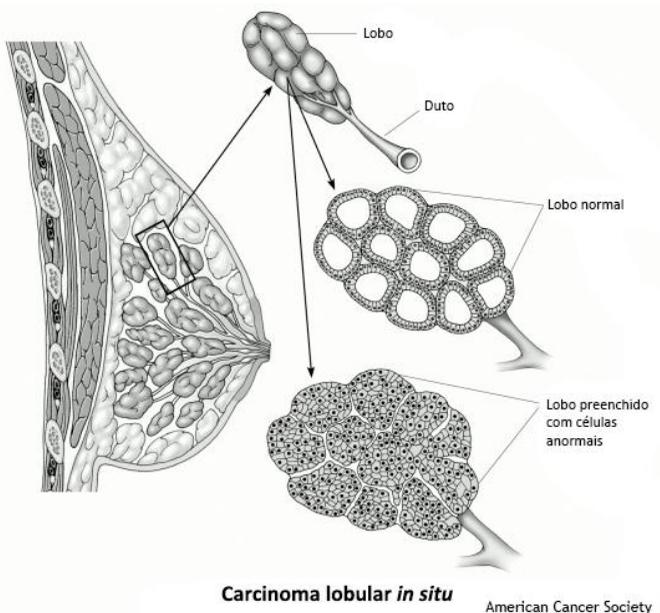
Figura 1: Carcinoma ductal *in situ*



Adaptado de American Cancer Society (ACS, 2014b)

. No carcinoma lobular *in situ* as células tumorais crescem nos lobos das glândulas produtoras de leite como apresentado na Figura 2 (ACS, 2014b).

Figura 2: Carcinoma lobular *in situ*



Adaptado de American Cancer Society (ACS, 2014b)

O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum de câncer de mama. Inicia-se no duto de leite atingindo o tecido mamário adiposo. A partir deste ponto, as células de câncer podem se espalhar para outras partes do corpo desenvolvendo a metástase. O carcinoma lobular invasivo inicia-se nas glândulas produtoras de leite chamadas de lobos. Assim como o carcinoma ductal invasivo, também pode atingir o tecido mamário adjacente e desenvolver metástase. Este tipo de carcinoma corresponde a cerca de 15% dos casos de câncer de mama, enquanto o carcinoma ductal invasivo corresponde em torno de 75%.

2.1.4. Classificação Molecular do Câncer de Mama

Com o avanço dos estudos moleculares no câncer de mama, a classificação baseada na expressão de hormônios e proteínas passou a ser utilizada. A presença ou ausência de receptores de estrogênio e progesterona (ER e PR positivos/negativos), e a superexpressão de uma das moléculas da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, chamada de HER2, passou a ser relevante para o

tratamento e o prognóstico de pacientes de câncer de mama (VIEIRA *et al.*, 2008). Os principais subtipos nesta classificação são: Luminal A (ER+ e/ou PR+, e HER2 negativo); Luminal B (ER+ e/ou PR+, e HER2 positivo) e por fim, Triplo Negativo (ER-, PR – e HER2 negativo) (SCHNITT, 2010).

Os tipos de câncer de mama que apresentam expressão dos receptores hormonais normalmente desenvolvem bom prognóstico, uma vez que são menos invasivos e respondem bem ao tratamento (BOSWELL *et al.*, 2012). O prooncogene HER-2 tem papel importante na regulação e diferenciação celular, é encontrado em células normais, mas apresenta-se superexpresso em alguns carcinomas de mama. O subtipo Luminal B, apresenta superexpressão dos receptores HER2, sendo responsável por 15-20% dos tumores de mama associados aos piores prognósticos por ser altamente invasivo. No entanto este subtipo apresenta tratamento específico anti-HER2 (SAINI *et al.*, 2011). O câncer de mama triplo negativo é o mais agressivo, sendo altamente invasivo aumentando os riscos de metástase. Além disso, não há tratamento eficaz específico contra este subtipo de câncer (SCHNITT, 2010; SANTOS *et al.*, 2015).

2.1.5. Tratamento do câncer de mama

Em geral, o tratamento contra o câncer é frequentemente realizado com mais de uma abordagem e está intimamente relacionado com o tipo de câncer e a progressão do tumor (MAIRA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2015). No caso do câncer de mama, este é dividido em dois tipos: 1) o tratamento local, que compreende a cirurgia e a radioterapia, e; 2) o tratamento sistêmico, que compreende a quimioterapia, a hormonioterapia e a terapia biológica ou imunoterapia (INCA, 2014c).

A cirurgia pode ser conservadora, com a retirada apenas do tumor ou parte da mama, ou pode ser realizada a mastectomia, com a retirada total da mama. Embora seja um método invasivo, a retirada física do nódulo é ainda hoje a principal forma de controle da progressão da doença, proporcionando maior sobrevida ao paciente (LEE *et al.*, 2012). O tratamento com quimioterápicos ou com radioterapia é frequente após a remoção cirúrgica devido à dificuldade clínica de identificação exata do limite entre o tumor ou

células tumorais presentes no tecido e as células normais, prevenindo complicações como a metástase (MAIRA *et al.*, 2007).

Na radioterapia são utilizados feixes de radiação ionizante para eliminar ou reduzir o tumor. Esta radiação danifica o DNA das células tumorais, inibindo a capacidade de se dividir e proliferar (CORN, 2004). É frequente a aplicação de radioterapia após a cirurgia na tentativa de reduzir as chances de recidiva do tumor para as mamas ou linfonodos (INCA, 2014c).

A quimioterapia, por sua vez, é uma terapia sistêmica em que são utilizados agentes de baixo peso molecular para destruir rapidamente as células em divisão. O mecanismo de ação destes quimioterápicos varia desde a interação com o DNA para bloquear a replicação até a paralisação dos componentes das vias de transdução de sinais (MAIRA *et al.*, 2007). Tanto a radioterapia como a quimioterapia são eficazes induzindo a morte das células tumorais, porém danificam os tecidos saudáveis e podem levar a diminuição da qualidade de vida do paciente bem como a intoxicações mais severas (GUO *et al.*, 2011).

A hormonioterapia é uma forma de terapia sistêmica utilizada para o tratamento do câncer de mama que apresenta alta expressão de receptores de estrogênio e de progesterona (ER+ e PR+). Entre os fármacos mais utilizados, o tamoxifeno é amplamente utilizado no Brasil e atua inibindo a ligação estrogênio-receptor (BOSWELL *et al.*, 2012).

Finalmente, a terapia biológica ou imunoterapia é um tipo de tratamento mais recente, sendo utilizado para tumores tipo HER-2 positivos. Trata-se do trastuzumabe (Herceptin®, Roche Ltd.), um anticorpo monoclonal anti-HER2 (LARSEN *et al.*, 2013).

Apesar dos diferentes tratamentos existentes para o câncer de mama, estes ainda causam uma série de efeitos adversos indesejados. O conhecimento dos eventos moleculares que levam à formação do tumor, invasão, angiogênese e metástase sugere uma nova abordagem para terapia oncológica: a terapia-alvo (ABOU-JAWDE *et al.*, 2003). A lógica deste tratamento prevê que inibidores específicos de proteínas envolvidas nos mecanismos de sinalização interfiram na progressão do câncer, alterando o curso natural da doença e evitando danos aos tecidos normais (MAIRA *et al.*, 2007). Neste contexto, com o avanço do entendimento da genética do câncer e a identificação de genes alvos, a aplicação do efeito de RNA de interferência (RNAi) apresenta-se como alternativa viável para a melhora do prognóstico.

2.2. RNA de Interferência e *small interfering RNA* (siRNA)

O efeito de RNA de interferência (RNAi) possibilita o controle da produção de proteínas através da interferência na expressão de genes endógenos (HANNON, 2002). O mecanismo de interferência foi primeiramente descrito por Craig Mello e Andrew Fire em 1998 (FIRE *et al.*, 1998). Estes pesquisadores verificaram a interferência na expressão gênica de maneira sequência-específica através da introdução de uma dupla fita de RNA exógeno em *C. elegans*, valendo-lhes o Prêmio Nobel de Medicina de 2006.

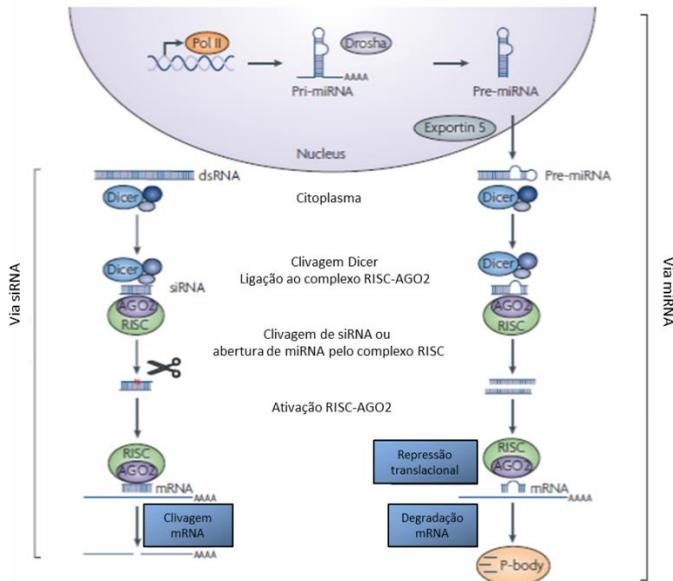
O mecanismo de RNAi é desencadeado pela presença de longas cadeias de RNA de fita dupla (dsRNA) que são clivadas em fragmentos de dupla fita menores chamados de siRNA através da enzima Dicer (HANNON, 2002). Os siRNAs formados são incorporados ao complexo proteico chamado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) que apresenta a proteína denominada Argonauta 2 (AGO2) responsável pela separação da dupla fita de siRNA (MATRANGA *et al.*, 2005). A fita antisense (fita guia) ativa o complexo RISC enquanto a fita senso é clivada no citoplasma celular. O complexo RISC ativado, procura e degrada a sequência complementar à fita antisense do siRNA no mRNA, inibindo a produção da proteína codificada por aquele mRNA. A clivagem do mRNA ocorre na posição dos nucleotídeos 10 e 11 da fita complementar antisense, relativo à porção 5' terminal (RAND *et al.*, 2005). O complexo RISC irá continuar a procurar por mRNA alvos adicionais, o que aumenta a eficiência do silenciamento gênico (HUTVAGNER e ZAMORE, 2002).

Como forma endógena de controle pós-transcricional, o efeito de RNAi ocorre naturalmente em todas as células através de microRNAs (miRNA). Os miRNAs são pequenos RNAs derivados de um pareamento imperfeito de estruturas em forma de grampo (*hairpin*) não codificantes de RNA que são naturalmente transcritas pelo genoma (MEISTER e TUSCHL, 2004).

A biogênese dos miRNAs inicia quando estes são transcritos pela polimerase II formando os miRNAs primários (pri-miRNA) (LEE *et al.*, 2004). Ainda no núcleo os pri-miRNAs são processados pela enzima RNase III (Drosha) para produzir o pré-miRNA (70-100 nucleotídeos) que é exportado para o citoplasma pelo fator nuclear de exportação (exportina-5). O pré-miRNA é processado em 19-24

nucleotídeos pela enzima Dicer resultando em um miRNA maduro de dupla fita (BORCHERT *et al.*, 2006). Uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo RISC onde pode regular a expressão dos RNAs mensageiros. A outra fita geralmente é degradada (HU *et al.*, 2009). A Figura 3 representa a via de RNAi em células de mamíferos.

Figura 3: Via de RNAi em células de mamíferos

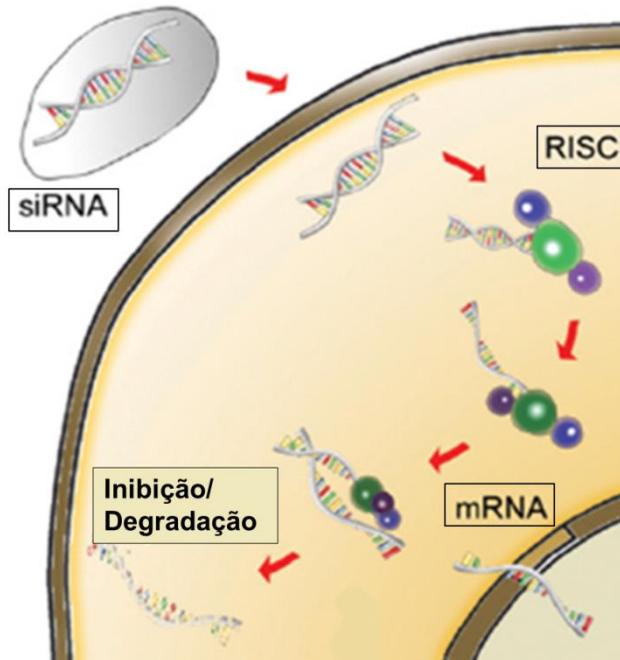


Adaptado de DE FOUGEROLLES *et al.* (2007)

Elbashir e colaboradores demonstraram a mesma capacidade de silenciamento de genes em células de mamíferos utilizando sequências sintéticas de siRNA (ELBASHIR *et al.*, 2001). O siRNA apresenta estrutura de dupla fita de RNA com 19-25 nucleotídeos no comprimento, apresentando 2 nucleotídeos não pareados na porção 3' terminal (HANNON, 2002). O siRNA promove o silenciamento gênico através da clivagem de uma sequência complementar específica de um RNA mensageiro (mRNA). A via do silenciamento através do siRNA sintético envolve a entrega de moléculas exógenas de siRNA no citoplasma celular, evitando a etapa da Dicer no

mecanismo de RNAi, sendo diretamente ligado ao complexo RISC-AGO2 quando no interior do citoplasma celular. Desta forma, a utilização de siRNAs sintéticos diminuem as chances de interferência com a regulação gênica natural que ocorre a partir de miRNAs (GRIMM *et al.*, 2006). A Figura 4 demonstra a via de silenciamento a partir de siRNA sintéticos.

Figura 4: Via do silenciamento gênico em células eucarióticas através de siRNA



Adaptado de MONAGHAN e PANDIT (2011).

Vários estudos vêm sendo realizados para o uso do efeito de RNAi no tratamento do câncer (PITTELLA *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014). Segundo estes autores, a compreensão dos mecanismos genéticos do câncer facilita a identificação dos genes chaves que iniciam e regulam a progressão da doença. Os alvos terapêuticos incluem genes envolvidos nas vias da oncogênese, apoptose, regulação do ciclo e senescência celular, interação tumor-hospedeiro, e resistência às terapias convencionais. Alguns destes estudos demonstram a eficácia da terapia com RNA de interferência,

contribuindo para o avanço dos ensaios clínicos. O primeiro ensaio clínico com siRNA para o tratamento do câncer (programa CALAA-01) foi conduzido por Davis e colaboradores e tem como alvo a subunidade M2 da ribonucleotídeo redutase (RRM2) para inibição do crescimento de tumores sólidos. Os autores demonstraram a redução nos níveis de mRNA e da proteína RRM2 após tratamento sistêmico dos pacientes (DAVIS *et al.*, 2010). Pittella e colaboradores (2012) também demonstraram a eficácia da utilização da terapia com siRNA pela diminuição da expressão do gene VEGF. Os resultados demonstraram redução na codificação da proteína e consequente diminuição do tamanho tumoral *in vivo*. Este trabalho está atualmente em ensaio clínico de Fase II para o tratamento do câncer de pâncreas em terapia chamada anti-angiogênica.

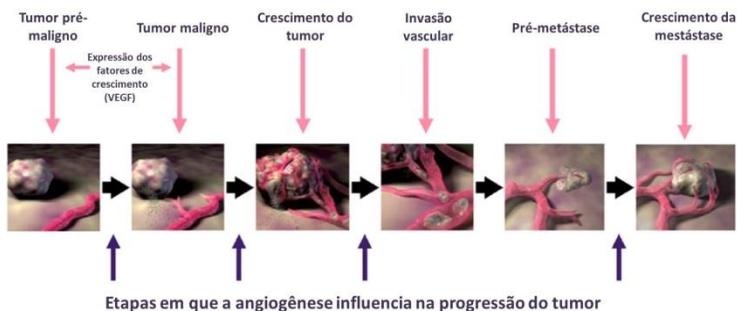
2.3. Terapia Anti-angiogênica

A angiogênese é um processo complexo e dinâmico, responsável pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Durante o desenvolvimento embrionário e em processos fisiológicos normais como a cicatrização de feridas e ciclo menstrual, a angiogênese é regulada por inibidores e ativadores endógenos (SULLIVAN e BREKKEN, 2010). Embora a angiogênese participe dos processos fisiológicos normais, também está envolvida em condições patológicas como crescimento tumoral, progressão e metástases (HICKLIN e ELLIS, 2005), sendo importante para o suprimento de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento e hormônios, enzimas proteolíticas, fatores hemostáticos que controlam a coagulação e o sistema fibrinolítico (FIDLER e ELLIS, 1994).

A regulação da angiogênese é realizada a partir de fatores específicos que ativam ou inibem a formação de novos vasos. É iniciada quando ocorre a predominância da expressão de fatores ativadores, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e os fatores de crescimento transformador alfa e beta (TGF- α e TGF- β) (DREVS, 2008). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é a principal proteína que promove a angiogênese, e estando superexpressa em células tumorais, se torna um alvo interessante para silenciamento genético. É um fator importante para a sobrevivência das células endoteliais, potente mitógeno, e ainda importante na permeabilidade vascular e

migração das células endoteliais progenitoras da medula óssea (NAGY *et al.*, 2009). A Figura 5 demonstra a influência da angiogênese na progressão do tumor e possível metástase. Em teoria, com a ausência de novos vasos sanguíneos para fornecer suprimentos ao tumor, as células tumorais não seriam capazes de proliferar, resultando no controle do crescimento tumoral, em estratégia chamada anti-angiogênica (WYSOCKI *et al.*, 2002).

