

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA)

Ana Beatriz Caribé dos Santos Valle

**EFICIÊNCIA DO COTRATAMENTO COM RNA DE INTERFERÊNCIA E
TAMOXIFENO NO CÂNCER DE MAMA**

JUIZ DE FORA – MG

2024

ANA BEATRIZ CARIBÉ DOS SANTOS VALLE

**EFICIÊNCIA DO COTRATAMENTO COM RNA DE INTERFERÊNCIA E
TAMOXIFENO NO CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

JUIZ DE FORA – MG

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Caribé dos Santos Valle, Ana Beatriz.

EFICIÊNCIA DO COTRATAMENTO COM RNA DE INTERFERÊNCIA E TAMOXIFENO NO CÂNCER DE MAMA / Ana Beatriz Caribé dos Santos Valle. -- 2024.

113 f.

Orientador: Frederico Pittella

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. Nanotecnologia. I. Pittella, Frederico, orient. II. Título.

ANA BEATRIZ CARIBÉ DOS SANTOS VALLE

**EFICIÊNCIA DO COTRATAMENTO COM RNA DE INTERFERÊNCIA E
TAMOXIFENO NO CÂNCER DE MAMA**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em 27 de março de 2024

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Frederico Pittella – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Professor Dr. Gemilson Soares Pontes
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Pesquisadora Dra. Sílvia Ligório Fialho
Fundação Ezequiel Dias

Professora Dra. Sônia Nair Bão
Universidade de Brasília

Dr. Igor Moura de Paiva
AstraZeneca Canadá

Ana Beatriz Caribé dos Santos Valle

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENTREGA DE NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS *IN VITRO*,
SILENCIAMENTO DO GENE HOXB7 *IN VIVO* E COTRATAMENTO COM TAMOXIFENO NA
TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAI) EM CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutora em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Genética e
Biotecnologia.

Aprovada em 27 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Pittella - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Profª. Drª. Silvia Ligório Fialho
Fundação Ezequiel Dias - FUNED

Profª. Drª. Sônia Nair Bão
Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Igor Moura de Paiva

AstraZeneca

Juiz de Fora, 06/03/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Pittella Silva, Professor(a)**, em 01/04/2024, às 14:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gemilson Soares Plontes, Usuário Externo**, em 01/04/2024, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sônia Nair Bão, Usuário Externo**, em 04/04/2024, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Ligorio Fialho, Usuário Externo**, em 05/04/2024, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Igor Moura de Paiva, Usuário Externo**, em 18/04/2024, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1736240** e o código CRC **4310B3B9**.

Dedico este trabalho aos meus amados
pais, Ana Cristina e Raúl.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela vida, oportunidades e por me guiar em todas as fases da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Ana Cristina e Raúl, pelo amor, carinho, cuidado e apoio incondicional. Agradeço pelas inúmeras oportunidades que tive graças a eles e pela base que me passaram e me fizeram ser quem sou. Mesmo que distantes fisicamente, a presença de vocês é imprescindível para o meu sucesso e vocês são minha inspiração de vida. Obrigada por tudo. Amo vocês! Além disso, gostaria de agradecer a minha família pelo total apoio, risadas e companheirismo ao longo desses anos.

Agradeço a Bárbara Kelly, Júlio Mazzoni e David Sander, profissionais maravilhosos que me ajudam/ajudaram a lidar melhor com minha história, minhas emoções, a me conhecer e fazem muita diferença na minha vida e na busca pelo autoconhecimento. Obrigada por me transformarem, cada um na sua área profissional.

Agradeço ao professor Frederico Pittella pela orientação, apoio e otimismo de sempre. Obrigada pelas diversas oportunidades de crescimento profissional. Todos temos muita sorte de te ter como orientador e você é uma grande inspiração!

Agradeço ao pesquisador Sérgio Moya do Centro de Investigação Cooperativa em Biomateriais que me acolheu muito bem no seu laboratório na Espanha durante o meu doutorado sanduíche. Foi uma das melhores experiências da minha vida! Obrigada pela oportunidade e confiança. Agradeço aos colegas do “*Soft Matter Lab*”, Cristian, Maria, Raquel, Bruno, Sofia, Celina e Bow pelos momentos de aprendizado e risadas. Agradeço aos “*roommies*” Armando, Pablo e Cristina por me acolherem no apê e pelos bons momentos durante a minha estadia na Espanha.

Agradeço ao professor Emerson Bernardes do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por me receber em seu laboratório e me proporcionar a oportunidade de realizar o ensaio em modelo animal. Foi uma experiência incrível e agradeço principalmente aos colegas Fábio Fernandes e Maria Ângela pelo cuidado, generosidade, companheirismo e ajuda diária. Obrigada a pesquisadora Camila Longo Machado por nos conectar ao professor Emerson, pela doação de células e valiosas observações sobre o meu projeto.