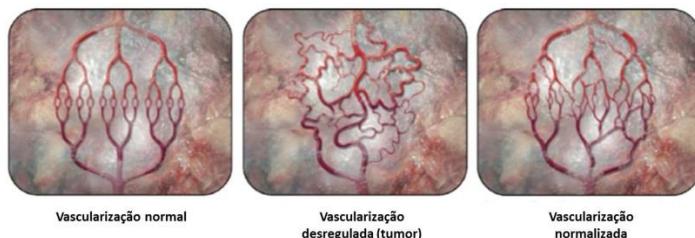
Figura 5: Angiogênese na progressão do tumor



Adaptado de DREVS (2008)

O anticorpo monoclonal recombinante humanizado bevacizumab (Avastin®, Genentech Inc.) foi o primeiro medicamento aprovado pelo FDA para uso na terapia anti-angiogênica para tratamento no câncer (SULLIVAN e BREKKEN, 2010). O Avastin® liga-se ao VEGF, inibindo desta forma a ligação deste aos seus receptores (VEGFR-1 e 2) na superfície das células endoteliais. O bloqueio da atividade biológica do VEGF regride a vascularização tumoral, normaliza a vasculatura remanescente do tumor e inibe a formação de novos vasos, inibindo assim o crescimento tumoral, como demonstrado na Figura 6 (MACKKEY *et al.*, 2012; GENENTECH, 2015).

Figura 6: Vascularização após terapia anti-angiogênica

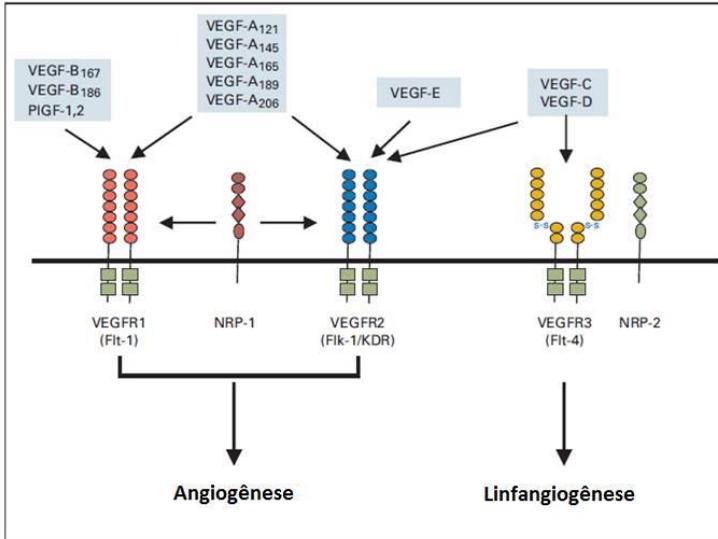


Adaptado de DREVS (2008)

2.4. Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é a proteína que promove a angiogênese. O VEGF compreende uma família de proteínas que são chaves na regulação normal e tumoral da angiogênese (SULLIVAN e BREKKEN, 2010). A família de genes do VEGF expressam 7 glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e o fator de crescimento placentário (PlGF) 1 e 2 (HICKLIN e ELLIS, 2005) (Figura 7). VEGF-A e VEGF-B apresentam diversas isoformas com diferentes números de aminoácidos. No entanto, o mais comum expresso em tumores sólidos é a isoforma 165 (VEGF-A165), que se liga ao receptor VEGF tipo 2 (VEGFR-2) e medeia a maioria dos efeitos da angiogênese, como permeabilidade microvascular, proliferação de células endoteliais, invasão, migração e sobrevivência do tumor (ZENG *et al.*, 2001).

Figura 7: Ligação específica dos membros da família VEGF e seus receptores



Adaptado de HICKLIN e ELLIS (2005)

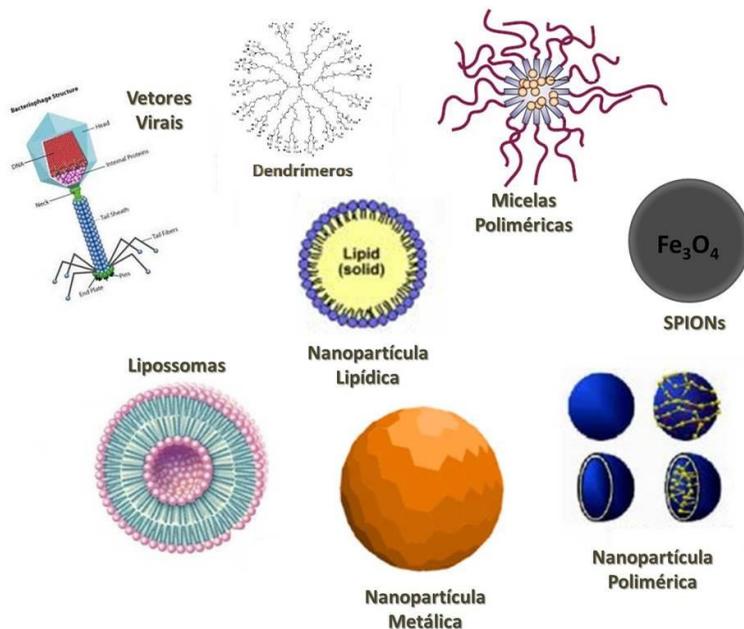
De fato, o efeito anti-angiogênico obtido através de RNAi, tendo como alvo o VEGF, tem se mostrado promissor para a potencial aplicação contra o câncer (HAYES *et al.*, 2007; PITTELLA *et al.*, 2011; PITTELLA *et al.*, 2012). No entanto, para que o efeito de RNAi seja eficiente, a entrega segura de siRNA no citoplasma da célula tumoral – local de ação – tem sido o maior desafio na sua aplicação para a terapia. Isto ocorre porque as moléculas de siRNA sem proteção são susceptíveis a degradação no organismo por RNases, e por possuir um grande tamanho (13kDa) e cargas negativas, a penetração através da membrana celular é impedida (GUO *et al.*, 2011; PITTELLA *et al.*, 2012). Desta maneira, como forma de alcançar-se o efeito terapêutico do siRNA, poderão ser utilizados sistemas nanocarreadores para a proteção e transporte ao interior da célula.

2.5. Nanocarreadores para a entrega de siRNA

Os principais sistemas nanocarreadores são classificados em vetores virais e vetores não virais (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Devido à habilidade natural dos vírus em entregar material genético para as células, estes têm sido explorados para a

entrega de nucleotídeos terapêuticos (THOMAS *et al.*, 2003). Entretanto, a dificuldade de produção em larga escala e problemas citotóxicos e imunogênicos observados em estudos clínicos limitam o uso destes vetores, tornando as abordagens sintéticas (não virais) mais seguras (TOMANIN e SCARPA, 2004).

Figura 8: Exemplos de sistemas nanocarreadores



Os vetores não-virais compreendem nanopartículas lipídicas, lipossomas, nanopartículas metálicas, nanopartículas inorgânicas, dendrimeros e micelas poliméricas, entre outros (GUO *et al.*, 2011).

Lipossomas se formam a partir da capacidade que certos lipídeos anfífilos têm em formar vesículas constituídas por uma bicamada lipídica em meio aquoso (TORCHILIN, 2005). Nanopartículas lipídicas também apresentam como principal constituinte lipídeos biodegradáveis. Ambos os sistemas vêm sendo amplamente estudados como potenciais agentes de transfecção (TAM *et al.*, 2013; SAFINYA *et al.*, 2014; BOCHICCHIO *et al.*, 2015). No entanto, a segurança destes sistemas permanece incerta. Alguns sistemas que possuem como principal constituinte lipídios,

apresentaram toxicidade *in vitro* e *in vivo*, introduzindo dúvidas quanto ao uso como agentes terapêuticos, pelo menos sem estudos adicionais (LV *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012).

Por outro lado, as partículas poliméricas têm sido amplamente estudadas através da utilização de polímeros biodegradáveis para formação de micelas, encapsulando materiais para terapia de diferentes doenças (PATIL e PANYAM, 2009). A cadeia polimérica pode funcionar como ativo ou, na maioria dos casos, apenas como componente estrutural inerte. Ácidos nucleicos são facilmente complexados com polímeros catiônicos sintéticos, favorecendo a utilização destes sistemas como agentes de transfecção (KESHARWANI *et al.*, 2012). Além disso, polímeros para modificação na superfície de nanocarreadores têm sido amplamente utilizados na otimização *in vivo* destes sistemas (SUH *et al.*, 2007). A peguilação consiste em uma estratégia para modificação superficial através da utilização de polietilenoglicol (PEG) como polímero de revestimento (PERRY *et al.*, 2012). O efeito protetor do PEG deve-se a formação de uma camada densa e hidratada de cadeias longas e flexíveis na superfície da partícula coloidal (JORALEMON *et al.*, 2010), melhorando a estabilidade biológica das partículas e diminuindo interações não específicas com biomacromoléculas no sangue (MOGHIMI *et al.*, 2001; MIYATA *et al.*, 2011)

Dendrímeros consistem em uma classe de macromoléculas sintéticas monodispersas altamente ramificadas com estrutura nanométrica e composição bem definida (KESHARWANI *et al.*, 2012). São construídos a partir de uma série de ramificações ao redor de um núcleo interno, gerando uma estrutura ramificada precisa e única. A estrutura distinta em forma de estrela dos dendrímeros permite a incorporação de moléculas, seja no interior da estrutura ou ainda ligados aos grupos funcionais externalizados (SHEN e SHI, 2010). Podem ser combinados com nanopartículas inorgânicas, como por exemplo nanopartículas de óxido de ferro, formando sistemas híbridos. Sendo assim, são potenciais agentes de entrega de fármacos e ácidos nucleicos, bem como agente de contraste para exames de imagem por ressonância magnética (PALEOS *et al.*, 2010; OPINA *et al.*, 2014).

As nanopartículas inorgânicas apresentam vantagens em relação as orgânicas uma vez que estão menos susceptíveis a microrganismos e apresentam excelente estabilidade física (KORNBERG, 1995). Neste contexto, as partículas de cerâmica, como por exemplo, as nanopartículas de fosfato de cálcio (CaP), são

sistemas inorgânicos facilmente sintetizados em água com tamanho e porosidade desejadas (KAKIZAWA *et al.*, 2004). As nanopartículas de CaP apresentam-se altamente eficientes como sistemas carreadores devido as suas características químicas e estruturais (USKOKOVIC e USKOKOVIC, 2011). Estas podem ser designadas para promoverem afinidade a compostos aniônicos, estabilidade no espaço extracelular, endocitose eficaz, dissolução e escape do endossomo e liberação gradual no citoplasma das células alvo (PITTELLA *et al.*, 2012).

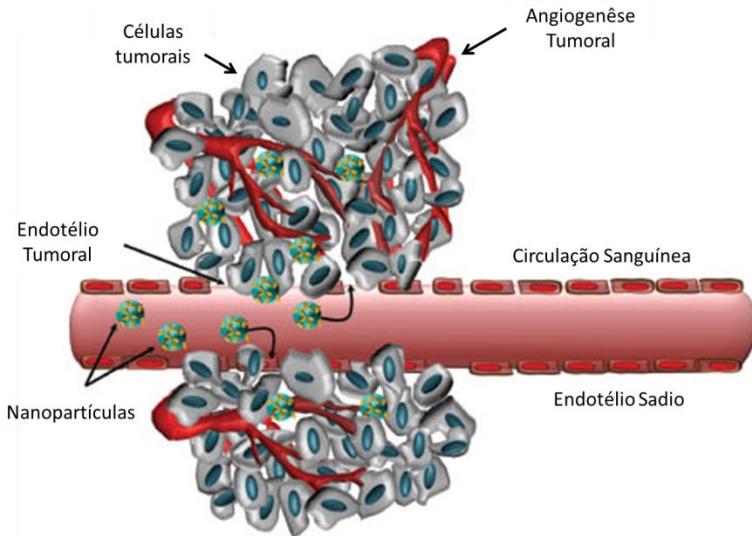
Ainda no contexto de nanopartículas inorgânicas, modificações estruturais na superfície de nanopartículas metálicas como ouro, prata e óxidos de ferro podem ser realizadas para permitir a incorporação de ácidos nucleicos e assim favorecer o uso em aplicações biomédicas (PARETA *et al.*, 2008; MAHMOUDI *et al.*, 2011). Dentre estes sistemas, as nanopartículas de óxido de ferro, também chamadas de SPIONs, apresentam maior biocompatibilidade entre os materiais magnéticos. São facilmente sintetizadas através de química verde e são economicamente viáveis, devido a presença de diversos óxidos de ferro na natureza (COLE *et al.*, 2011).

No entanto, para a entrega bem sucedida de ácidos nucleicos no citoplasma celular, é necessário um nanocarreador capaz de desenvolver múltiplas funções em diferentes ambientes fisiológicos (ZHANG *et al.*, 2014).

2.6. Acumulação passiva e ativa nas células e tecidos alvos

Tendo em vista a aplicação sistêmica através da via endovenosa, nanocarreadores podem acumular-se em tumores através de mecanismos passivos ou ativos (PITTELLA e KATAOKA, 2013). Devido á rápida formação de novos vasos sanguíneos pelo tumor, o endotélio destes vasos forma-se de maneira desorganizada, consequentemente permeáveis o suficiente para permitir a passagem de partículas nanométricas da corrente sanguínea para o tumor. Este fenômeno é chamado de efeito de aumento da permeabilidade e retenção (EPR), do inglês *Enhanced Permeability and Retention Effect* (Figura 9), permitindo a acumulação passiva de nanocarreadores de longa circulação sanguínea no tecido tumoral (MATSUMURA e MAEDA, 1986).

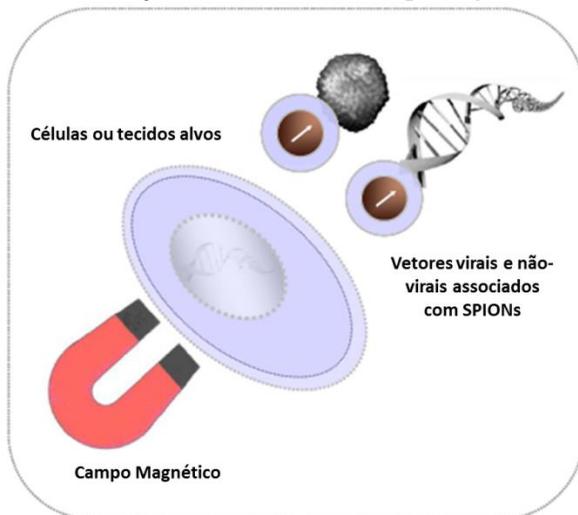
Figura 9: Acumulação passiva através do efeito EPR



Adaptado de KOZLOVA e EPPLE (2013)

Ao contrário da acumulação passiva, a acumulação ativa é obtida entre outras formas com a inserção de ligantes específicos para receptores tumorais superexpressos (SUN *et al.*, 2008). Considerando a dificuldade em entregar ácidos nucleicos ao local de ação, o uso de nanopartículas de óxido de ferro para vetorizar o transporte de siRNA apresenta-se como solução para acumulação ativa, uma vez que estas partículas apresentam propriedades magnéticas, podendo ser direcionadas quanto a entrega do siRNA para o tumor através da aplicação de um campo magnético externo (Figura 10) (MYKHAYLYK *et al.*, 2007; PLANK *et al.*, 2011).

Figura 10: Acumulação ativa através de campo magnético



Adaptado de PLANK *et al.* (2011)

2.7. Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas (SPIONs)

As nanopartículas de óxidos de ferro, cujas principais formas cristalinas são magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), têm sido intensamente estudadas em sistemas biológicos e apresentam potencial uso em diversas aplicações, devido, em parte, a biocompatibilidade e especificidade destas estruturas. A característica magnética inerente destes sistemas consiste em uma grande vantagem de utilização, uma vez que é possível a manipulação dos carreadores através da utilização de um campo magnético. Assim, novas aplicações destes materiais vem sendo exploradas na área biomédica: separações magnéticas *in vitro* tanto de células como de biomoléculas, aplicação como sistemas nanocarreadores, destruição *in situ* de células tumorais pelo fenômeno de hipertermia e atuação como agentes de contraste (LAURENT *et al.*, 2014). Estes materiais são também chamados de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnética (SPIONs), e podem ser assim denominadas pois seu potencial de magnetização é superparamagnético, ou seja, somente apresentam magnetização quando em presença de um campo magnético (SALADO *et al.*, 2012).

O uso de nanopartículas magnéticas para carrear ácidos nucleicos ao interior de células é denominado de magnetofecção, e vem sendo amplamente estudado como forma de aumentar a eficiência na entrega destas moléculas (PLANK *et al.*, 2011). No entanto, o uso potencial em aplicações biomédicas apresenta algumas restrições: para a magnetofecção ser eficaz, é necessário nanopartículas com valores elevados de magnetização, tamanho abaixo dos 100 nm (permitindo também a acumulação passiva), com uma distribuição de tamanho estreita e estabilidade coloidal em condições fisiológicas (MAHMOUDI *et al.*, 2011). Dos óxidos de ferro, a magnetita apresenta características importantes para a aplicação na área biomédica, como baixa toxicidade e alta magnetização de saturação. Contudo, as nanopartículas de magnetita têm problemas de estabilidade significativas em condições fisiológicas (pH e força iônica), em que tendem a aglomerar-se ou a sofrer oxidação na superfície, reduzindo a eficiência da formulação (SALADO *et al.*, 2012).

Neste contexto, é preciso realizar o revestimento biocompatível na superfície das nanopartículas de óxido de ferro. Entre as diversas opções de materiais para revestimento das magnetitas, o CaP surge como alternativa biocompatível viável para compor o sistema multifuncional. Este sal inorgânico é capaz de adsorver moléculas carregadas negativamente, sendo adequado para carrear ácidos nucleicos (TANG *et al.*, 2014).

2.8. Fosfato de Cálcio (CaP)

O fosfato de cálcio é o principal componente mineral de ossos e dentes. Por apresentar elevada biocompatibilidade e baixa toxicidade, vêm sendo amplamente estudado para aplicações biomédicas, como candidatos de implantes dentários e de ossos, de sistemas de entrega de fármacos e de agentes de diagnóstico (ZHANG e KATAOKA, 2009).

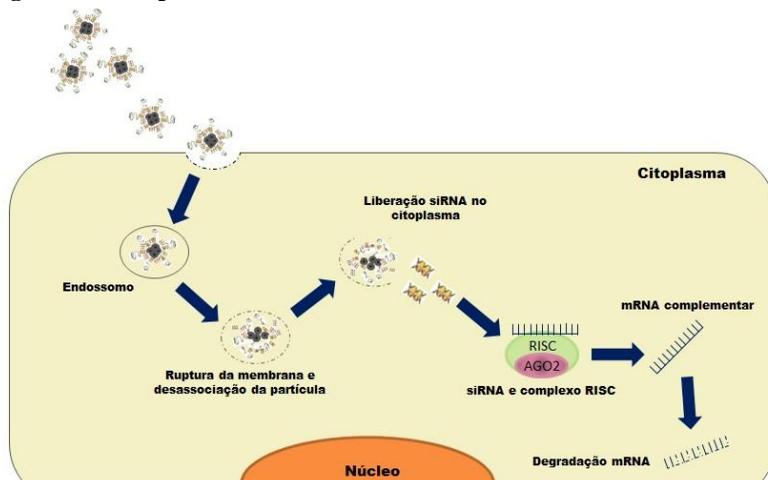
O fosfato de cálcio pode apresentar diferentes estruturas cristalinas dependentes das condições estequiométricas e das condições de formação dos cristais, como por exemplo, o pH. A forma cristalina mais frequente é a hidroxiapatita (HAP), que representa a forma mais estável entre os cristais apresentando razão molar Ca/P de 1,67 (USKOKOVIC e USKOKOVIC, 2011). Após a precipitação de íons cálcio e fosfato em condições estequiométricas,

cristais de HAP com tamanho em escala nanométrica são formados através de pontos de nucleação seguido do crescimento do cristal (KAKIZAWA *et al.*, 2004).

Este sal inorgânico é capaz de adsorver moléculas carregadas negativamente, sendo adequado para carrear ácidos nucleicos. Adicionalmente, a camada de CaP fornece elevada biocompatibilidade ao sistema, uma vez que o fosfato de cálcio é constituinte natural do organismo humano (LEE *et al.*, 2014).

Além de proteger o núcleo magnético de oxidações na superfície, o revestimento com íons cálcio e fosfato favorecerá a liberação controlada em compartimentos celulares. Após a internalização dos nanocarreadores ao endossomo celular, o pH ácido do meio favorece a dissolução do fosfato de cálcio. A elevada concentração de íons cálcio presente promove o intenso influxo de íons e água para o interior do endossomo. Com o aumento da pressão osmótica, ocorre a ruptura da membrana endossomal liberando o ácido nucléico incorporado, ocorrendo de forma similar ao efeito de “esponja de prótons” (Figura 11) (HUBBELL, 2003; PITTELLA *et al.*, 2011).

Figura 11: Escape endossomal de nanocarreadores



Fonte próprio autor

No entanto, após a mistura de soluções contendo íons de cálcio e fosfato, os cristais formados tendem a crescer rapidamente, formando grandes precipitados que inviabilizam o uso em aplicações

biomédicas (PITTELLA *et al.*, 2011). O uso de blocos de copolímeros, em que um dos blocos é hidrofílico e o outro tem característica polianiônica, permite o controle do crescimento dos cristais através da ligação entre o bloco polianiônico com o cristal carregado positivamente. Mais especificamente, o uso de um bloco de copolímero polietilenoglicol-bloco-poli (ácido aspártico) (PEG-PAsp) evita o rápido crescimento dos cristais, possibilitando a obtenção de nanopartículas com revestimento e tamanho apropriado (KAKIZAWA *et al.*, 2004).

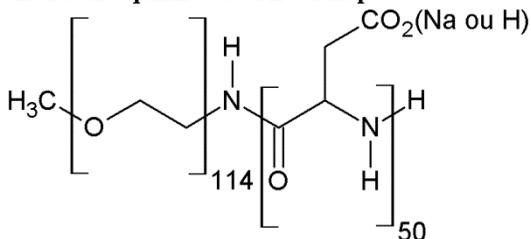
2.9. Bloco de copolímero poli (etileno glicol) -bloco- poli aspartato [PEG-PAsp]

Muitos estudos utilizam blocos de copolímeros como estratégia para aumentar a estabilidade coloidal, bem como o tempo de circulação sanguínea *in vivo* de sistemas nanocarreadores (MOGHIMI *et al.*, 2001; PERRY *et al.*, 2012). Para a estabilização das nanopartículas contendo fosfato de cálcio, pode ser utilizado blocos de copolímero em que um dos blocos seja carregado negativamente, como o polietilenoglicol-bloco-poli aspartato (PAsp). A característica polianiônica do bloco de poliaspartato permite sua incorporação ao fosfato de cálcio (XING *et al.*, 2011). Além disso, o bloco de poliaspartato é altamente biocompatível e biodegradável, sendo utilizado em diversos estudos para o recobrimento de sistemas nanoparticulados (JANA *et al.*, 2010).

A utilização da molécula hidrofílica e não-iônica de polietilenoglicol (PEG), determina o complexo na escala nanométrica uma vez que os blocos não-iônicos de PEG não irão interagir com outros componentes do sistema, promovendo a estabilidade coloidal e a estabilidade em fluidos biológicos através da estruturação de uma camada externa hidrofílica (JORALEMON *et al.*, 2010). Além de estabilizar o crescimento do cristal de CaP, o revestimento com PEG melhora a estabilidade biológica das partículas e diminui interações não específicas com biomacromoléculas no sangue que acarretariam no rápido reconhecimento pelo sistema fagocítico (MOGHIMI *et al.*, 2001; MIYATA *et al.*, 2011). Tais características influem diretamente na farmacocinética, favorecendo a acumulação das nanopartículas em tumores sólidos também através do efeito EPR (MATSUMURA e MAEDA, 1986), em adição à vetorização para acumulação ativa pela aplicação do campo magnético. Ambos efeitos sugerem vantagens

para aplicações *in vivo*. A Figura 12 representa a estrutura química do bloco de copolímero PEG-PAsp.

Figura 12: Estrutura química do PEG-PAsp



Fonte próprio autor

Considerando a epidemiologia do câncer de mama e a importância do surgimento de novas terapias para o tratamento desta doença, este trabalho visa o desenvolvimento de um sistema nanocarreador para o uso terapêutico de siRNA com alta estabilidade coloidal, biológica e toxicidade negligenciável. O sistema será constituído por três componentes com funções distintas desde a formação da nanopartícula até a liberação controlada do siRNA no citoplasma celular e eficácia no silenciamento gênico em terapia denominada anti-angiogênica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver, preparar e testar nanopartículas magnéticas revestidas com fosfato de cálcio e PEG-PAsp, avaliando sua eficiência para entrega de siRNA em células de câncer de mama.

3.2. Objetivos Específicos

- ◆ Determinar as condições ótimas para a precipitação de fosfato de cálcio em SPIONs para o revestimento através de auto associação (*self-assembly*) em escala nanométrica;
- ◆ Desenvolver o sistema nanoparticulado (SPIONs/Fosfato de Cálcio/PEG-PAsp) contendo o siRNA;
- ◆ Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, potencial zeta, morfologia e propriedade magnética;
- ◆ Determinar a eficiência de incorporação de siRNA;
- ◆ Avaliar a estabilidade coloidal do sistema;
- ◆ Avaliar a responsividade do nanocarreador após indução de campo magnético;
- ◆ Avaliar a endocitose das nanopartículas em células de câncer de mama;
- ◆ Avaliar a viabilidade de células de câncer de mama após tratamento com o sistema nanoparticulado;
- ◆ Quantificar o silenciamento do gene VEGF em células de câncer de mama após aplicação das nanopartículas carreando siRNA complementar a VEGF.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e cultura celular

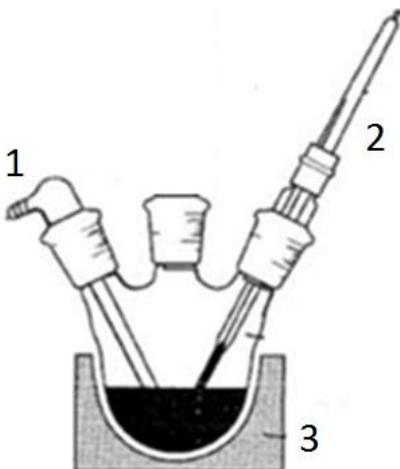
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) e TRIzol® foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NY, EUA); dimetil sulfóxido (DMSO) e fosfato de sódio dibásico foram adquiridos da Nuclear; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), cloreto de magnésio (MgCl₂), cloreto de cálcio (CaCl₂), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), foram adquiridos da Reagen (Rio de Janeiro, Brasil); etanol, metanol, clorofórmio e álcool isopropílico foram adquiridos da Merck® (Alemanha); hidróxido de sódio (NaOH), paraformaldeído e glutaraldeído foram adquiridos da Vetek (Rio de Janeiro, Brasil); tripsina, soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, Brasil); azul de trypan, brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT), o ácido N-[2-Hidroxietyl] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), cloreto de ferro II (FeCl₂) e cloreto de ferro III (FeCl₃), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) e as sequências de iniciadores (primers) para RT-PCR, bem como a sequência de siRNA foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, SP, Brasil). As sequências foram sintetizadas de acordo com o descrito por Pittella *et al.*, 2011, sendo as sequências: CCAACCGCGAGAAGATGA (β-actina senso); CCAGAGGCGTACAGGGATAG (β-actina antisenso); AGTGGTCCCAGGCTGCAC (VEGF senso) e TCCATGAACTTCACCACTTCGT (VEGF antisenso); as sequências de siVEGF são as seguintes: 5'-GGAGUACCCUGAUGAGAUC[dT][dT]-3' (senso) e 5'-GAUCUCAUCAGGGUACUCC[dT][dT]-3' (antisenso); siSCRAMBLE (siSCR) 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU[dT][dT]-3' (senso) e 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA[dT][dT]-3' (antisenso) (PITTELLA *et al.*, 2011); High Capacity cDNA Reverse Transcription kit foi adquirido da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Power SYBER-Green PCR Master Mix e Lysotracker Green DND-26 foram adquiridos da Thermo Scientific Inc (San Jose, CA, USA). O polímero poliânion polietilenoglicol -bloco- poli aspartato [PEG-PAsp] foi adquirido da Alamanda Polymers, Inc.® (Huntsville, AL, EUA). Tris foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil). Hidróxido de amônio (NH₄OH) e hidróxido de tetrametil

amônio (TMAOH) foram adquiridos de Isofar (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

4.2. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs)

Os núcleos de nanopartículas de óxidos de ferro superparamagnéticas ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) foram sintetizados em colaboração com o aluno de doutorado Jelver Sierra, utilizando-se da técnica de coprecipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} pela adição de uma base em soluções aquosas com modificações ao descrito por CHIN *et al.* (2009). Primeiramente um sistema de vácuo contendo um pHmêtro e um termômetro foi montado como ilustrado na Figura 13. Foram utilizados 0,32 moles de FeCl_2 (Fe II) (PM = 37,287 g/mol) e 0,64 moles de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe III) (PM= 270,32 g/mol) em uma solução de HCl 0,1 mol/L. Esta solução foi adicionada lentamente (fluxo: 0,5 mL/min) a um volume de 50 mL de uma solução de NH_4OH 1,5 mol/L em água ultrapura, na qual foi realizado vácuo de 300 a 600 mm Hg sob aquecimento e agitação por 45 minutos a 30°C. O procedimento inicial terminou com a lavagem dos núcleos de SPIONs com água livre de oxigênio até o pH alcançar o valor de aproximadamente 7,0. Em seguida, os núcleos de nanopartículas foram autoclavados para garantir a esterilidade do sistema. Todos os procedimentos a partir deste ponto foram realizados em fluxo laminar (SIERRA-RESTREPO, 2015).

Figura 13: Representação gráfica da célula de vácuo utilizada para a síntese de SPIONs



O esquema representa o aparato para síntese de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas, em que (1) representa a tampa para vácuo; (2) o termômetro; (3) placa de aquecimento.

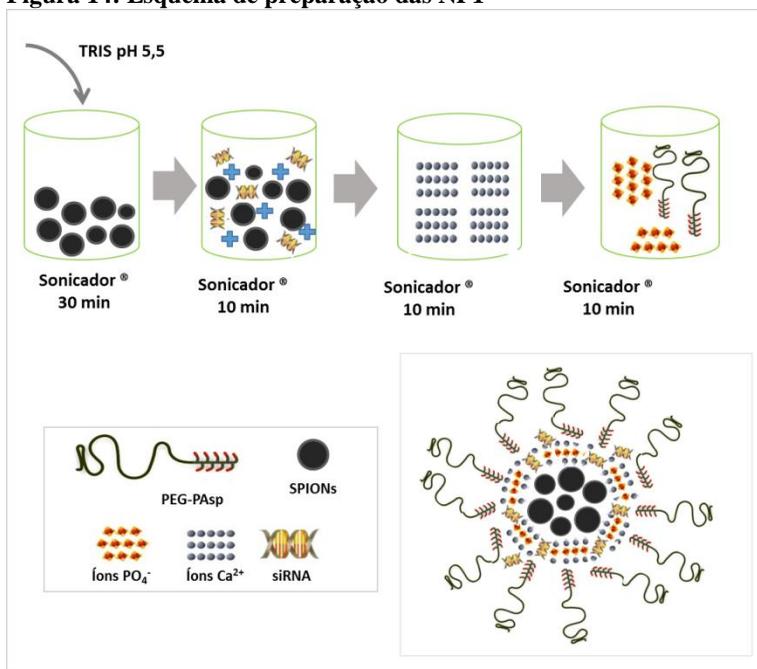
4.3. Síntese das nanopartículas

Para realizar o revestimento dos núcleos magnéticos, foram preparadas soluções de CaCl_2 2,5 M (PM = 110,98 g/mol); solução tampão Tris 10 mM pH 7,4; solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4; solução tampão HEPES 10 mM pH 7,4 e uma solução HEPES-Fosfato contendo HEPES 50 mM, Na_3PO_4 1,5 mM e NaCl 140 mM pH 7,4. O polímero PEG-PAsp (5K - 50 DP) foi diluído na solução tampão Tris-HCl em concentração de 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Sequências de siRNA foram diluídas em solução tampão HEPES 10 mM pH 7,4 na concentração de 15 μM . Além disso, foi preparada uma solução de CaCl_2 em Tris pH 10 na proporção de 1:10 (v/v). Foram preparados dois tipos de nanopartículas, denominados neste trabalho como nanopartículas 1 (NP1) e nanopartículas 2 (NP2). As etapas que utilizaram agitação ultrassônica foram realizadas com o auxílio de uma ponta de ultrassom (Vibracells, USA) em amplitude de 70% sob banho de gelo.

4.3.1. Nanopartículas 1 (NP1)

Para a preparação das camadas intermediárias e externa, primeiramente os núcleos de SPIONs foram diluídos em tampão Tris pH 5,5 (1:8 v/v) e mantidas em agitação ultrassônica por 30 minutos para diminuir a agregação entre as partículas. A suspensão de nanopartículas magnéticas em Tris pH 5,5 foram misturadas juntamente com o siRNA na proporção 1:1 (v/v) (30 μ L SPIONs pH 5,5: 30 μ l siRNA 15 μ M) sob agitação ultrassônica por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 100 μ L da solução de CaCl_2 em Tris (1:10 v/v) sob agitação por mais 10 minutos. Foi previamente preparado em frasco separado a solução HEPES-Fosfato juntamente com a solução de bloco de copolímero (PEG-PAsp 1000 μ g/mL) na proporção 3:8 (v/v). Esta mistura (80 μ L) foi adicionada a suspensão e manteve-se a agitação por 10 minutos. Desta maneira foi obtida a suspensão de nanopartículas magnéticas revestidas com fosfato de cálcio e PEG-PAsp contendo siRNA. A Figura 14 representa o esquema de formação das nanopartículas NP1.

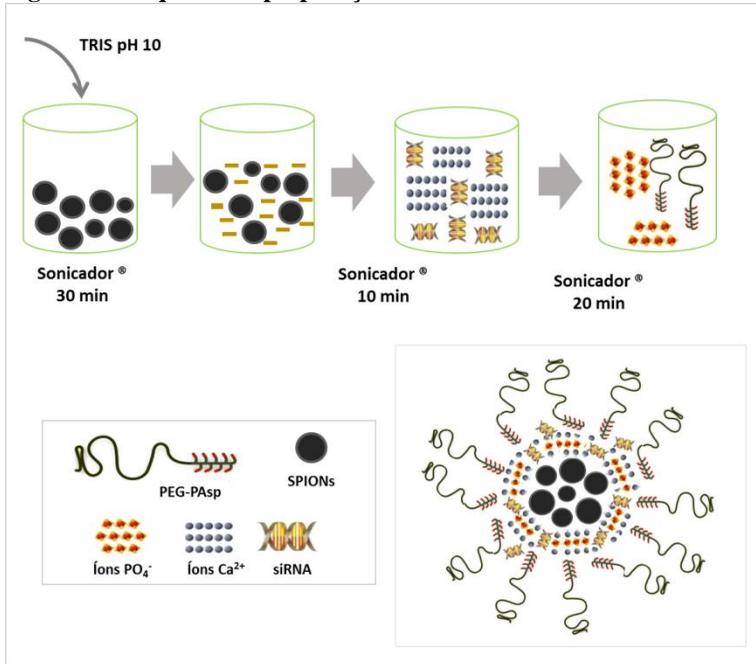
Figura 14: Esquema de preparação das NP1



4.3.2. Nanopartículas 2 (NP2)

Previamente, foram adicionados aos SPIONs tetrametil amônio (TMAOH) na proporção 1:25 (v/v) sob agitação ultrassônica por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, após esterilização das partículas, as nanopartículas de óxido de ferro foram diluídas em tampão Tris pH 10 (1:8 v/v) e mantidas sob agitação ultrassônica por 30 minutos. Em frasco separado, 100 μL da solução de CaCl_2 (1:10 v/v) foi misturado com 30 μL de siRNA. A esta mistura verteu-se 30 μL da suspensão de SPIONs em pH 10 em agitação sob ultrassom por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado 80 μL da solução HEPES-Fosfato:PEG-PAsp (3:8 v/v) e mantida a agitação ultrassônica por mais 20 minutos. Assim foi obtida a suspensão de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com fosfato de cálcio e PEG-PAsp contendo siRNA em pH 10, como representado pelo esquema de formação na Figura 15.

Figura 15: Esquema de preparação das NP2



4.4. Determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão

Após o desenvolvimento do sistema de nanopartículas, foi realizada a determinação do tamanho de partícula e índice de polidispersão por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) em ângulo de detecção de 173° com laser de He-Ne (633 nm) como laser incidente. Os dados obtidos a partir da taxa de decaimento na função de correlação de fótons foram analisados com o método cumulante para obter os diâmetros hidrodinâmicos e os índices de polidispersão (PDI) correspondentes das nanopartículas como descrito pelos autores (PITTELLA *et al.*, 2011).