Agradeço a uma das minhas inspirações da pós-graduação, Ana Gualberto,

pela amizade e parceria. Por me salvar nas dúvidas mais básicas. Por me escutar nos momentos de confusão. Por me incentivar e querer sempre o meu bem pessoal e profissional. Obrigada!

Agradeço ao Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano), meu laboratório do coração, que vi nascer e se desenvolver lindamente. Obrigada aos professores Frederico e Guilherme Diniz por fundarem esse laboratório e sempre pensarem em aprimorá-lo. Obrigada a todos os colegas de laboratório, principalmente a Kézia, Davi, Lívia Mara e Natália pela parceria, ajuda e apoio.

Agradeço a todos os funcionários da UFJF, CIC biomaGUNE e IPEN/USP por sempre estarem dispostos a ajudar e resolver problemas do dia a dia.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CentralBio/UFJF) e a suas técnicas Dani, Jucélia e Lorena pelo apoio e suporte durante os experimentos.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional e acadêmica.

Agradeço a CAPES (Bolsa de Doutorado com nº SEI_23071.915615_2022_29, SEI_23071.938692_2023_27, SEI_23071.939722_2022_31; Bolsa de Doutorado Sanduiche com nº 88881.623470/2021-01), ao CNPq (projeto nº 311195/2022-9 e Universal 435395/2018-1) e a Rede Nanogene: Nanotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas e terapia gênicas, apoiada pela FAPEMIG (nº RED-00053-21) pelo apoio financeiro para realização do projeto.

A todos, muito muito OBRIGADA!

RESUMO

O câncer de mama foi o segundo tipo de câncer mais incidente em 2020 e promoveu a maior taxa de mortalidade ao gênero feminino. O tamoxifeno (TMX) é o medicamento mais comumente utilizado na terapia hormonal do câncer de mama. Com o passar do tempo, observa-se uma queda na efetividade do medicamento devido ao surgimento de resistência por parte das células de câncer. Por outro lado, alguns estudos afirmam que o silenciamento do gene *HOXB7* re-sensibiliza as células de câncer de mama resistentes ao TMX. O silenciamento *HOXB7* pode ser obtido a partir de terapias direcionadas, como a terapia de interferência de RNA (RNAi) que consiste na degradação de *RNAm* através do pareamento específico de pequenas moléculas de RNA interferentes (siRNA). No entanto, a entrega eficaz destas pequenas moléculas depende de agentes de transfecção, como as nanopartículas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de entrega *in vitro* e *in vivo* de moléculas de siRNA a partir de nanopartículas híbridas e avaliar a atividade antitumoral do silenciamento do gene *HOXB7* com e sem o cotratamento com TMX. Nanopartículas de fosfato de cálcio revestidas com PEG (NP) foram produzidas por auto-associação de constituintes. As NP possuíram tamanho aproximado de 74 nm com Pdl de 0,1, morfologia arredondada e homogênea e eficiência de encapsulação de cerca de 50%. Ainda, as NP se mantiveram estáveis por pelo menos 180 dias quando armazenadas a 4 °C e após liofilização ($p > 0,05$). Ademais, possuíram resistência imediata a temperaturas de até 40 °C e se desassociaram frente a condições ácidas. Além disso, NP encapsulando siRNA complementar ao gene *HOXB7* (NP-si*HOXB7*) promoveram leve redução da viabilidade celular em 24 h ($p < 0,05$), enquanto a NP vazia (NP-*mock*) não foi citotóxica ($p > 0,05$). O potencial migratório das células após tratamento com NP-si*HOXB7* foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) a partir de 24 h. Estes dois últimos resultados foram corroborados pelo silenciamento significativo de gene teste *GFP* em células de câncer de pulmão transformadas ($p < 0,05$). A formulação de nanopartículas não apresentou atividade hemolítica ($p > 0,05$). Nenhuma diferença no tamanho e Pdl foram observadas após o procedimento de purificação das nanopartículas ($p > 0,05$). Em modelo de tumor de mama ortotópico e xenográfico em camundongos, foi observado o silenciamento de 50% do gene *HOXB7* no tumor. Embora não tenha sido observada diferença

significativa no volume tumoral entre os grupos tratados em 14 dias na concentração testada, não houve perda de indivíduos no grupo em cotratamento, diferente do grupo controle. Adicionalmente, a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos mostram que o tratamento com TMX foi apenas levemente tóxico, e que o cotratamento reduziu estes efeitos. Diante destes resultados, pode-se concluir que o nanocarreador foi considerado eficiente na entrega do siRNA tanto em células como em modelo animal e é um candidato promissor na entrega intravenosa de material genético. Um maior número amostral e a variação de concentração teste devem ser consideradas para expandir a análise do efeito antitumoral promovido pelo silenciamento do gene *HOXB7* e seu cotratamento com TMX.