4.5. Determinação da carga superficial das partículas

A carga superficial das partículas foi avaliada a partir da medida da mobilidade eletroforética por anemometria de laser Doppler num campo elétrico de 150 V/cm. A carga de superfície das nanopartículas é estimada por medidas de potencial zeta, em que as partículas movem-se na presença do campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial elétrico pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração (MALVERN). Para determinação do potencial zeta as nanopartículas foram colocadas em uma cubeta específica e as medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK).

4.6. Avaliação morfológica dos sistemas nanoparticulados

Observações dos sistemas de nanopartículas através de microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC utilizando o equipamento JEM-1011 TEM (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operado em 100 kV. As amostras foram depositadas sobre um suporte metálico de níquel (grade 200 *mesh*) com revestimento de carbono, seguido de secagem a temperatura ambiente. As grades foram mergulhadas em suspensão de nanopartículas complexadas com aproximadamente 2 μ M de siRNA. O excesso de solução foi removido com filtro de papel e secos em temperatura ambiente, seguindo imediatamente para a observação por TEM (microscopia eletrônica de transmissão).

4.7. Estudo de estabilidade coloidal

Os sistemas de nanopartículas foram estocados a baixa temperatura (4 °C) por 30 dias. Antes e após 7, 14, 21 e 28 dias, alíquotas das formulações foram retiradas e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, tamanho de partícula e índice de polidispersão por meio das medidas de DLS como descrito no item 4.4.

4.8. Estudo preliminar de liofilização das formulações

Para a preparação das amostras a serem liofilizadas, 2 ml das nanopartículas sem siRNA (brancas) foram transferidos para um

frasco com capacidade máxima de 10 ml e adicionado uma solução de dextrose a 10% (p/p). Em outro frasco repetiu-se o procedimento, porém sem a adição do açúcar. Posteriormente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido por aproximadamente 5 minutos seguido de liofilização por 24 h em Liofilizador LD 1500 (Terroni Ltda., SP, Brasil)

4.9. Avaliação da eficiência de incorporação

Para estabelecer a eficiência de incorporação os sistemas nanoparticulados foram centrifugados a $25.800 \times g$ por 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados para determinar a quantidade de siRNA não incorporado por meio da utilização do kit Quanti-iT miRNA assays (Thermo Scientific®). De acordo com o protocolo do kit, a intensidade de fluorescência aumenta linearmente à medida que o reagente fluorescente presente intercala com as bases do siRNA. Para obtenção da curva de calibração, foram preparadas soluções de siRNA em tampão Hepes pH 7.4 em concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,00; 1,25 e 1,50 μM . Primeiramente, foi preparada a solução de trabalho (reagente:tampão 1:200 v/v) e pipetados 100 μl da mesma em placa para leitura de fluorescência, seguido de 5 μl dos padrões de siRNA em diferentes concentrações e dos sobrenadantes coletados. A fluorescência foi avaliada em espectrofluorímetro (PerkinElmer® LS55, USA) com excitação/emissão máximas em 500/525 nm. A partir das medidas de fluorescência dos padrões, obteve-se a equação da reta que possibilitou a quantificação de siRNA nos sobrenadantes coletados. A porcentagem de siRNA incorporada foi calculada através da fórmula:

$$E. I\% = \frac{(\text{concentração obtida no sobrenadante})}{(\text{concentração teórica inicial})} \times 100$$

4.10. Avaliação da superfície das partículas

A avaliação da superfície dos sistemas nanoparticulados e consequentemente a presença do revestimento de CaP foi realizada através de duas técnicas capazes de caracterizar a superfície das amostras quanto à estrutura e composição química.

4.10.1. Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS)

As análises da química de superfície foram realizadas no laboratório do Prof. Dante Franceschini na Universidade Federal Fluminense, utilizando-se um espectrômetro Thermo Scientific ESCALAB 250xi. Esta técnica permite a identificação dos átomos presentes na superfície (composição) e o estado químico em que eles se encontram (WEN *et al.*, 2015). Para as análises de XPS foi utilizado o ânodo de Al (radiação monocromática $K\alpha$ - energia de 1486.6 eV e uma largura de linha típica de 0,83 eV). Para as medições de XPS, foram preparados filmes por deposição de uma gota das nanopartículas purificadas em wafers de silício limpos e, em seguida, secas ao ar. A pressão na câmara do espectrômetro foi de 7×10^{-9} mbar. As energias de passagem (*pass energy*) do analisador foram 100 e 25 eV no modo survey e no modo scan de alta resolução, respectivamente. O possível carregamento da amostra foi corrigido assumindo uma energia de ligação constante de 285 eV para o pico relativo ao orbital C 1s do carbono adventício. Todos os picos foram ajustados usando curvas de Gauss-Lorentz (GL30) após a remoção de elétrons de fundo, utilizando o método de Shirley.

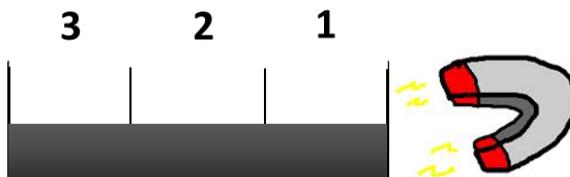
4.10.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman permite a caracterização de qualquer tipo de amostra sem a necessidade de um preparo específico. Esta técnica proporciona informação química e estrutural das amostras analisadas (SHIH *et al.*, 2015). Os espectros de Raman dos filmes dos sistemas nanoparticulados depositados sobre pastilhas de silício foram obtidos utilizando um sistema Witec alpha 300 M micro-Raman (Witec Instruments ®, Knoxville, EUA) equipado por um microscópio e um detector de CCD. A excitação foi realizada com laser de He-Ne em 633 nm. Medidas de Raman foram realizadas à temperatura ambiente e à pressão atmosférica. As posições dos picos característicos do óxido de ferro foram determinadas na região de Raman de interesse 150- 2000 cm^{-1} . Esta análise foi realizada em colaboração com o laboratório do Prof. Dante Franceschini na Universidade Federal Fluminense.

4.11. Estudo de responsividade ao campo magnético

O comportamento das nanopartículas quando aplicadas um campo magnético externo foi avaliado para determinar a capacidade de carreamento do siRNA em direção ao campo magnético. Em um dispositivo retangular (cubeta) aberto em seu eixo mais longo foram colocados cerca de 1 ml de suspensão de nanopartículas magnéticas contendo siRNA. À uma das extremidades da cubeta foi posicionado um ímã de neodímio de força magnética 1300 Gauss como demonstrado na Figura 16. Alíquotas da suspensão foram coletadas antes e em 0, 1, 5, 10 e 30 minutos após a aplicação do campo magnético em 3 diferentes distâncias em relação ao ímã (0; 0,5 e 1,0 cm de distância do ímã). Após as coletas, procedeu-se a quantificação de ferro e de ácidos nucleicos. Além disso, a influência do campo magnético sob as características físico-químicas como tamanho e PDI foram avaliadas através do espalhamento dinâmico de luz como descrito no item 4.4.

Figura 16: Representação esquemático do ensaio de responsividade ao campo magnético.



Em que (1) representa a área mais próxima ao ímã (0 cm de distância); (2) representa a área mediana (0,5 cm de distância do ímã) e (3) representa a área mais distante do campo magnético (1,0 cm de distância).

4.11.1. Quantificação de ferro

A quantificação de ferro foi avaliada através da reação com 1, 10 – fenantrolina, que reage com cada cátion de ferro II (ferro ferroso) produzindo um complexo laranja-avermelhado. A solução colorimétrica segue a Lei de Lambert-Beer em 515 nm, sendo a intensidade proporcional a concentração de ferro presente. Para que

a reação ocorra é necessária a completa dissociação dos íons ferro II e redução dos íons ferro III presentes na amostra. À aliquota reservada para a quantificação de ferro, foi necessária a completa dissociação do núcleo de SPIONs. Por conseguinte, a quebra do sistema nanoparticulado foi obtido através da adição de ácido clorídrico concentrado 12 M (5 µl) em 5 µl de nanopartículas (1:1 v/v) por 10 minutos. Adicionou-se 10 µl de tampão ácido acético/acetato pH 5,0; 10 µl de cloridrato de hidroxilamina 10% (NH₂OH. HCl) para garantir a redução do ferro férrico (Fe III) para ferro ferroso (Fe II); 10 µl de 1,10-fenantrolina 0,3% e 15 µl de água. Após 10 minutos, adicionou-se 25 µl de hidróxido de amônio P.A. (NH₄OH) para otimização do pH da reação, resultando em rápido desenvolvimento da coloração. Foi preparada uma curva analítica com íons FeCl₂ nas concentrações 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/ml. As leituras das amostras e da curva-analítica foram realizadas em 515 nm em espectrofotômetro UV/Vis PicoDrop® (Astranet Systems Ltd, Hinxton, UK). A partir da construção de um gráfico concentração curva-analítica X absorvância, obteve-se a equação da reta sendo possível calcular a concentração de ferro ferroso nos diferentes pontos de coleta.

4.11.2. Quantificação de siRNA

Para avaliação da concentração de siRNA foi utilizado o kit de quantificação Quanti-iT miRNA assays kit (Thermo Scientific Inc, MA, USA) como descrito no item 4.9. Da mesma maneira que no item 4.11.1, é necessária a dissociação das nanopartículas e consequente liberação de siRNA incorporado para possibilitar a quantificação. Para isso, foi adicionado às amostras coletadas tampão em pH 4,5 contendo: CaCl₂ 100 nM, NaH₂PO₄ 40 nM e NaCl 140 mM na proporção 1:4 (v/v) (KAKIZAWA *et al.*, 2004). Após 40 minutos, os núcleos de SPIONs (que neste momento já tiveram dissociada a camada de revestimento) foram magnetizadas durante 1 minuto para diminuir a interferência do ferro no ensaio. Foram coletados 5 µL do sobrenadante e quantificado a concentração de ácido nucléico de acordo com o protocolo do kit.

4.12. Verificação da atividade *in vitro*

4.12.1. Cultura Celular

Células MDA-MB 231 (linhagem celular de adenocarcinoma de mama de origem humana, nº BCRJ: 0164) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). Para a cultura, as células foram mantidas em garrafas plásticas específicas contendo meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 10 mM de HEPES, pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C com 5% CO₂. Para realizar os experimentos, o número de células viáveis foi avaliado pelo método de exclusão por Azul de Trypan, em que células não viáveis possuem comprometimento de membrana e coram-se de azul devido a incorporação do corante (FRESHNEY, 1987). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, o número de células e tempo de incubação foram adaptados para cada tipo de ensaio.

4.12.2. Avaliação da citotoxicidade

As amostras foram avaliadas pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), através do qual pode-se detectar a atividade de desidrogenases mitocondriais. Células de câncer de mama MDA-MB 231 foram sub-cultivadas em 100 µl de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino em placa de 96 poços (5.000 células/poço) e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. As suspensões de nanopartículas carregando siRNA do gene VEGF (siVEGF) e o respectivo controle (Mock - sem siVEGF) foram aplicadas nos poços juntamente com meio fresco. Após 48 horas a adição das amostras, foi realizado o ensaio de MTT. O método do MTT baseia-se na utilização de um corante, o Brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou Thiazolyl blue (MTT), para determinar a viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura insolúvel, após a clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais. O formazam púrpura é determinado em 540 nm sendo proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983a). A densidade óptica obtida no grupo controle (células sem tratamento) foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular nos demais tratamentos foi calculada através de regra de três simples.

4.12.3. Avaliação do silenciamento gênico

Para avaliação da expressão gênica do gene do VEGF, células de câncer de mama foram sub-cultivadas em 2000 µl de DMEM contendo 10% de soro fetal bovino em placa de 6 poços na concentração de 100.000 células/poço e incubadas a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 horas as nanopartículas carregando siVEGF e os respectivos controles (siSCR e Naked siVEGF) foram adicionados com meio fresco sendo incubados por 48 horas.

4.12.4. Extração de RNA

Após 48 horas do tratamento com as nanopartículas, as células foram separadas para a extração de RNA através do método do Trizol (Gibco®). Primeiramente, as células foram lavadas com PBS 1× e o RNA total foi extraído com Trizol® e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado clorofórmio e as amostras foram agitadas vigorosamente e centrifugadas por 15 minutos a 12.000 × g a 4 °C para a separação das fases. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo no qual adicionou-se álcool isopropílico, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4 °C por 10 minutos a 12.000 × g e o sobrenadante foi removido. O precipitado (RNA) foi lavado com etanol 75 % e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 7.500 × g (4 °C). O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA foi mantido em temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente, seguido de diluição em água livre de RNase. O RNA total extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro Nano Vue® (GE Healthcare). A pureza do RNA extraído foi avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm. Após eliminação do DNA genômico, realizado através do tratamento com DNase I (Invitrogen®) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, a quantidade de RNA extraído foi padronizada.

4.12.5. Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA utilizou-se o *kit High – Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems®) conforme protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a – 20 °C

até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia polimerase quantitativo (qPCR). Todas as incubações foram realizadas em termociclador Biocycler (BioSystems, Curitiba, Brasil).

4.12.6. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A expressão do gene VEGF humano foi quantificada por meio do método de PCR quantitativo (qPCR) utilizando o StepOnePlus Real-time RT-PCR System (Applied Biosystems®) e Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific®) nas condições descritas no Quadro 1. A expressão gênica foi normalizada pela beta-actina humana como gene *house-keeper* antes da análise estatística. A sequência dos iniciadores específicos para o gene do VEGF e para o gene de referência é descrita na Tabela 1. A curva de eficiência dos mesmo está descrita no apêndice A.

Quadro 1: Condições da reação de qPCR

	40 ciclos					Curva de dissociação			
Tempo	2'	15'	15''	30''	38''	15''	1'	15''	∞
T (°C)	50	95	94	60	72	95	60	95	4

Tabela 1: Sequência de iniciadores utilizados na reação de qPCR

	Senso 5'-3'	Antisenso 5'-3'
VEGF	AGTGGTCCCAGGCTGCAC	TCCATGAACCTCACCACCTCGT
Beta-actina	CAAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

Adaptado de (PITTELLA *et al.*, 2011)

4.12.7. Avaliação da endocitose de nanopartículas

Células de câncer de mama MDA-MB 231 foram sub-cultivadas em 2000 µl de DMEM contendo 10% de soro fetal bovino em placas com base de vidro na concentração de 50.000 células/poço e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ para observação através da microscopia confocal. Após 24 horas a suspensão de nanopartículas carregando siVEGF marcado com Cy5 (siVEGF_Cy5) e o respectivo controle

(Naked siVEGF_Cy5) foram adicionadas com meio fresco sendo incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% CO₂ em ambiente escuro. Em seguida, procedeu-se a marcação do endossomo/lisossomo com o corante LysoTrackerGreen DND-26 (Thermo Scientific®) na concentração de 50 nM seguido de incubação por 60 minutos nas condições previamente descritas. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1 × e fixadas com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% por 15 minutos. O excesso de corante foi retirado e foi adicionado a sonda fluorescente 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) na concentração de 1 µg/ml por 10 minutos. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e meio fresco foi adicionado a placa. As imagens de microscopia confocal foram obtidas no Laboratório Central de Microscopia da UFSC, utilizando um microscópio Leica DMI6000 B (Leica Microsystems®) com óleo de imersão e objetiva de 63 ×. O comprimento de onda para excitação foram 405 nm (Laser de Diodo, UV), 488 nm (laser de Ar) ou 633 nm (laser de He-Ne). A quantificação foi realizada através do software do equipamento e a taxa de co-localização foi calculado através da fórmula:

$$\text{Taxa de co-localização} = \frac{(\text{quantidade de pixels amarelos})}{(\text{quantidade de pixels amarelos e vermelhos})}$$

4.13. Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, repetidos pelo menos três vezes, em dias diferentes.

Os resultados foram expressos em média ± desvio-padrão e média ± erro padrão da média para os ensaios de qPCR e endocitose. Todos os ensaios foram analisados estatisticamente, por meio do programa Graphpad Prism®, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni para comparação com o grupo controle. Um valor de probabilidade menor que 0,05 (p<0,05) foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

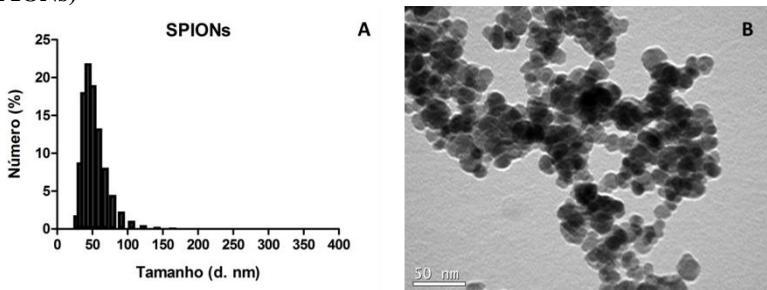
5.1. Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs)

A síntese do núcleo magnético foi realizada a partir da coprecipitação dos íons Fe II e Fe III como descrito no item 4.2. O hidróxido de amônio 1,5 M, pH 9,0, foi usado como agente alcalinizante e a temperatura foi mantida a 30-33°C. A relação molar Fe^{2+}/Fe^{3+} foi fixada em 0,5. Esta reação favorece a formação de nanopartículas de óxido Fe_3O_4 (magnetita) sobre o $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemita) (CHIN *et al.*, 2009). SPIONs foram caracterizados quanto ao tamanho, morfologia e determinação do ponto isoelétrico.

As medidas de tamanho foram realizadas através da técnica de DLS como descrito no item 4.4. Para isso, núcleos de SPIONs foram diluídos em água e avaliados quanto ao diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PdI). A morfologia foi avaliada observando as nanopartículas através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Como mostra a Figura 17, os SPIONs apresentaram pico de distribuição do diâmetro por número em $43,8 \text{ nm} \pm 8,2$ (A) e PdI de $0,157 \pm 0,001$. Na microscopia eletrônica de transmissão (TEM) observou-se nanopartículas esféricas com tamanho em torno de 20 nm.

A diferença entre os tamanhos encontrados nas diferentes técnica pode se tratar de um problema de resolução na técnica DLS que não discrimina duas partículas em contato próximo, ou ainda, alguns autores apontam que ao secar e armazenar as NPs em superfícies, como as grades de TEM, podem ocorrer alterações que não representam com precisão a natureza da amostra na dispersão líquida (WALLACE *et al.*, 2012).

Figura 17: Tamanho e morfologia de nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs)



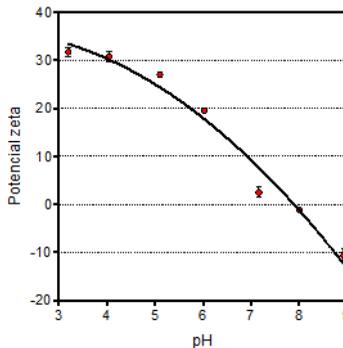
Caracterização de SPIONs onde (A) representa medidas de DLS em que o eixo X representa o tamanho em nm; e o eixo Y a dispersão por número em porcentagem; e (B) representa a morfologia das nanopartículas através de imagens obtidas por TEM, em que o tamanho da barra representa 50 nm.

Os óxidos de ferro são sólidos anfotéricos que podem apresentar cargas na superfície, devido a reações de protonação ($\text{Fe-OH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Fe-OH}_2^+$) e desprotonação ($\text{Fe-OH} \rightleftharpoons \text{Fe-O}^- + \text{H}^+$) nos grupamentos Fe-OH. Estas reações de superfície podem ser interpretadas como a adsorção específica de prótons H^+ ou de íons hidroxila OH^- na interface água/sólido hidratado. A adsorção destes íons, induz a formação de uma dupla camada elétrica estabilizadora da superfície, sendo que a carga aumenta com o aumento da força iônica em condições ácidas e alcalinas (TOMBACZ *et al.*, 2006). Assim, a mobilidade eletroforética das nanopartículas de SPIONs preparadas foi determinada usando Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®) e transformada automaticamente pelo software em valores de potencial zeta usando a equação de Smoluchowski. O ponto isoelétrico ou ponto de carga zero (PI) foi determinado como a intersecção da curva Potencial zeta vs. pH, ponto no qual a densidade de carga superficial deveria ser zero. O PI encontrado foi a pH 7,8 (IC 95% 7,7-8,1) (Figura 18), valor que se encontra na faixa dada na literatura para a fase cristalina maghemita e magnetita (LUCAS *et al.*, 2007).

Como demonstra a Figura 18, também é possível observar a influência do pH sobre a carga superficial (potencial zeta) das nanopartículas. Este dado é de extrema importância para a preparação dos sistemas nanoparticulados 1 e 2, uma vez que a carga superficial influencia na ordem em que o revestimento é adicionado.

Além disso, a determinação do ponto isoelétrico foi realizada como forma de avaliar a influência de condições extremas de temperatura na superfície das nanopartículas. Desordens magnéticas ou ainda a oxidação descontrolada na superfície destas partículas ocorre com frequência na presença de oxigênio e água (MYKHAYLYK *et al.*, 2007). O uso da autoclave para esterilização das nanopartículas pode levar a oxidação das SPIONs, fazendo com que mudem a forma cristalina de magnetita e maghemita para a forma cristalina hematita, a qual não possui propriedades magnéticas significativas (SALADO *et al.*, 2012). Após a síntese, as SPIONs foram esterilizadas em autoclave a 120 °C por 20 minutos e o PI foi determinado como descrito anteriormente. Não houve variação significativa no ponto isoelétrico das nanopartículas, sugerindo que as SPIONs não sofreram oxidação na superfície (Tabela 2).

Figura 18: Potencial zeta das SPIONs



Medidas de potencial zeta em função do pH (3,0 – 9,0) para determinação do ponto isoelétrico de SPIONs (SIERRA-RESTREPO, 2015).

Tabela 2: Determinação do ponto isoelétrico de SPIONs

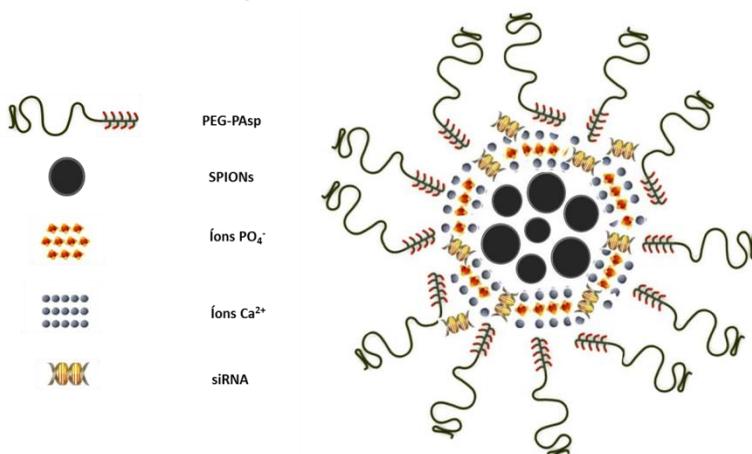
PI	PI após autoclave
7,80	7,92

5.2. Preparação dos sistemas nanoparticulados NP1 e NP2

Nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs) apresentam uma grande vantagem quanto a utilização, uma vez que são passíveis de

orientação com a indução de campo magnético externo, obtendo-se desta forma a acumulação ativa em células (*in vitro*) ou tecidos (*in vivo*) (MOJICA PISCIOTTI *et al.*, 2014; MYKHAYLYK *et al.*, 2015). Estas partículas migram em direção ao campo magnético devido as propriedades magnéticas (PASUKONIENE *et al.*, 2014). Neste sentido, os núcleos magnéticos foram revestidos por fosfato de cálcio e blocos de copolímero. O fosfato de cálcio é altamente biocompatível, necessário para a incorporação do ácido nucléico ou molécula polianiônica e para a respectiva liberação controlada em compartimentos celulares. Além disso, a camada de fosfato de cálcio protege o núcleo magnético de oxidações (TANG *et al.*, 2014). Para a estabilização dos sistemas, podem ser utilizados blocos de copolímero em que um dos blocos seja carregado negativamente, como o PEG-PAsp. A característica polianiônica do bloco de poliaspartato permite a interação com a camada intermediária de fosfato de cálcio. A molécula flexível e hidrofílica de PEG determina o complexo na escala nanométrica e promove a estabilidade coloidal em fluidos biológicos (KAKIZAWA *et al.*, 2004). A Figura 19 representa o esquema das nanopartículas incorporando ácidos nucléicos.

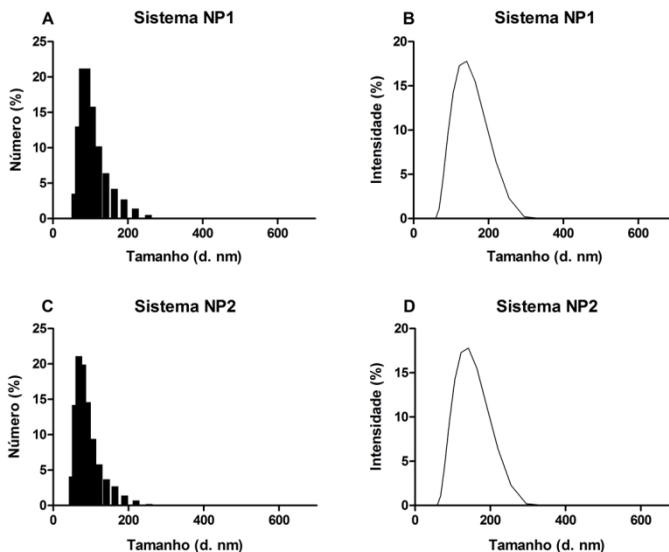
Figura 19: Representação gráfica das nanopartículas 1 e 2



5.3. Caracterização das NP1 e NP2

O tamanho de partícula e índice de polidispersão das nanopartículas foram determinados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) como descrito no 4.4. Como mostra a Figura 20, os sistemas nanoparticulados NP1 e NP2 apresentaram pico na distribuição do diâmetro por número em $78,8 \text{ nm} \pm 7,2$ e $91,2 \text{ nm} \pm 11,6$ respectivamente (A e C). Os histogramas por intensidade (B e D) demonstraram tamanho médio de $130,0 \text{ nm} \pm 27,8$ para NP1 e $134,5 \text{ nm} \pm 14,3$ para NP2, apresentando PDI de $0,074 \pm 0,03$ para o sistema NP1 e de $0,138 \pm 0,02$ para NP2. A diferença observada pode ser explicada através da diferença das medidas realizadas, uma vez que a distribuição por número considera o número de nanopartículas por si só, enquanto a distribuição por intensidade baseia-se na intensidade de luz refratada (FORNAGUERA *et al.*, 2014). Pittella e colaboradores (2011) caracterizaram nanopartículas de fosfato de cálcio com diâmetro médio em 100 nm. O valor de diâmetro médio encontrado na literatura para núcleo magnético é em torno de 25 nm, e para nanopartículas magnéticas revestidas com fosfato de cálcio foi encontrado valores em 121 nm (PUDDU *et al.*, 2015). Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os achados na literatura, uma vez que o núcleo magnético de tamanho pequeno encontra-se revestido por uma camada de fosfato de cálcio e polímero, aumentando o diâmetro médio da partícula.

Figura 20: Histogramas de tamanho em nm determinado por medidas de DLS



Medidas de DLS das nanopartículas NP1 (A e B) e NP2 (C e D) em que A e C representam a distribuição por número e B e D a distribuição por intensidade.

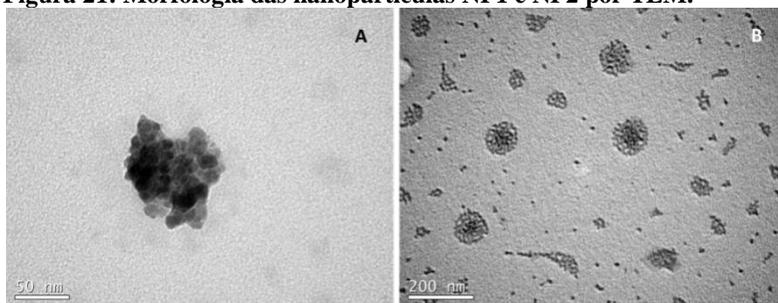
Para a determinação da carga superficial das nanopartículas utilizou-se a técnica de mobilidade eletroforética, como descrito no item 4.5. Cargas superficiais próxima ao zero e levemente negativas são atribuídas à presença de PEG na camada externa de nanopartículas, devido ao caráter não-iônico deste polímero. A suspensão de nanopartículas apresentou carga superficial de $-1,64 \text{ mV} \pm 0,62$, ou seja, levemente negativa, sugerindo a formação de nanopartículas de acordo com a hipótese da Figura 18, em que o bloco de PEG forma uma camada externa hidrofílica sobre a camada intermediária e o núcleo.

5.4. Avaliação da morfologia dos nanocarreadores

Ambos os sistemas apresentaram-se como clusters parcialmente esféricos de tamanho em 70 nm e 100 nm para NP1 e NP2, respectivamente (Figura 21). Este resultado corrobora com os dados

obtidos na distribuição por número através das medidas de DLS, em que foi observado pico em 78,8 nm para NP1 e 91,2 nm para NP2. A pequena diferença encontrada pode ser explicada pelas características inerentes a cada técnica. Uma vez que a camada externa de PEG apresenta baixa densidade eletrônica, sua visualização é prejudicada por esta técnica. Desta forma, o tamanho medido com a técnica do TEM é relativo apenas ao núcleo e à camada intermediária. Por outro lado, a técnica de DLS utiliza-se do espalhamento de luz para a aferição do tamanho, compreendendo também os dados da camada externa de PEG para o cálculo do diâmetro.

Figura 21: Morfologia das nanopartículas NP1 e NP2 por TEM.

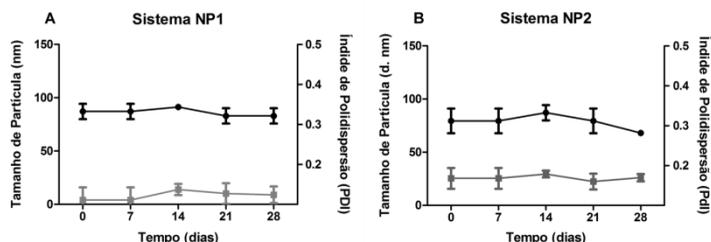


Morfologia das nanopartículas 1 (A) com tamanho de barra de 50nm e 2 (B) com tamanho de barra de 200 nm. Imagens foram obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

5.5. Estabilidade coloidal

Para avaliação da estabilidade, as nanopartículas foram estocadas a baixa temperatura (4 °C) por 30 dias. Nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias, alíquotas das formulações foram retiradas e avaliadas quanto ao aspecto macroscópico, tamanho de partícula e índice de polidispersão. Ambas as nanopartículas NP1 e NP2 apresentaram indícios macroscópicos de decantação no fundo do frasco de armazenamento, provavelmente devido ao alto peso molecular de cada sistema. No entanto, após rápida agitação, as partículas decantadas retornaram a ficarem suspensas e as medidas foram realizadas. Na Figura 22 é possível observar que as nanopartículas permaneceram estáveis em tamanho e polidispersão durante todo o período avaliado.

Figura 22: Estabilidade coloidal das NP1 e NP2 a 4 °C.



Avaliação da estabilidade dos nanocarreadores através das medidas de DLS e PdI. (A) e (B) representam o sistema nanoparticulado 1 e 2 respectivamente. O eixo X representa o tempo em dias, o eixo Y esquerdo o tamanho de partícula em nm representado pela linha preta, e o eixo Y direito o índice de polidispersão (PdI) representado pela linha cinza. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão.

5.6. Estudo preliminar de liofilização

A liofilização é o processo de desidratação em que a água que se encontra no estado sólido, é retirada por sublimação sem ocorrer a passagem pelo estado líquido. É o método de escolha para estabilização de produtos farmacêuticos, uma vez que o produto liofilizado apresenta estabilidade em longo prazo, aspecto físico adequado e é facilmente reconstituído, mantendo as propriedades físico-químicas dos produtos como tamanho e forma de partícula (SRINIVASAN *et al.*, 2015).

No entanto, este processo pode gerar desestabilização das nanopartículas, acarretando na dificuldade de reconstituição dos sólidos formados, o que pode gerar problemas de agregação. O uso de crioprotetores, como os açúcares dextrose, frutose, trealose entre outros, vem sendo utilizados com o intuito de diminuir os efeitos indesejados do processo de liofilização (YUE *et al.*, 2015). Entre estes efeitos inclui-se agregação, liberação do conteúdo incorporado, separação de fases, alteração de pH e osmolaridade, entre outros (MEHNERT e MADER, 2001; ABDELWAHED *et al.*, 2006).

Para avaliação da estabilidade das nanopartículas sem siRNA (Mock) após o processo de liofilização, foi verificado se houve variação de tamanho, PdI e potencial zeta. A Tabela 3 mostra as medidas de DLS e potencial zeta para as amostras com ou sem adição de açúcar. Observou-se que o processo de liofilização não alterou o

tamanho e a carga das nanopartículas e que o uso de dextrose como crioprotetor neste caso não é necessário. Outros estudos, como a avaliação da liberação de siRNA e da morfologia das nanopartículas devem ser realizados para determinar a influência da liofilização nos sistemas nanoparticulados.

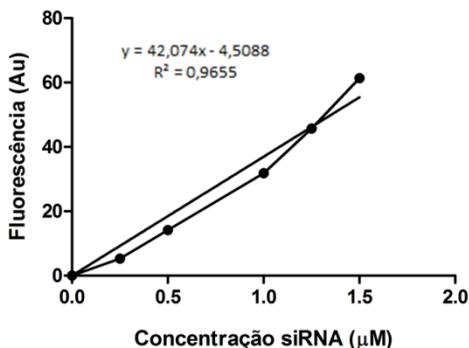
Tabela 3: Medidas de DLS e potencial zeta após liofilização.

	<i>Mock antes da liofilização</i>	<i>Mock após liofilização</i>	<i>Mock com adição de açúcar após liofilização</i>
Tamanho (d. nm)	61,87 ± 5,4	68,06	58,20 ± 8,6
PdI	0,14 ± 0,001	0,16 ± 0,005	0,18 ± 0,06
Potencial zeta (mV)	- 1,64 ± 0,6	- 2,25 ± 0,3	- 2,02 ± 0,4

5.7. Avaliação da Eficiência de Incorporação

Para avaliação da eficiência de incorporação, as suspensões de nanopartículas NP1 e NP2 foram centrifugadas e o sobrenadante foi cuidadosamente coletado para quantificação de siRNA não incorporado, e o respectivo cálculo do siRNA incorporado. Ambos os sistemas apresentaram eficiência de incorporação variando entre 70 e 85%. A alta taxa de incorporação do siRNA nas nanopartículas está provavelmente relacionada à capacidade do ácido nucléico de se ligar ao fosfato de cálcio. No entanto, ao utilizar uma força de homogeneização maior, com o uso de ondas de ultrassom, a incorporação é ainda superior à formação das nanopartículas sem o ultrassom. A Figura 23 apresenta a curva-padrão de siRNA e a respectiva equação da reta.

Figura 23: Curva-padrão de siRNA



Curva analítica realizada por espectrofluorimetria monitorando a molécula fluorescente intercalada ao siRNA (λ excitação= 500 nm e λ de emissão= 525 nm). O eixo X representa a concentração de siRNA e o eixo Y a fluorescência determinada.

5.8. Análise de superfície

5.8.1. Espectroscopia de Emissão de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS)

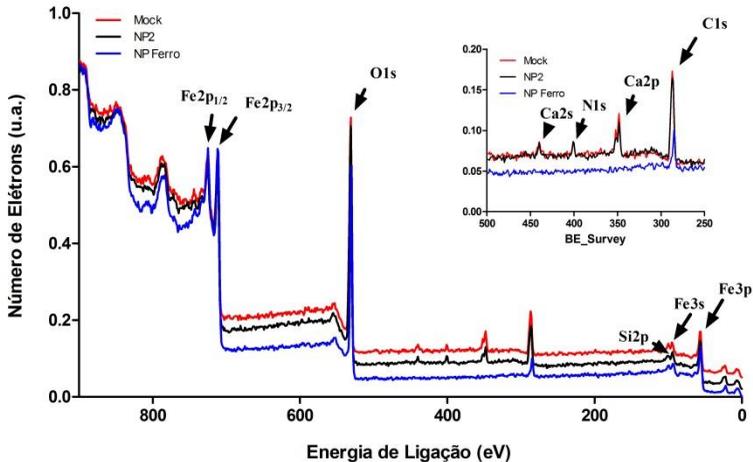
A espectroscopia de emissão de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foi usada como uma técnica adicional para distinguir Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, pois os óxidos de ferro apresentam envelopes $\text{Fe}2p_{3/2}$ e $\text{Fe}2p_{1/2}$ e $\text{O}1s$ característicos no espectro de XPS (BIESINGER *et al.*, 2010). Além disso, esta técnica também foi utilizada para observar o revestimento de CaP através da identificação dos elementos químicos na superfície das nanopartículas.