Palavras-chave: HOXB7, terapia por RNAi, fosfato de cálcio, siRNA, nanocarreador

ABSTRACT

Breast cancer was the second most common type of neoplasia in 2020 and caused the highest mortality rate among women. Tamoxifen (TMX) is the most used drug in hormone therapy against breast cancer. Over time, a drop in the effectiveness of the drug has been observed due to the emergence of resistance on the part of cancer cells. On the other hand, some studies claim that silencing of *HOXB7* gene resensitizes breast cancer cells resistant to TMX. *HOXB7* silencing can be achieved through targeted therapies, such as RNA interference therapy (RNAi), which consists of mRNA degradation through specific pairing of small interfering RNA molecules (siRNA). However, effective delivery of these small molecules depends on transfection agents such as nanoparticles. Thus, the objective of this thesis was to evaluate the in vitro and in vivo delivery efficiency of siRNA molecules from hybrid nanoparticles and to evaluate the antitumor activity of *HOXB7* gene silencing with and without co-treatment with TMX. PEG-coated calcium phosphate (NP) nanoparticles were produced by self-association of constituents. The NP had approximately 74 nm with a Pdl of 0,1, a rounded and homogeneous morphology and an encapsulation efficiency of 50%. Furthermore, the NP remained stable for at least 180 days if stored at 4 °C and after freeze-drying ($p>0.05$). Also, they were immediately resistant to temperatures of up to 40 °C and faced disassociation in acidic conditions. Furthermore, NP encapsulating siRNA complementary to the *HOXB7* gene (NP-si*HOXB7*) promoted a slight reduction in cell viability in 24 h ($p<0.05$), while empty NP (NP-mock) was not cytotoxic ($p>0.05$). The migratory potential of cells after NP-si*HOXB7* treatment was significantly reduced ($p<0.05$) after 24 h. These last two results were corroborated by significant silencing of the GFP gene in transformed lung cancer cells ($p<0.05$). The nanoformulation did not present hemolytic activity ($p>0.05$). No difference in size and Pdl were observed after NP purification ($p>0.05$). In an orthotopic and xenographic breast tumor model in mice, *HOXB7* gene silencing of 50% was observed in tumor tissue. Although no significant difference in tumor volume was observed between the groups treated in 14 days at the concentration tested, there was no loss of individuals in the co-treatment group, unlike the control group. Additionally, the evaluation of hematological and biochemical parameters shows that TMX treatment was slightly toxic. Given these results, it can be inferred that the nanocarrier was considered efficient in delivering siRNA both in cells and in animal models and is a promising candidate for intravenous delivery of genetic

material. A larger sample size and variation in test concentration must be considered to expand the antitumor effect analysis promoted by *HOXB7* gene silencing and its co-treatment with TMX.

Keywords: interfering RNA, RNAi therapy, calcium phosphate, siRNA, nanocarrier

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estimativa de crescimento das taxas de incidência e mortalidade do gênero feminino em relação ao câncer de mama de 2022 a 2050.	19
Figura 2 - Processo de carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.	21
Figura 3 - Via de ação do tamoxifeno	27
Figura 4 - Organização dos genes <i>HOX</i> em clusters	29
Figura 5 - Vias metabólicas em que o gene <i>HOXB7</i> está envolvido.	31
Figura 6 - Relação entre tamoxifeno e <i>HOXB7</i> na via de sinalização de câncer de mama resistente ao TMX.	34
Figura 7 - Vias de ação do <i>HOXB7</i> associado a possíveis estratégias terapêuticas na sensibilização do câncer de mama ao TMX.	36
Figura 8 - Mecanismo de interferência por RNA e sua utilização na terapia por RNAi	38
Figura 9 - Barreiras intrínsecas e biológicas encontradas pelo siRNA	41
Figura 10 - Desafios para o desenvolvimento e comercialização de nanomedicamentos. ...	46
Figura 11 - Mecanismo de ação passivo das nanopartículas através do efeito de permeabilidade de retenção aumentada (EPR)	51
Figura 12 - Representação esquemática da classificação dos nanocarreadores	53
Figura 13 - Representação da nanopartícula híbrida formada pelo núcleo inorgânico composto por fosfato de cálcio, com siRNA complexado, e pelo revestimento orgânico de bloco de copolímero PEG-poliânion.	55
Figura 14 - Representação de internalização e escape endossomal promovido pelas NP... ..	57
Figura 15 - Curva de distribuição de tamanho por intensidade das NP com siRNA encapsulado. Histograma de nove leituras de três NP independentes.	71
Figura 16 - Curva de distribuição de tamanho por intensidade das NP sem siRNA encapsulado. Histograma de nove leituras de três NP independentes.	71
Figura 17 - Imagens representativas das formulações (A e B) NP-siRNA e (C e D) NP branca obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.	74
Figura 18 - Curva de calibração para quantificação da eficiência de encapsulação de siRNA <i>HOXB7</i> nas NP.	76
Figura 19 - Pré-ensaio de estabilidade coloidal de nanopartículas híbridas encapsulando (NP-siRNA) ou não (<i>NP-mock</i>) siRNA por 180 dias em relação ao tamanho (preto) e Pdl (vermelho).	77
Figura 20 - Estabilidade (tamanho e Pdl) de NP encapsulando (NP-siRNA, quadrado) ou não (<i>NP-mock</i> , círculo) siRNA em diferentes condições de pH. Tamanho (preto) e Pdl (vermelho)	79
Figura 21 - Estabilidade coloidal (tamanho e Pdl) de nanopartículas híbridas encapsulando (NP-siRNA, quadrado) ou não (<i>NP-mock</i> , círculo) siRNA em diferentes temperaturas. Tamanho (preto) e Pdl (vermelho).	80
Figura 22 - Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em (A) 24h e (B) 48h em células de câncer de mama MCF7.	83
Figura 23 - Ensaio de cicatrização após tratamento com NP-si <i>HOXB7</i> , <i>NP-mock</i> e si <i>HOXB7</i> após 6h, 24h e 48h. (A) Gráfico da área livre e (B) Fotos representativas.	83
Figura 26 - Expressão gênica do gene <i>GFP</i> em célula A549- <i>GFP</i> após tratamento com NP-siRNA e siRNA livre complementar ao gene <i>GFP</i> . (A) Dot-plot e histograma de citometria de fluxo e (B) Gráfico com análise estatística	85
Figura 27 - Ensaio de hemólise após incubação com diferentes concentrações de NP-siRNA e <i>NP-mock</i> . (A) Imagem visual, (B) porcentagem de hemólise por UV/Vis e (C) imagem microscópica.	87
Figura 28 - Avaliação da atividade antitumoral em camundongos NUDE tratados com NP-si <i>HOXB7</i> , cotratamento e TMX livre. Variação do volume tumoral no (A) Ensaio 1 e (C) Ensaio 2. Variação da massa corporal no (B) Ensaio 1 e (D) Ensaio 2. As setas representam os dias de tratamento. O símbolo \$ representa morte.	91

Figura 29 – Taxa de sobrevivência do ensaio antitumoral. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2 e (C) Imagem dos animais no Ensaio 1.	93
Figura 30 - Curva de eficiência dos primers para os genes da β -Actina humana (verde) e do <i>HOXB7</i> (azul). (A) qPCR 1 (B) qPCR 2.....	95
Figura 31 - Expressão do gene <i>HOXB7</i> em carcinoma mamário humano em modelo animal murino NUDE.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação molecular dos quatro principais subtipos de câncer de mama e sua relação com resposta a terapias	24
Tabela 2 - Critérios mais considerados nos estudos de desenho de siRNA.....	39
Tabela 3 - Classificação de nanomateriais de acordo com sua dimensionalidade.	44
Tabela 4 - Nanomedicamentos para câncer comercialmente disponíveis e aprovadas pela FDA e EMA.....	47
Tabela 5 - Nanoformulações baseadas em RNAi atualmente aprovadas pelo FDA e EMA e disponíveis comercialmente.....	58
Tabela 6 - Condições da reação de qPCR para o gene <i>HOXB7</i>	68
Tabela 7 - Características da molécula de siRNA.....	70
Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta das nanopartículas híbridas.....	72
Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico e Pdl de NP-siRNA e <i>NP-mock</i> no início e fim do estudo de estabilidade coloidal.....	78
Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico e Pdl de <i>NP-mock</i> antes e após o processo de liofilização utilizando ou não o lioprotetor sacarose.	81
Tabela 11 - Diâmetro hidrodinâmico e Pdl de <i>NP-mock</i> após o processo de liofilização utilizando ou não o lioprotetor sacarose e após 10 dias de resuspensão.....	81
Tabela 12 - Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão (Pdl) das nanopartículas híbridas após purificação.....	89
Tabela 13 - Estabilidade a curto prazo das nanopartículas híbridas após purificação.....	90
Tabela 14 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos de cotratamento e TMX.	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>4EBP1</i>	Gene fator de iniciação eucariótico 4E ligante a proteína 1
AF-1	Ativador de função 1
AF-2	Ativador de função 2
Ago2	Argonauta 2
AKT	Oncogene V-akt viral de timoma murino homólogo
<i>Ang-2</i>	Gene angiogenina 2
ANOVA	Análise de variância
ATCC	Coleção americana de tipos de cultura (do inglês <i>American Type Culture Collection</i>)
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês <i>BasicLocal Alignment Search Tool</i>)
<i>CCND1</i>	Gene ciclina D1
<i>CD31</i>	Gene molécula 1 de adesão celular endotelial e de plaqueta
<i>COX-2</i>	Gene subunidade 2 oxidase do citocromo C
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (do inglês <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	DNA complementar
<i>EGFR</i>	Gene receptor do fator de crescimento epidermal
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
ERE	Elemento de resposta ao estrogênio
FDA	Administração de comidas e drogas (do inglês <i>Food and Drug Administration</i>)
<i>FGF</i>	Gene fator de crescimento de fibroblasto
<i>FGF2</i>	Gene fator 2 de crescimento de fibroblasto
<i>FGFR</i>	Gene receptor do fator de crescimento de fibroblasto
<i>GREB1</i>	Gene receptor de ligação 1 da regulação de crescimento do estrogênio
<i>GROα</i>	Oncogene α relacionado ao crescimento
HEPES	Ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico]