A Figura 24 mostra o espectro na faixa de energia de ligação de 0 até 1000 eV de um filme de nanopartículas de óxido de ferro, com e sem revestimento, depositadas em um suporte de silício. Como esperado, para o espectro das SPIONs (linha azul), foram encontrados apenas os picos relativos ao ferro e ao oxigênio. O pico característico do envelope $\text{O}1s$ foi observado em 529,9 eV. Os picos relativos aos íons ferro apresentaram centros de gravidade em: 56,0 eV e 94,0 eV para os envelopes $\text{Fe}3p$ e $\text{Fe}3s$, respectivamente. A presença dos envelopes $\text{Fe}2p_{3/2}$ e $\text{Fe}2p_{1/2}$ característicos de óxidos de ferro foram observados em 724,4 eV e 710,8 eV, respectivamente. A forma dos espectros assemelha-se a descrita na literatura para a forma cristalina

maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (GROSVENOR *et al.*, 2004; BIESINGER *et al.*, 2010). Além disso, os centros de gravidade dos picos $\text{Fe}2p_{3/2}$ e $\text{Fe}2p_{1/2}$, apresentaram separação de energia ΔE de 13,6 eV confirmando a descrição da literatura de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (GROSVENOR *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2014).

Além dos picos característicos de óxido de ferro, as nanopartículas revestidas NP2 e Mock (linha preta e linha vermelha, respectivamente) apresentaram centros de gravidades em 348,1 eV para $\text{Ca}2p$, 440,08 eV para $\text{Ca}2s$, 285,0 eV para $\text{C}1s$ e 401,0 eV para $\text{N}1s$. A presença dos elementos cálcio, nitrogênio e carbono confirmam o revestimento com CaP e polímero. Foi observado também o pico referente ao suporte de silício utilizado na técnica ($\text{Si}2p$) em 101,0 eV. Por outro lado, uma vez que a quantidade de fosfato presente nos sistemas nanoparticulados é aproximadamente 500 vezes menor que a quantidade de cálcio, a baixa concentração impossibilitou a visualização de picos identificados como tal elemento nos espectros.

Figura 24: Medidas de XPS das NP 2



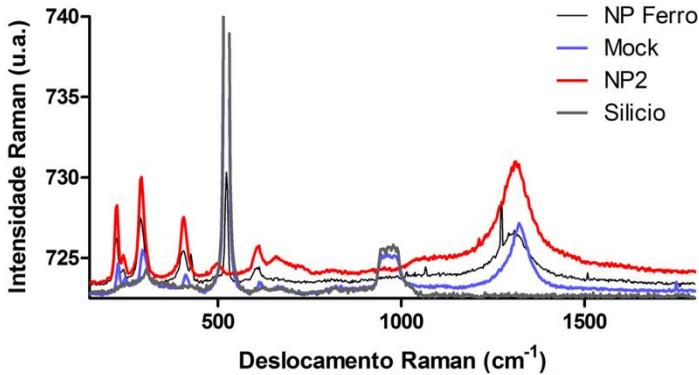
Espectros XPS dos sistemas nanocarreadores, em que a linha azul representa o espectro de SPIONs; linha vermelha o espectro da nanopartícula Mock e a linha preta as nanopartículas NP2.

5.8.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar as nanopartículas em relação a forma cristalina. As nanopartículas de magnetita e maghemita apresentam alto poder de magnetização, sendo importante para vetorizar o nanocarreador para o local de ação (STANCA *et al.*, 2015). A Figura 25 demonstra os espectros Raman das nanopartículas NP2 e Mock e dos núcleos de SPIONs.

As nanopartículas NP2 (linha vermelha), Mock (linha azul) e SPIONs (linha preta) apresentam bandas características em 222, 288, 403, 522, 601 e 1300 cm^{-1} . De acordo com os achados na literatura, estes deslocamentos são característicos da forma cristalina hematita (COLOMBAN, 2011). Esta estrutura cristalina não apresenta potencial para magnetização, sendo inadequada para o objetivo deste trabalho. No entanto, Colomban relata a fácil transformação de fase cristalina de magnetita e maghemita para hematita, mediada através da incidência do feixe de laser, o que acontece nas medidas de Raman. Desta forma, a estrutura cristalina identificada neste item é provavelmente resultado da oxidação das nanopartículas após a incidência do feixe de laser. A caracterização por XPS identificou a forma cristalina maghemita pela presença dos envelopes característicos $\text{Fe}2p_{3/2}$ $\text{Fe}2p_{1/2}$ e separação de energia ΔE de 13,6 eV, demonstrando que há uma limitação na técnica Raman, devido a oxidação na superfície das nanopartículas através do feixe de laser utilizado. Além disso, quando aplicado um campo magnético sob a mesma amostra de nanopartículas sem incidência de laser, as mesmas apresentavam magnetização ao deslocarem-se em direção ao ímã, o que demonstra uma das principais características de magnetita e maghemita: a magnetização (dado não mostrado). A Figura 25 também apresenta o espectro do silício, presente no suporte utilizado para a técnica.

Figura 25: Espectroscopia Raman dos sistemas nanoparticulados



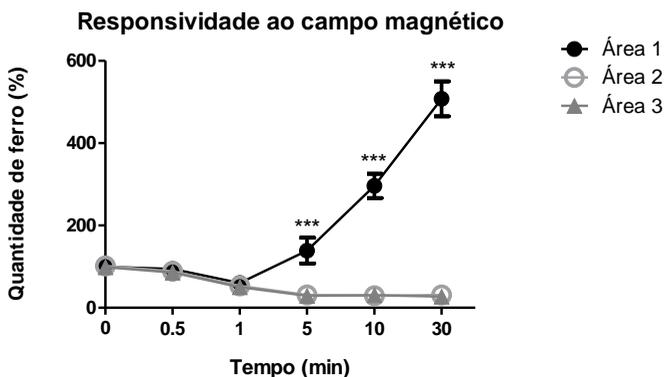
Espectroscopia Raman das nanopartículas, em que a linha cinza representa o espectro de silício, a linha preta o espectro das SPIONs, a linha lilás o espectro da Mock, e a linha vermelha representa as nanopartículas NP2.

5.9. Avaliação da Responsividade ao campo magnético

5.9.1. Quantificação de Ferro

A partir da equação da reta obtida com concentrações conhecidas de ferro (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), foi possível calcular a concentração de ferro ferroso nos diferentes pontos de coleta. A Figura 26 demonstra que as nanopartículas desenvolvidas são responsivas ao campo magnético aplicado, uma vez que se observou um aumento na concentração de íons ferroso nas proximidades do ímã no decorrer do tempo. O aumento da concentração foi estatisticamente significativo a partir de 5 minutos, quando comparado ao ponto inicial. É interessante observar também que o aumento da concentração na área 1 (mais próxima do ímã) ocasionou a redução da concentração nas áreas 2 e 3 (mais longe do ímã).

Figura 26: Quantificação de ferro após aplicação de campo magnético externo



O gráfico representa a concentração de ferro em diferentes distâncias do campo magnético. O eixo Y representa a quantidade de ferro em porcentagem (%) e o eixo X o tempo em minutos após a aplicação do campo magnético. O círculo fechado preto (●) representa a área com distância de 0 cm ao ímã; o círculo aberto cinza claro (○) representa distância de 0,5 cm e o triângulo fechado cinza escuro (▲) representa distância de 1,0 cm do campo magnético. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão *** $p < 0,001$ quando comparado as diferentes áreas (ANOVA seguido de Bonferroni).

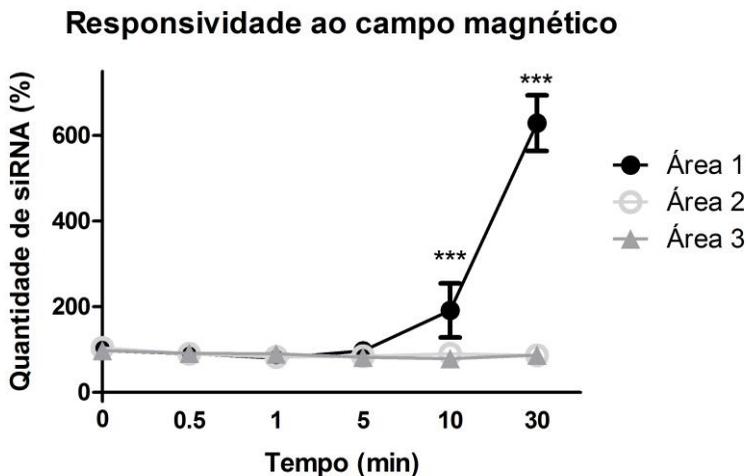
5.9.2. Quantificação de siRNA

A avaliação da concentração de ácidos nucleicos foi realizada como descrito no item 4.11.2. Após a coleta e completa dissociação das nanopartículas, a quantificação de siRNA foi realizada utilizando-se o kit de quantificação Quanti-iT miRNA assays kit (Thermo Scientific Inc, MA, USA). A partir da equação da reta obtida com concentrações conhecidas de siRNA (Apêndice A) foi possível estabelecer as concentrações de siRNA nos diferentes pontos de coleta.

Na Figura 27 é possível observar que as nanopartículas são eficazes em carrear siRNA mesmo sob a influência de um campo magnético externo, que pode ser observado no gráfico a partir do

aumento da concentração de siRNA na região mais próxima ao ímã após 30 minutos. O aumento da concentração de siRNA na área 1 foi estatisticamente significativo a partir de 10 minutos, quando comparado ao ponto inicial.

Figura 27: Quantificação de siRNA após aplicação de campo magnético externo.



O gráfico representa a concentração de siRNA em diferentes distâncias do campo magnético. O eixo x representa o tempo em minutos e o eixo y a quantidade de siRNA em porcentagem (%). O círculo fechado preto (●) representa a área com distância de 0 cm ao ímã; o círculo aberto cinza claro (○) representa distância de 0,5 cm e o triângulo fechado cinza escuro (▲) representa distância de 1,0 cm do campo magnético. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão. *** $p < 0,001$, quando comparado as 3 áreas (ANOVA seguido de Bonferroni).

Para a avaliação da influência do campo magnético no tamanho e PdI, medidas de DLS foram realizadas após a indução de campo magnético externo por 30 minutos. A Tabela 4 apresenta as medidas obtidas dos tamanhos e PdI dos sistemas NP1 e NP2 após a aplicação do campo magnético externo.

Tabela 4: Medidas de DLS e Pdl após campo magnético externo.

	Tamanho (d. nm)	Pdl
NP1	82,9 ± 7,2	0,19 ± 0,007
NP1 após ímã	68,5 ± 10, 1	0,19 ± 0,001
NP2	75,2 ± 5,4	0,15 ± 0,01
NP2 após ímã	65, 0 ± 5,4	0,14 ± 0,02

Estes resultados sugerem que os sistemas nanoparticulados 1 e 2 são eficazes em carrear o siRNA sob a indução de um campo magnético externo, sem alterar as características físico-químicas das nanopartículas.

5.10. Avaliação da toxicidade celular

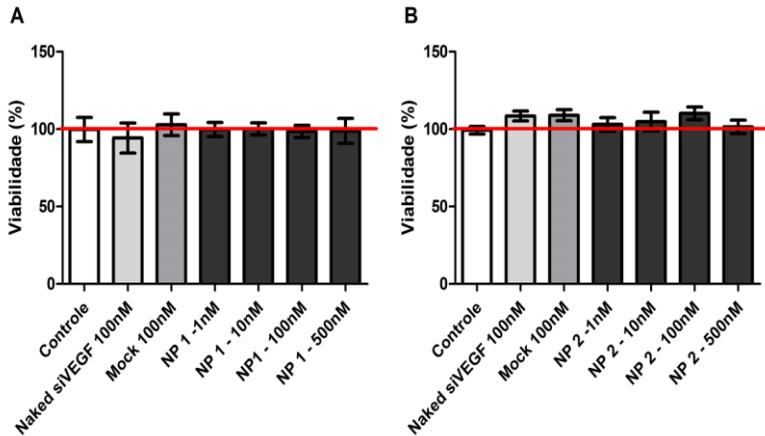
A determinação da citotoxicidade foi realizada através do ensaio por MTT. Os sais de tetrazólio, que incluem o MTT e análogos, são meios de medir a atividade das células viáveis mediante a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Estas decompõem o anel de tetrazólio, formando um produto que pode ser monitorado colorimetricamente, fornecendo assim, informações sobre a atividade metabólica da célula (MOSMANN, 1983b; a). A linhagem celular humana de adenocarcinoma mamário MDA-MB-231 foi escolhida por ser amplamente utilizada como modelo de câncer de mama para avaliação de novas terapias (BRIANE *et al.*, 2012; GHAFARI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015).

A verificação da toxicidade dos nanocarreadores foi avaliada variando a concentração de siVEGF incorporado nas nanopartículas em uma escala de 1 a 500 nM. Como demonstra a Figura 28, NP1 e NP2 não apresentaram toxicidade significativa para a linhagem testada, mesmo nas concentrações mais elevadas de siVEGF, e consequentemente de partículas. Como já mencionado, o VEGF é a principal proteína envolvida na angiogênese, tanto em condições fisiológicas, mas principalmente em doenças como o câncer. Além disso, exerce importantes funções de proteção e sobrevivência nas células endoteliais (BYRNE *et al.*, 2005). No entanto, não está relacionado ao crescimento e proliferação de células tumorais *in vitro* (TAKAHASHI e SHIBUYA, 2005). Sendo assim, a inibição da expressão do gene VEGF, e consequente diminuição de sua expressão não acarretaria na diminuição da viabilidade celular.

Também é possível observar, que o nanocarreador *per se* (Mock

– nanopartícula que não apresenta siRNA incorporado) não apresentou toxicidade celular significativa, sugerindo a biocompatibilidade dos sistemas. De fato, SPIONs apresentam elevada biocompatibilidade entre os materiais magnéticos, além de serem amplamente utilizadas como agentes de contraste para exames de ressonância magnética (LI *et al.*, 2012; RAJI *et al.*, 2014; JAFARI *et al.*, 2015). Como constituinte natural presente em maior quantidade nos ossos e nos dentes, o CaP promove ainda mais a biocompatibilidade dos sistemas, apresentando inúmeras vantagens para aplicações biomédicas (ASHOKAN *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014; YOMODA *et al.*, 2014).

Figura 28: Citotoxicidade dos sistemas NP1 e NP2 em células de câncer de mama



Avaliação da viabilidade celular em células MDA-MB 231 após tratamento com Naked siVEGF - siVEGF não incorporado em nanocarreadores, MOCK – nanopartículas brancas e com nanopartículas contendo siVEGF nas concentrações de 1, 10, 100 e 500 nM. Como controle, as células foram incubadas com meio livre de tratamento. O eixo Y representa a viabilidade celular em porcentagem (%) e (A) e (B) representam NP1 e NP2 respectivamente. Os resultados expressam a média \pm desvio padrão.

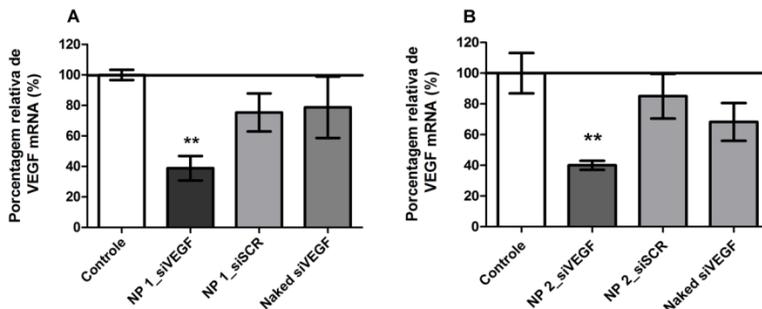
Diante deste dado, foi possível dar continuidade á avaliação da eficácia dos sistemas, uma vez que os mesmos devem apenas carrear os ácidos nucléicos incorporados, sem causar qualquer dano à célula alvo.

5.11. Avaliação do silenciamento gênico

A eficiência do siVEGF contido nas nanopartículas em promover o silenciamento gênico foi verificada avaliando-se os níveis de mRNA VEGF em células de câncer de mama MDA-MB-231, através da técnica de PCR quantitativo. O VEGF foi o gene de escolha uma vez que células de câncer geralmente superexpressam VEGF para promover angiogênese e favorecer o crescimento e proliferação tumoral *in vivo* (KAZEMI-LOMEDASHT *et al.*, 2015). Sendo assim, a terapia anti-angiogênica com siVEGF torna-se promissora no tratamento do câncer de mama, uma vez que a partir da diminuição dos níveis de VEGF é possível controlar a progressão do tumor (MACKEY *et al.*, 2012). A linhagem celular MDA-MB-231 utilizada, apresenta elevada expressão de VEGF, sendo adequada para este ensaio (BRIANE *et al.*, 2012).

Células MDA-MB-231 foram tratadas com as nanopartículas NP1 e NP2 contendo 100 nM de siVEGF ou siSCRAMBLE (siSCR-siRNA controle negativo) por 48 horas. O RNA foi extraído e a síntese de cDNA realizada como descrito anteriormente. As análises de qPCR foram realizadas para determinação dos níveis de mRNA VEGF. A Figura 29 demonstra que ambos os sistemas nanoparticulados (1 e 2) foram eficazes em promover o silenciamento do gene do VEGF. O sistema NP1 diminuiu a expressão do mRNA VEGF em 61,2 % \pm 21, enquanto o sistema NP2 diminuiu em 59,9 % \pm 7,8, demonstrando também a eficiência e especificidade da sequência de siVEGF em promover o silenciamento gênico.

Figura 29: Expressão do gene VEGF em células de câncer de mama após tratamento com os nanocarreadores contendo siVEGF



Avaliação do silenciamento gênico em células MDA-MB 231 após tratamento com as nanopartículas 1(A) e 2 (B) contendo siVEGF 100 nM e contendo siSCR 100 nM, e naked siVEGF 100 nM. Como controle as células foram incubadas com meio livre de tratamento. O eixo Y demonstra a porcentagem relativa de VEGF mRNA. Os resultados expressam a média \pm erro padrão da média. ** $p < 0.01$ quando comparado com o controle (ANOVA seguido de Bonferroni).

O significativo silenciamento do gene VEGF obtido após a utilização de NP1 e NP2, é relacionado primeiramente à incorporação do siRNA nestes sistemas. Como mostrado no item 5.9, ambas as suspensões de nanopartículas NP1 e NP2 incorporaram uma taxa bastante alta de siRNA (70-85% do siRNA inicial) devido à força de homogeneização utilizada. Desta forma, a alta incorporação resultou em significativo silenciamento, independente do pH inicial utilizado para a formação da estrutura.

Este resultado demonstra a capacidade das nanopartículas desenvolvidas em carrear o siRNA para o interior da célula, transpondo as barreiras celulares existentes *in vitro*. Além disso, também sugere que as nanopartículas estão escapando do endossomo e liberando o siRNA no citosol, uma vez que esta etapa é necessária para que ocorra a ligação ao complexo protéico RISC e consequente degradação do mRNA complementar.

O qPCR demonstrou também, através da expressão do gene constitutivo beta-actina, que não houve dano citotóxico às células tratadas, uma vez que os níveis de beta-actina mantiveram-se estáveis (dados não mostrados). Esta observação está de acordo com a avaliação da citotoxicidade dos nanocarreadores no item 5.10,

demonstrando que o efeito de RNAi ocorre devido à entrega eficaz do siVEGF no citoplasma celular, e não é proveniente de efeitos citotóxicos que acarretariam em diminuição da viabilidade celular e consequente expressão de VEGF.

5.12. Avaliação da endocitose dos sistemas em células de câncer de mama

Para transfecção de ácidos nucleicos é de extrema importância a eficiência do nanocarreador em favorecer a internalização para o citoplasma celular, bem como o escape endossomal. Após a endocitose, as nanopartículas são internalizadas no endossomo primário, seguido do endossomo tardio/lisossomo para degradação do siRNA (WHITEHEAD *et al.*, 2009). Neste contexto, a capacidade dos sistemas nanoparticulados em promover o escape endossomal é de extrema importância para a eficiência da terapia de RNAi.

A Figura 30, apresenta as imagens obtidas por microscopia confocal após a incubação das células com nanopartículas NP1 e Naked siVEGF_Cy5, em que siVEGF_Cy5, endossomo/lisossomo e núcleo são representados pela coloração vermelha, verde e azul, respectivamente. A coloração amarela representa a co-localização dos pixels vermelho e amarelo (siVEGF_Cy5 e endossomo/lisossomo, respectivamente). As imagens das células tratadas com nanopartículas NP1 (C) apresentam pontos de coloração vermelhos e amarelos, sugerindo a eficácia do sistema em carrear o siRNA para o interior da célula.

As células tratadas com o siVEGF livre também apresentaram pontos de internalização. No entanto, devido a alta disponibilidade de siRNA e ou CY5 no meio de cultura, é esperada a internalização destas moléculas através da captação celular por pinocitose, processo em que a célula capta pequenas partículas inespecíficas em soluções aquosas (WATTIAUX *et al.*, 2000). No entanto, o pH endossomal é capaz de degradar tais moléculas para reutilização de seus subfragmentos em outros processos e locais da célula.

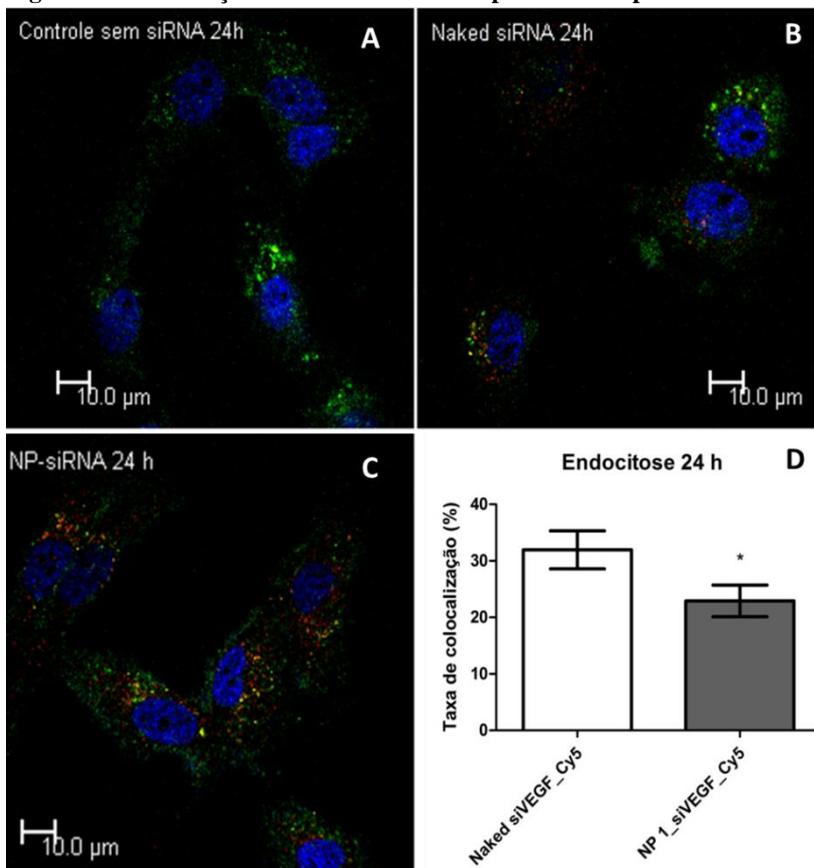
Além disso, a taxa de co-localização do tratamento com Naked siVEGF é significativamente superior quando comparado com o tratado com o sistema NP1 (D), sugerindo que o nanocarreador foi eficaz em promover o escape endossomal, liberando o siRNA para o citosol (pontos vermelhos). O escape endossomal ocorre pela presença de CaP no sistema nanoparticulado. A alta concentração de íons cálcio no revestimento das nanopartículas provoca intenso

influxo de íons e água para o interior do endossomo, promovendo a solubilização lenta do revestimento de CaP, e a ruptura da membrana endossomal devido ao aumento da pressão osmótica (PITTELLA *et al.*, 2011). Tal efeito não é observado no tratamento com Naked siVEGF, e em hipótese, o siRNA será degradado como mostram outros estudos (WATTIAUX *et al.*, 2000). Desta forma, mesmo apresentando pontos vermelhos no citoplasma, os sub-fragmentos contendo o fluoróforo Cy5 não são capazes de promover o silenciamento do gene, fato que está de acordo com os resultados da expressão gênica mostrada no tópico 5.13.

Adicionalmente, a fluorescência de Cy5 só será observada após a liberação do siRNA da nanopartícula. Isto ocorre pois o núcleo de óxido de ferro interage com o fluoróforo (Cy5) que está adsorvido na superfície, diminuindo a intensidade de fluorescência, fenômeno denominado *quenching de fluorescência* (JOSEPHSON *et al.*, 2002; CHEKINA *et al.*, 2011). Este fenômeno ocorre devido à transferência de energia não radiativa entre o núcleo magnético e o fluoróforo. Entre as alternativas para reverter o *quenching*, está a utilização de ligantes que aumentam a distância espacial entre os núcleos e as moléculas fluorescentes, ou ainda o favorecimento da quebra das ligações covalentes entre as moléculas (JOSEPHSON *et al.*, 2002). Desta forma, a presença da coloração vermelha nas imagens observadas sugere a dissociação do sistema nanoparticulado, liberando o siVEGF marcado no citosol e aumentando a intensidade da fluorescência, uma vez que a interferência dos núcleos de óxido de ferro deixou de ocorrer.

Os dados obtidos neste ensaio corroboram com os resultados de silenciamento gênico (Figura 29) já que demonstraram a capacidade dos sistemas nanoparticulados em carrear siRNA, promover o escape endossomal do ácido nucléico e promover a diminuição da expressão do gene alvo (VEGF).

Figura 30: Localização intracelular das NP1 por microscopia confocal



Células de câncer de mama MDA-MB 231 após tratamento com nanopartículas contendo siVEGF_Cy5. Imagens foram realizadas após 24 horas do tratamento. (A) representa células sem tratamento, (B) tratamento com 200 nM de Naked siVEGF_Cy5, (C) tratamento com o nanopartículas NP1 contendo 200 nM de siVEGF_Cy5 e (D) taxa de co-localização de siVEGF_Cy5 com endossomo\lisossomo. Os resultados expressam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao siVEGF livre (teste Mann Whitney). A coloração azul representa a marcação do núcleo com DAPI, verde a marcação do endossomo\lisossomo com Lysotracker, e a vermelha representa o siVEGF_Cy5.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que as nanopartículas foram preparadas de forma adequada, obtendo-se estruturas magnéticas revestidas com fosfato de cálcio e polímero com alta taxa de incorporação de siRNA. Além disso as nanopartículas apresentaram tamanho e índice de polidispersão adequados para aplicações biomédicas bem como baixa toxicidade. Os sistemas desenvolvidos mostraram-se responsáveis ao campo magnético e eficazes em carrear o siRNA e promover o silenciamento do gene VEGF em linhagem celular de câncer de mama. De forma mais detalhada, conclui-se neste trabalho que:

- a) Os núcleos de óxido de ferro foram sintetizados de forma adequada, apresentando características físico – químicas como tamanho, carga e forma compatíveis para o revestimento da superfície;
- b) As nanopartículas NP1 e NP2 apresentaram-se com tamanho e morfologia adequadas para aplicações biomédicas;
- c) As nanopartículas NP1 e NP2 mantiveram-se estáveis em baixas temperaturas, bem como após situações de estresse como o processo de liofilização e a magnetização;
- d) As nanopartículas foram eficazes em incorporar ácidos nucléicos;
- e) As análises de XPS demonstraram a eficiência da técnica de *layer by layer* em revestir adequadamente os núcleos de óxido de ferro;
- f) As nanopartículas desenvolvidas mostraram-se responsáveis a aplicação de campo magnético externo, uma vez que foi eficaz em carrear o siRNA após a magnetização;
- g) Por fim, os sistemas apresentaram-se biocompatíveis, sendo eficazes em carrear o siRNA para o interior da célula, promover o escape endossomal e o silenciamento do gene VEGF, diminuindo a expressão do mRNA complementar.

7. PERSPECTIVAS

A terapia anti-angiogênica é amplamente pesquisada como terapia adjuvante no tratamento do câncer (BREEN, 2007). O silenciamento eficaz do gene VEGF em tumores pode evitar a angiogênese tumoral e conseqüentemente diminuir o suprimento de nutrientes necessário para o crescimento do tumor (PITTELLA *et al.*, 2012). A entrega de siRNA no local de ação (citoplasma de células doentes) representa uma das vantagens da utilização de nanopartículas para o carregamento de siRNA. Nanopartículas que tenham propriedades magnéticas, por sua vez, são capazes de direcionar a entrega em locais específicos, de acordo com o campo magnético externo. Através do direcionamento do campo magnético em organismos, tais nanopartículas podem se acumular preferencialmente em células ou tecidos alvos, diminuindo assim os efeitos adversos indesejados (MYKHAYLYK *et al.*, 2007). Desta forma, as nanopartículas preparadas, caracterizadas, desenvolvidas e testadas neste estudo se apresentam com grande potencial para carregamento de ácidos nucléicos *in vivo*.

A fim de dar continuidade a este trabalho, temos como perspectivas:

- ◆ Avaliar o silenciamento gênico *in vitro* após indução de campo magnético externo;
- ◆ Avaliar a endocitose celular *in vitro* após aplicação de campo magnético externo;
- ◆ Avaliar a presença *in vitro* da proteína VEGF através de *western blot*;
- ◆ Realizar estudos de purificação dos sistemas nanoparticulados para retirar os excessos dos íons em solução para avaliação da eficácia *in vivo*;
- ◆ Avaliar o efeito anti-angiogênico das nanopartículas em embrião de aves;
- ◆ Avaliar a eficácia antitumoral *in vivo* dos sistemas NP1 e NP2;
- ◆ Por fim, avaliar o silenciamento gênico e a expressão da proteína VEGF em tumores sólidos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1-2, p. 178-188, 2006.

ABOU-JAWDE, R. et al. An overview of targeted treatments in cancer. **Clin Ther**, v. 25, n. 8, p. 2121-37, 2003.

ACS. American Cancer Society - Can breast cancer be found early? . Disponível em: < <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-diagnosis> >. Acesso em: 01/12/14 2014a.

_____. American Cancer Society - Types of Breast Cancer. Disponível em: < <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-breast-cancer-types> >. Acesso em: 12/02/15 2014b.

ASHOKAN, A. et al. Multifunctional calcium phosphate nano-contrast agent for combined nuclear, magnetic and near-infrared in vivo imaging. **Biomaterials**, v. 34, n. 29, p. 7143-57, 2013.

BENSON, J. R.; JATOI, I. The global breast cancer burden. **Future Oncol**, v. 8, n. 6, p. 697-702, Jun 2012.

BIESINGER, M. C. et al. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 3, p. 887-898, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433210010287> >.

BOCHICCHIO, S. et al. Liposomes as siRNA Delivery Vectors. **Curr Drug Metab**, 2015.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13, n. 12, p. 1097-1101, 12//print 2006. ISSN 1545-9993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1167> >.

BOSWELL, K. A. et al. Disease burden and treatment outcomes in second-line therapy of patients with estrogen receptor-positive (ER+) advanced breast cancer: a review of the literature. **Breast**, v. 21, n. 6, p. 701-6, 2012.

BREEN, E. C. VEGF in biological control. **J Cell Biochem**, v. 102, n. 6, p. 1358-67, 2007.

BRIANE, D. et al. Inhibition of VEGF expression in A431 and MDA-MB-231 tumour cells by cationic lipid-mediated siRNA delivery. **J Drug Target**, v. 20, n. 4, p. 347-54, 2012.

BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 777-94, 2005.

CARRARO, D. M. et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e57581, 2013.

CHAN, C. P.; GALLARD, H.; MAJEWSKI, P. Fabrication of amine-functionalized magnetite nanoparticles for water treatment processes. In: DIALLO, M.; FROMER, N., *et al* (Ed.). **Nanotechnology for Sustainable Development**: Springer International Publishing, 2014. cap. 11, p.137-147.

CHEKINA, N. et al. Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 7630-7639, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C1JM10621J> >.

CHEN, W. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity evaluation of novel bioreversible phosphate inositol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, n. 0, p. 172-181, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415000859> >.

CHIN, S. F.; IYER, K. S.; RASTON, C. L. Facile and Green Approach To Fabricate Gold and Silver Coated Superparamagnetic Nanoparticles. **Crystal Growth and Design**, v. 9, p. 2685-2689, 2009.

CHOI, K. Y. et al. A nanoparticle formula for delivering siRNA or miRNAs to tumor cells in cell culture and in vivo. **Nat Protoc**, v. 9, n. 8, p. 1900-15, 2014.

COLE, A. J. et al. Magnetic brain tumor targeting and biodistribution of long-circulating PEG-modified, cross-linked starch-coated iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6291-301, 2011.

COLOMBAN, P. Potential and Drawbacks of Raman (Micro) spectrometry for the Understanding of Iron and Steel Corrosion. In: ISBN (Ed.). **New Trends and Developments in Automotive System Engineering**, 2011. cap. 28, p.567-584.

CORN, B. W. Advances in the combination of radiation therapy and chemotherapy against cancer. **Drug News Perspect**, v. 17, n. 10, p. 705-12, 2004.

DANAIEI, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784-93, 2005.

DAVIS, M. E. et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1067-70, Apr 15 2010. ISSN 0028-0836.

DE FOUGEROLLES, A. et al. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 6, p. 443-53, 2007.

DONEPUDI, M. S. et al. Breast cancer statistics and markers. **J Cancer Res Ther**, v. 10, n. 3, p. 506-11, 2014.

DREVS, J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 6, n. 6, p. 7-13, 2008.

ELBASHIR, S. M. et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-8, 2001.

EROLLES, P. et al. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 698-707, 2012.

FIDLER, I. J.; ELLIS, L. M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. **Cell**, v. 79, n. 2, p. 185-8, 1994.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806-11, 1998.

FORNAGUERA, C. et al. Novel non-viral gene delivery systems composed of carbosilane dendron functionalized nanoparticles prepared from nano-emulsions as non-viral carriers for antisense oligonucleotides. **Int J Pharm**, v. 478, n. 1, p. 113-123, 2014.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York: 1987.

GENENTECH, I. Avastin (bevacizumab). Disponível em: < <http://www.gene.com/media/product-information/avastin-lung> >. Acesso em: 13/02/15 2015.

GHAFFARI, A. et al. A novel role for ezrin in breast cancer angio/lymphangiogenesis. **Breast Cancer Res**, v. 16, n. 5, p. 438, 2014.

GRIMM, D. et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 537-41, 2006.

GRIMM, D. et al. Drugs interfering with apoptosis in breast cancer. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 3, p. 272-83, 2011.

GROSVENOR, A. et al. Investigation of multiplet splitting of Fe 2p XPS spectra and bonding in iron compounds. **Surface and Interface Analysis**, v. 36, n. 12, p. 1564-1574, 2004.

GUO, J. et al. Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnol Adv**, v. 29, n. 4, p. 402-17, 2011.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 244-51, Jul 11 2002. ISSN

HAYES, D. F.; MILLER, K.; SLEDGE, G. Angiogenesis as targeted breast cancer therapy. **Breast**, v. 16 Suppl 2, p. S17-9, 2007.

HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 5, p. 1011-27, 2005.

HU, H. et al. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 413, 2009. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/413> >.

HUBBELL, J. A. Materials science. Enhancing drug function. **Science**, v. 300, n. 5619, p. 595-6, 2003.

HUTVAGNER, G.; ZAMORE, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. **Science**, v. 297, n. 5589, p. 2056-60, Sep 20 2002.

IARC. International Agency for Research on Cancer. World cancer report 2008. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp> >. Acesso em: 02/12/14 2008.

INCA. Controle do Câncer de Mama. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Acesso em: 11/02/2015 2012a.

_____. **Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil**: Instituto Nacional de Câncer 2012b.

_____. Estimativa 2014 - Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp> >. Acesso em: 02/02/2015 2013.

_____. Câncer de Mama - Sintomas. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: < <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama+/sintomas> >. Acesso em: 12/12/14 2014a.