<i>HER2</i>	Gene receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2
<i>HOX</i>	Gene <i>homeobox</i>
<i>HOXB7</i>	Gene <i>homeobox B7</i>
<i>IL-8</i>	Gene isoleucina-8
Ki67	Marcador de proliferação Ki67
<i>MAPK</i>	Gene proteínas quinase ativadas por mitógenos
MET	Microscopia de transmissão eletrônica
MiRNA	microRNA
<i>MMP9</i>	Gene metaloproteinase de matriz 9
MMP	Metaloproteinases de matriz
Mock	Nanopartícula sem siRNA
MTT	Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio
MWCO	Corte de peso molecular (do inglês <i>Molecular Weight Cut-Off</i>)
MYC	Oncogene mielocitomatose
Naked	siRNA livre
NP	Nanopartícula
PdI	Índice de polidispersividade
PEG	Polietilenoglicol
PEG-Glu	Polietilenoglicol-poliânion-ácido glutâmico
pH	potencial de hidrogênio
PIWI	Gene testículos Wimpy induzidos por Elemento P
PTK	Proteínas tirosina quinase
qPCR	PCR quantitativo ou PCR em tempo real
<i>Raf</i>	Proto-oncogene proteína serina/treonina quinase
<i>Ras</i>	Gene vírus sarcoma RAt (do inglês <i>RAt Sarcoma vírus</i>)
RE	Receptor de estrogênio
Re α	Receptor de estrogênio α
<i>RhoA</i>	Gene homólogo da família Ras, membro A
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA interferente
RNA _m	RNA mensageiro
RP	Receptor de progesterona

<i>S6K</i>	Gene proteína quinase ribossomal S6
Scramble	Sequência de siRNA não complementar
SFB	Soro fetal bovino
<i>siHOXB7</i>	Pequeno RNA interferente do gene <i>HOXB7</i>
siRNA	Pequeno RNA interferente
SMAD3	Gene membro 3 da família SMAD
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
<i>TGFβ</i>	Gene fator de crescimento de transformação beta
<i>TGFβ2</i>	Gene fator de crescimento de transformação beta 2
TMX	Tamoxifeno
<i>TRBP</i>	Gene proteína ligadora de RNA TAR
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
TRIS-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano ajustado com ácido clorídrico
<i>TTR</i>	Gene/proteína transtirretina
<i>VEGF</i>	Fator de crescimento endotelial vascular