_____. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de Mama - Detecção Precoce. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/deteccao_precoce >. Acesso em: 02/12/14 2014b.

_____. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de Mama - Tratamento. Disponível em: < http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/tratamento >. Acesso em: 02/12/14 2014c.

JAFARI, A. et al. Synthesis and characterization of Bombesin-superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a targeted contrast agent for imaging of breast cancer using MRI. **Nanotechnology**, v. 26, n. 7, p. 075101, 2015.

JANA, N. R. et al. Cysteine-functionalized polyaspartic acid: a polymer for coating and bioconjugation of nanoparticles and quantum dots. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6503-7, 2010.

JORALEMON, M. J.; MCRAE, S.; EMRICK, T. PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems. **Chem Commun (Camb)**, v. 46, n. 9, p. 1377-93, 2010.

JOSEPHSON, L. et al. Near-infrared fluorescent nanoparticles as combined MR/optical imaging probes. **Bioconjug Chem**, v. 13, n. 3, p. 554-60, 2002.

KAKIZAWA, Y. 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, 2004.

KAZEMI-LOMEDASHT, F. et al. Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. **Mol Immunol**, v. 65, n. 1, p. 58-67, 2015.

KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials**, v. 33, n. 29, p. 7138-50, 2012.

KIM, H. J. et al. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. **ACS Nano**, v. 8, n. 9, p. 8979-91, 2014.

KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **J Bacteriol**, v. 177, n. 3, p. 491-6, 1995.

KOZLOVA, D.; EPPLÉ, M. Biological targeting with nanoparticles: state of the art. **Bionanomaterials**, v. 14, n. 3-4, p. 161-170, 2013.

LACEY, J. V., JR. et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC Cancer**, v. 9, p. 84, 2009.

LARSEN, P. B.; KUMLER, I.; NIELSEN, D. L. A systematic review of trastuzumab and lapatinib in the treatment of women with brain metastases from HER2-positive breast cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 39, n. 7, p. 720-7, Nov 2013.

LAURENT, S. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 11, n. 9, p. 1449-70, Sep 2014.

LEE, B. L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 3, p. e95-e102, Mar 2012.

- LEE, M. S. et al. Target-specific delivery of siRNA by stabilized calcium phosphate nanoparticles using dopa-hyaluronic acid conjugate. **J Control Release**, v. 192, p. 122-30, Oct 28 2014. ISSN 9.
- LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO J.**, v. 23, p. 4051-4060, 2004.
- LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **Br J Cancer**, v. 93, n. 9, p. 1046-52, 2005.
- LI, M. et al. Comparison of Two Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides on Cytotoxicity and MR Imaging of Tumors. **Theranostics**, Sydney, v. 2, n. 1, p. 76-85, 2012.
- LIEBENS, F. P. et al. Management of BRCA1/2 associated breast cancer: a systematic qualitative review of the state of knowledge in 2006. **Eur J Cancer**, v. 43, n. 2, p. 238-57, 2007.
- LIEDKE, P. E. et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 1, p. 126-33, 2014.
- LUCAS, I. et al. Surface Charge Density of Maghemite Nanoparticles: Role of Electrostatics in the Proton Exchange. **Journal of Physical Chemistry** v. 111, p. 18568 - 18576, 2007.
- LV, H. et al. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **J Control Release**, v. 114, n. 1, p. 100-9, 2006.
- MACKAY, J. R. et al. Controlling angiogenesis in breast cancer: a systematic review of anti-angiogenic trials. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 673-88, Oct 2012.
- MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 1-2, p. 24-46, 2011.
- MAIRA, M. S. et al. 7.01 - Cancer Biology. In: TRIGGLE, J. B. T. J. (Ed.). **Comprehensive Medicinal Chemistry II**. Oxford: Elsevier, 2007. p.1-31.

MALVERN. Zetasizer Nano ZS. Disponível em: <
<http://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs/default.aspx>>. Acesso em: 4 de fevereiro de 2015

MALVEZZI, M. et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? **Ann Oncol**, Jan 26 2015.

MASIERO, M. et al. RNA interference: implications for cancer treatment. **Mol Aspects Med**, v. 28, n. 1, p. 143-66, 2007.

MATRANGA, C. et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 607-20, 2005.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res**, v. 46, n. 12 Pt 1, p. 6387-92, 1986.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, n. 2-3, p. 165-96, 2001.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 343-9, Sep 16 2004.

MIYATA, K.; CHRISTIE, R. J.; KATAOKA, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. **Reactive and Functional Polymers**, v. 71, n. 3, p. 227-234, 2011.

MIYATA, K.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2562-2574, 2012.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 283-318, Jun 2001.

MOJICA PISCIOTTI, M. L. et al. In vitro and in vivo experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: magnetic targeting. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 102, n. 4, p. 860-8, May 2014.

MONAGHAN, M.; PANDIT, A. RNA interference therapy via functionalized scaffolds. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 4-5, p. 197-208, Apr 30 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983a.

_____. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983b. ISSN 0022-1759. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>.

MYKHAYLYK, O. et al. Magnetic nanoparticle and magnetic field assisted siRNA delivery in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 1218, p. 53-106, 2015.

MYKHAYLYK, O. et al. Magnetic nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 275-281, 2007.

NAGY, J. A. et al. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? **Br J Cancer**, v. 100, n. 6, p. 865-9, Mar 24 2009.

ONCOGUIA. Tipos de Câncer de Mama. Insituto Oncoguia. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer-de-mama/1382/34/>>. Acesso em: 02/12/14 2014.

OPINA, A. C. et al. Preparation and long-term biodistribution studies of a PAMAM dendrimer G5-Gd-BnDOTA conjugate for lymphatic imaging. **Nanomedicine (Lond)**, p. 1-15, Nov 13 2014.

ORTEGA JACOME, G. P. et al. Environmental exposure and breast cancer among young women in Rio de Janeiro, Brazil. **J Toxicol Environ Health A**, v. 73, n. 13-14, p. 858-65, 2010.

PALEOS, C. M. et al. Drug delivery using multifunctional dendrimers and hyperbranched polymers. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7, n. 12, p. 1387-98, Dec 2010.

PARETA, R. A.; TAYLOR, E.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast density in the presence of novel calcium phosphate coated magnetic nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 26, p. 265101, Jul 2 2008.

PASUKONIENE, V. et al. Accumulation and biological effects of cobalt ferrite nanoparticles in human pancreatic and ovarian cancer cells. **Medicina (Kaunas)**, v. 50, n. 4, p. 237-44, 2014.

PATIL, Y.; PANYAM, J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. **Int J Pharm**, v. 367, n. 1-2, p. 195-203, Feb 9 2009.

PENET, M. F. et al. MR - eyes for cancer: looking within an impenetrable disease. **NMR Biomed**, v. 26, n. 7, p. 745-55, Jul 2013.

PERRY, J. L. et al. PEGylated PRINT nanoparticles: the impact of PEG density on protein binding, macrophage association, biodistribution, and pharmacokinetics. **Nano Lett**, v. 12, n. 10, p. 5304-10, 2012.

PITTELLA, F.; KATAOKA, K. Polymeric Micelles for siRNA Delivery. In: HOWARD, K. A. (Ed.). **RNA Interference from Biology to Therapeutics**: Springer US, 2013. cap. 8, p.161-184. (Advances in Delivery Science and Technology).

PITTELLA, F. et al. Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. **J Control Release**, v. 161, n. 3, p. 868-74, Aug 10 2012.

PITTELLA, F. et al. Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 3106-14, Apr 2011.

PLANK, C.; ZELPHATI, O.; MYKHAYLYK, O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-progress and prospects. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, n. 14-15, p. 1300-31, Nov 2011.

PUDDU, M. et al. Magnetically deliverable calcium phosphate nanoparticles for localized gene expression. **RSC Advances**, v. 5, n. 13, p. 9997-10004, 2015. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA13413C> >.

RAJI, M. A. et al. Cytotoxicity of synthesized Iron Oxide nanoparticles: Toward novel biomarkers of colon cancer. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc**, v. 2014, p. 6179-82, Aug 2014.

RAND, T. A. et al. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 621-9, Nov 18 2005.

SAFINYA, C. R. et al. Cationic liposome-nucleic acid complexes for gene delivery and gene silencing. **New J Chem**, v. 38, n. 11, p. 5164-5172, Nov 1 2014.

SAINI, K. S. et al. Beyond trastuzumab: new treatment options for HER2-positive breast cancer. **Breast**, v. 20 Suppl 3, p. S20-7, Oct 2011.

SALADO, J. et al. Functionalized Fe(3)O(4)@Au superparamagnetic nanoparticles: in vitro bioactivity. **Nanotechnology**, v. 23, n. 31, p. 315102, Aug 10 2012.

SANTOS, C. et al. Intrinsic cancer subtypes-next steps into personalized medicine. **Cell Oncol (Dordr)**, Jan 14 2015.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol**, v. 23 Suppl 2, p. S60-4, May 2010.

SHEN, M.; SHI, X. Dendrimer-based organic/inorganic hybrid nanoparticles in biomedical applications. **Nanoscale**, v. 2, n. 9, p. 1596-610, Sep 2010.

SHIH, W.-C.; BECHTEL, K. L.; REBEC, M. V. Noninvasive glucose sensing by transtaneous Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 5, 2015.

SIERRA-RESTREPO, J. **Sistemas Biomiméticos na Síntese de Nanopartículas de Ouro para aplicações Biomédicas e Biotecnológicas**. 2015. 102 (Doutorado). Ciência e Engenharia de Materias, Universidade Federal de Santa Catarina

SILVA, A. H. et al. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Sci Total Environ**, v. 432, p. 382-8, Aug 15 2012.

SRINIVASAN, C. et al. Stability characterization and appearance of particulates in a lyophilized formulation of a model peptide hormone-human secretin. **Int J Pharm**, v. 481, n. 1-2, p. 104-113, Jan 27 2015.

STANCA, S. E. et al. Magnetic apatite for structural insights on the plasma membrane. **Nanotechnology**, v. 26, n. 3, p. 035601, Jan 21 2015.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **J Cancer Sci Ther**, v. 1, n. 2, p. 1-4, Dec 1 2009.

SUH, J. et al. PEGylation of nanoparticles improves their cytoplasmic transport. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 735-741, 2007.

SULLIVAN, L. A.; BREKKEN, R. A. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. **MAbs**, v. 2, n. 2, p. 165-75, Mar-Apr 2010.

SUN, C.; LEE, J. S.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 11, p. 1252-65, Aug 17 2008.

SUN, Y. et al. Synthesis of calcium phosphate/GPC-mPEG hybrid porous nanospheres for drug delivery to overcome multidrug resistance in human breast cancer. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 5128-5136, 2012.

TAKAHASHI, H.; SHIBUYA, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, n. 3, p. 227-41, Sep 2005.

TAM, Y. Y.; CHEN, S.; CULLIS, P. R. Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery. **Pharmaceutics**, v. 5, n. 3, p. 498-507, 2013.

TANG, Z. et al. Biodegradable magnetic calcium phosphate nanoformulation for cancer therapy. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 87, n. 1, p. 90-100, May 2014.

THOMAS, C. E.; EHRHARDT, A.; KAY, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 5, p. 346-58, May 2003.

TOMANIN, R.; SCARPA, M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vector transduction. **Curr Gene Ther**, v. 4, n. 4, p. 357-72, Dec 2004.

TOMBACZ, E. et al. Magnetite in Aqueous Medium: Coating its Surface and Surface Coated With It. **Romanian Reports in Physics**, v. 58, n. 3, p. 281-286, 2006.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 2, p. 145-60, Feb 2005.

USKOKOVIC, V.; USKOKOVIC, D. P. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 96, n. 1, p. 152-91, Jan 2011.

VIEIRA, D. S. C. et al. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008.

WALLACE, R. et al. Characterization of ZnO nanoparticle suspensions for toxicological applications. **Journal of Physics: Conference series**, v. 371, p. 12080, 2012.

WATTIAUX, R. et al. Endosomes, lysosomes: their implication in gene transfer. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 41, n. 2, p. 201-8, Mar 30 2000.

WCRF. Breast cancer statistics. World Cancer Fund International. Acesso em: 11/02/2015 2013.

WEN, Z. et al. Nanocasted synthesis of magnetic mesoporous iron cerium bimetal oxides (MMIC) as an efficient heterogeneous Fenton-like catalyst for oxidation of arsenite. **J Hazard Mater**, v. 287c, p. 225-233, Jan 29 2015.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 2, p. 129-138, 02/print 2009.

WHO. **World Health Statistics**. WHO Press. France 2012.

_____. **Position Paper on Mammography Screening**. World Health Organization. Geneva 2014.

_____. What is Cancer? World Health Organization. Disponível em: < <http://www.who.int/cancer/en/> >. Acesso em: 10/02/2015 2015.

WYSOCKI, P. J.; MACKIEWICZ-WYSOCKA, M.; MACKIEWICZ, A. Cancer gene therapy – state-of-the-art. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 7, n. 4, p. 149-155, 2002.

XING, R. et al. Polyaspartic acid coated manganese oxide nanoparticles for efficient liver MRI. **Nanoscale**, v. 3, n. 12, p. 4943-4945, 2011.

YANG, Y.; WANG, H. Perspectives of nanotechnology in minimally invasive therapy of breast cancer. **J Healthc Eng**, v. 4, n. 1, p. 67-86, 2013.

YOMODA, M. et al. Calcium phosphate cement - gelatin powder composite testing in canine models: Clinical implications for treatment of bone defects. **J Biomater Appl**, Dec 30 2014.

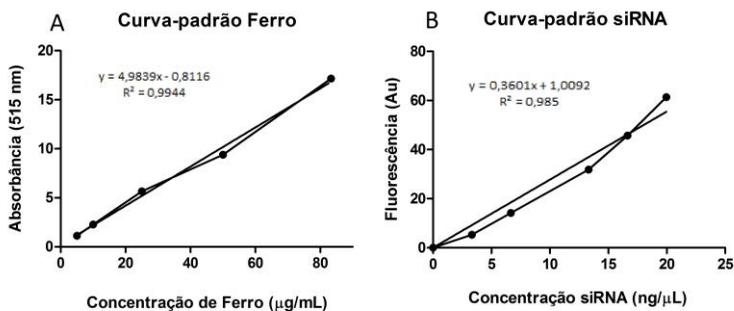
YUE, P. et al. The importance of solidification stress on the redispersibility of solid nanocrystals loaded with harmine. **Int J Pharm**, v. 480, n. 1-2, p. 107-115, Mar 1 2015.

ZENG, H.; DVORAK, H. F.; MUKHOPADHYAY, D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. **J Biol Chem**, v. 276, n. 29, p. 26969-79, Jul 20 2001.

ZHANG, J.; LI, X.; HUANG, L. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. **J Control Release**, v. 190, p. 440-50, Sep 28 2014.

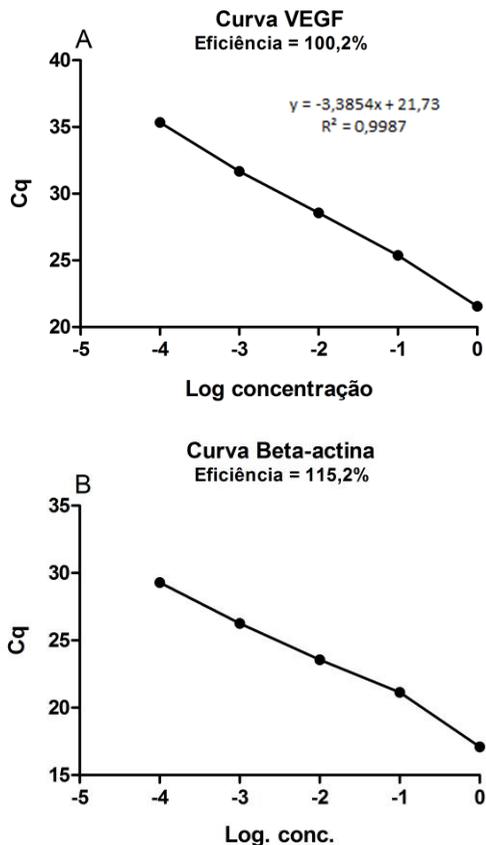
ZHANG, M.; KATAOKA, K. Nano-structure composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **Nano Today**, v. 4, n. 6, p. 508-517, 2009.

APÊNDICE A – Curva-padrão



Curva-padrão de ferro (A) em que o eixo x representa a concentração de ferro em $\mu\text{g/mL}$ e o eixo y a absorbância em nm. O gráfico (B) apresenta a curva-padrão de siRNA em que o eixo x representa a concentração de siRNA em $\text{ng}/\mu\text{L}$ e o eixo y a fluorescência em Au.

APÊNDICE B – Curva de eficiência dos iniciadores



(A) Curva do gene VEGF. (B) Curva do gene de referência Beta-actina. As curvas foram obtidas pela técnica de qPCR utilizando diferentes concentrações de cDNA para todos os pares de iniciadores. A amplificação foi realizada utilizando o *Power SYBR-Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific®) no equipamento StepOnePlus Real-time RT-PCR System (Applied Biosystems®). A eficiência dos iniciadores foi determinada pelo software do equipamento.

APÊNDICE C – Processo de submissão ao INPI para pedido de proteção a propriedade intelectual

Título

Nanopartículas magnéticas com duplo revestimento para carreamento de ácidos nucleicos e moléculas polianiónicas *in vitro* e *in vivo*.

Resumo

Esta invenção refere-se a suspensões de nanopartículas responsíveis ao campo magnético para a complexação, acumulação, transfecção e liberação controlada de moléculas bioativas como ácidos nucleicos e poliânions, de modo *in vitro* ou *in vivo*. As suspensões compreendem propriedades magnéticas de uma classe de nanopartículas que favorecem a vetorização pela aplicação de campo magnético externo; um revestimento intermediário para a complexação de ativos, e um revestimento externo de blocos de copolímero para estabilização das nanopartículas. As suspensões são úteis como nanocarreadores de moléculas ativas, como ácidos nucleicos, incluindo para a transfecção de células. Podem ser utilizadas pela indústria farmacêutica e de cosméticos visando a modulação de efeito biológico para aplicação em humanos e uso veterinário; ser utilizadas como insumo, como agente adjuvante de formulações e de produtos; bem como na ciência básica para a transfecção celular *in vitro*, na pesquisa de vias metabólicas, rotas genéticas e outras.