°C	Graus Celsius
kDa	kilodalton
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
M	Molar
mL	Mililitro
mV	Milivolts
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÂNCER DE MAMA.....	19
2.1.1 Fatores de riscos, carcinogênese e metástase no câncer de mama	20
2.1.2 Classificação histopatológica e molecular do câncer de mama	22
2.1.3 Diagnóstico e tratamentos convencionais para o câncer de mama	24
2.2 TAMOXIFENO E <i>HOXB7</i> : A COMBINAÇÃO CONTRA O CÂNCER DE MAMA RECEPTOR DE HORMÔNIO POSITIVO.	26
2.2.1 Tamoxifeno	26
2.2.2 O gene <i>HOXB7</i>	
2.2.3 Relação entre tamoxifeno e <i>HOXB7</i>	33
2.3 MECANISMO E TERAPIA DE RNA POR INTERFERÊNCIA (RNAi)	36
2.3.1 Otimização da terapia por RNAi: design de moléculas de siRNA	39
2.3.2 Barreiras biológicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> na administração de moléculas de siRNA	41
2.4 NANOTECNOLOGIA E O USO DAS NANOPARTÍCULAS COMO <i>DELIVERY</i> <i>SYSTEM</i>	43
2.4.1. Aspectos Gerais na Eficiência de Entrega do Nanocarreador	50
2.4.2. Nanopartículas Híbridas: fosfato de cálcio e polietilenoglicol (PEG)	53
2.4.3 Nanoformulações e a terapia de RNAi	57
3 OBJETIVOS	59
3.2 OBJETIVO GERAL	59
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
4 MATERIAIS E MÉTODOS	60
4.2 MATERIAIS	60
4.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS	60
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS	61
4.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho, do índice de polidispersão e do potencial Zeta das nanopartículas híbridas	61
4.3.2 Determinação da morfologia das nanopartículas	62
4.3.3 Eficiência de encapsulação de siRNA.....	62
4.3.4 Estabilidade coloidal das nanopartículas.....	63
4.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	63
4.4.1. Viabilidade Celular.....	64

4.4.2. Ensaio de Cicatrização (<i>Wound Healing</i>).....	64
4.4.3. Eficiência de Efeito de RNAi: ensaio GFP.....	65
4.4.4. Hemólise 65	
4.5. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	66
4.5.1. Preparação do Modelo Animal de Tumor de Mama	66
4.5.2. Atividade Antitumoral	67
4.5.3. Avaliação da Expressão Gênica	67
4.5.4. Avaliação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	68
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS..	70
5.1.1 Distribuição de tamanho, diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (Pdl) e concentração de NP.....	70
5.1.2 Morfologia das nanopartículas híbridas.....	74
5.1.3 Eficiência de encapsulação	75
5.1.4 Pré-ensaio de estabilidade coloidal	76
5.2 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	82
5.2.1 Viabilidade Celular.....	82
5.2.2 Ensaio de Cicatrização (<i>Wound Healing</i>).....	83
5.2.3 Eficiência do Efeito de RNAi: ensaio GFP	85
5.2.4 Hemólise 87	
5.3 ENSAIO <i>IN VIVO</i>	89
5.3.1 Purificação das Nanopartículas Híbridas.....	89
5.3.2 Atividade Antitumoral	90
5.3.3 Avaliação da Expressão Gênica	94
5.3.4 Avaliação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos	96
6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	100
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome genérico de um conjunto de doenças de aspecto multifatorial que causam aproximadamente 10 milhões de óbitos por ano mundialmente (Bray et al., 2024). O câncer de mama foi o segundo e terceiro tipo mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo, respectivamente, e aquele que mais causou mortes no gênero feminino em 2022 (Brasil, 2022; Bray et al., 2024). Apesar dos avanços obtidos em termos de prevenção, diagnóstico precoce e tratamentos, as taxas de incidência e mortalidade crescem a cada ano (Brasil, 2019; Brasil, 2022; WHO, 2022). Além disso, dentre o total de casos relacionados ao câncer de mama, 70% são do subtipo molecular luminal, expressor de receptor de hormônio, o que evidencia a importância do estudo deste subtipo (Nascimento; Otoni, 2020).

Diversos são os tipos de tratamentos direcionados para esta doença, e podem ser classificados em locais, aqueles que agem no local a ser tratado, ou sistêmicos, aqueles que exigem a administração de fármacos pela via sistêmica, como a quimioterapia e a hormonioterapia. Atualmente, a droga mais utilizada na terapia hormonal é o tamoxifeno (TMX). O TMX é um modulador seletivo do receptor de estrogênio e, na mama, ele tem uma função antagonista, isto é, bloqueia a cascata de sinalização de proliferação celular desencadeada pela ligação do estrogênio ao seu receptor. Apesar da contribuição que o TMX promoveu na sobrevivência de pacientes portadores desse subtipo tumoral (Jordan, 2007), existe uma elevada taxa de desenvolvimento de resistência de células cancerígenas a esta droga, além de diversos efeitos colaterais em tecidos saudáveis (ACS, 2024). Ainda, estudos reportam relação entre a resistência à ação do TMX com a superexpressão do gene *HOXB7* em células de câncer de mama do subtipo Luminal A.

Os genes da família *Homeobox* codificam fatores de transcrição que possuem papel crucial na embriogênese, no entanto é comum observar alteração na expressão dessa família em anomalias neoplásicas (Shah; Sukumar, 2010). Dentre os genes integrantes, o *HOXB7* age em diversas vias metabólicas do câncer tornando-o um bom alvo terapêutico. Dentre estas vias, pode-se citar a proliferação celular, angiogênese, invasão, reparo do DNA, sobrevivência celular e resistência a drogas, como TMX (Care et al., 1996; Wu et al., 2006; Jin et al., 2012; Rubin et al., 2007).

Desta forma, o silenciamento do gene *HOXB7* a partir de terapias de caráter específico como a terapia por RNA interferente (RNAi) é uma alternativa promissora no combate ao câncer de mama receptor de hormônio positivo, além do mesmo combinado a administração de concentrações subtóxicas de TMX (Jin *et al.*, 2015). No entanto, a molécula de siRNA possui características intrínsecas que a impossibilitam de serem entregues de forma eficaz às células, além de enfrentar outras barreiras extracelulares, como nucleases e sistema fagocítico mononuclear (Guo *et al.*, 2011). Assim, a utilização de agentes para transfecção se torna imprescindível.

Dentre eles, os nanocarreadores ganham destaque por permitir especificidade de alvo (Pittella *et al.*, 2011), além de causar redução significativa da toxicidade e resposta imune. As nanopartículas de fosfato de cálcio revestidas com polietilenoglicol (PEG) são uma opção promissora por apresentar biocompatibilidade e facilidade de produção por auto-associação, não utilizar solventes orgânicos e apresentar ótima eficiência de entrega (Kakizawa; Kataoka, 2002).

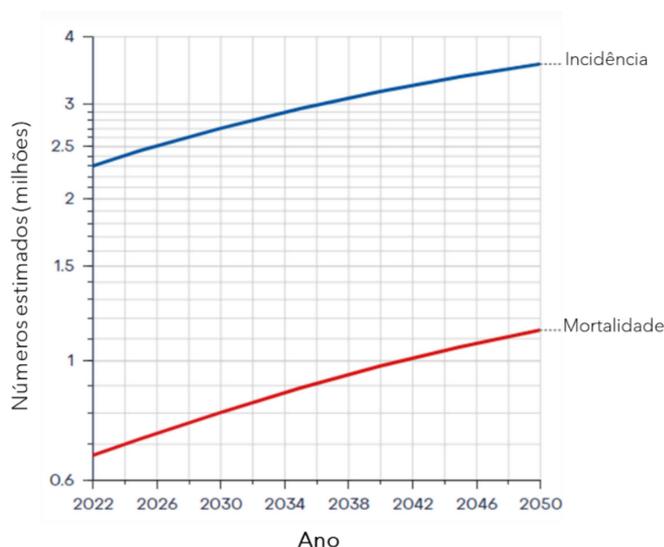
Diante do exposto, o presente estudo é uma continuação de trabalhos anteriores (Valle, 2019) e visa a otimização e determinação da eficiência de entrega do siRNA *in vitro* e *in vivo* a partir das nanopartículas híbridas e análise da atividade antitumoral promovida pelo siRNA complementar ao gene *HOXB7*, assim como avaliação da sua expressão gênica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O CÂNCER DE MAMA

O câncer é definido como um grupo de doenças que possuem em comum o crescimento e proliferação celular descontrolado e que causam severos impactos na saúde humana. De acordo com a última atualização mundial (2022), aproximadamente 18 milhões de novos casos foram diagnosticados e quase 10 milhões de óbitos foram registradas devido a essa doença. Neste mesmo ano, o câncer de mama foi o segundo tipo com maior incidência no mundo (excluindo câncer de pele não melanoma), a quarta maior taxa de mortalidade entre homens e mulheres e a primeira, se considerado apenas o gênero feminino. Em números, o câncer de mama foi responsável por $\frac{1}{4}$ dos novos casos totais (2,3 milhões) e por 670 mil óbitos mundialmente (Bray et al., 2024). Além disso, dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram uma crescente significativa nas taxas de incidência e mortalidade de pacientes até o ano de 2045 (Figura 1), cujas estimativas chegam a 3,4 e 1,1 milhão de casos, respectivamente (WHO, 2022).

Figura 1 - Estimativa de crescimento das taxas de incidência e mortalidade do gênero feminino em relação ao câncer de mama de 2022 a 2050.



Fonte: WHO, 2022

No Brasil, o câncer de mama também ocupava a primeira posição em incidência em 2020 (exceto câncer de pele não melanoma), representando 29,7% do total de novos casos de câncer no país. Estimativas apontavam que entre 2020-2022 seriam diagnosticados 66 mil novos casos por ano (Brasil, 2019). Esse número aumentou para 73,6 mil casos por ano (30,1%) para o atual triênio 2023-2025 (Brasil, 2022). Ainda, de acordo com o último senso realizado para taxa de mortalidade do câncer, essa condição é responsável por 12,64% de todos os óbitos registrados no Brasil. Ademais, o câncer de mama é considerado o tipo que mais provoca óbitos entre mulheres no país (Brasil, 2021).

2.1.1 Fatores de riscos, carcinogênese e metástase no câncer de mama

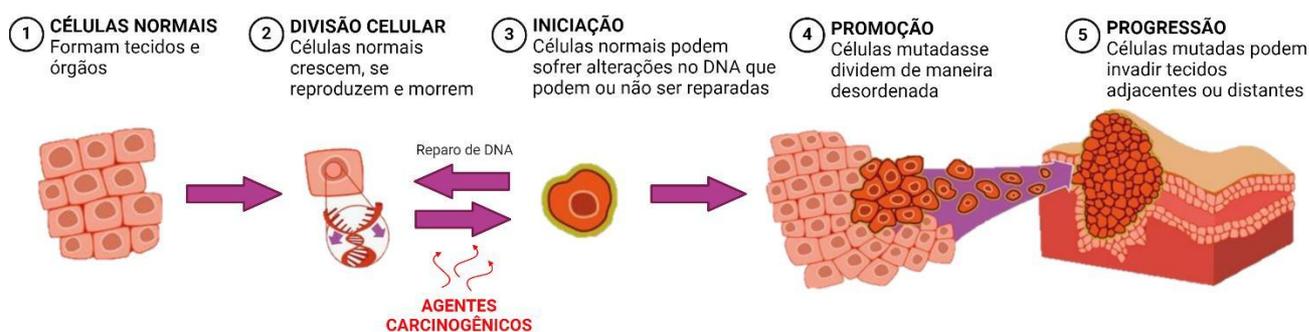
O câncer de mama é uma doença multifatorial, e por isso, a origem desta condição pode ser atribuída a fatores hereditários e/ou a fatores ambientais e comportamentais, desencadeados pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos. Neste contexto, apenas 5 a 10% dos casos de câncer de mama são atribuídos ao fator genético e histórico familiar (Sun et al., 2017). Dentre eles, 30 a 50% de todos os casos de origem hereditária correspondem a mutações dos genes *BRCA 1* e *BRCA 2*. Outras mutações associadas à gênese de neoplasias também já foram observadas nos genes *PALB2*, *CHEK2*, *BARD1*, *ATM*, *RAD51C*, *RAD51D*, *TP53* e *PTEN* (Brasil, 2023; Sun et al., 2017).

No entanto, o surgimento da maioria dos casos de câncer de mama está vinculado a uma combinação de fatores ambientais e comportamentais. Dentre os diversos fatores de risco associados ao câncer de mama, os principais são o sexo e a idade. Mulheres acima de 50 anos são mais suscetíveis ao desenvolvimento dessa doença, e apenas 1% dos casos de câncer de mama acometem homens. Isso se deve a fatores endócrinos como a longa exposição ao estrogênio a partir da menarca precoce, menopausa tardia e uso de contraceptivos orais. Outros fatores ambientais comuns são obesidade, ingestão de álcool, exposição à radiação ionizante, tabagismo e sedentarismo (Sun et al., 2017).

O surgimento de uma célula cancerígena se dá a partir de mutações gênicas, sejam elas hereditárias ou adquirida devido a exposição aos fatores de risco

previamente mencionados. No entanto, nem toda mutação irá progredir para a formação do tumor, fenômeno este denominado de carcinogênese ou oncogênese (Figura 2). Dentre milhões de alterações genéticas que um ser humano acumula durante sua vida, mutações significativas que irão progredir para o surgimento do câncer são raras e devem ocorrer inativando os genes supressores de tumor ou ativando os proto-oncogenes. Quando ativados, estes se chamarão oncogenes e serão responsáveis pela transformação, multiplicação e sobrevivência das células cancerígenas. Assim, a carcinogênese pode ser dividida em três estágios: iniciação, promoção e progressão (Polyak, 2007).

Figura 2 - Processo de carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024), adaptado de Hospital Hélio Angotti.

No estágio inicial a expressão dos genes já se encontra alterada e as células respondem de maneira aumentada a diferentes estímulos. Já no segundo estágio, as células iniciadas acumulam alterações devido a exposição contínua ao agente cancerígeno (oncopromotores) e é caracterizada pelo início da expansão celular e conversão maligna. Por fim, a progressão desse fenômeno é caracterizada pelo aumento da multiplicação descontrolada e irreversível das células malignas, que adquirem características cada vez mais agressivas (Polyak, 2007).

Após o estabelecimento tumoral, as células cancerígenas podem se espalhar pelo corpo ao invadir tecidos adjacentes ou tecidos distantes. Isso ocorre a partir de três vias: tecidual, sanguínea e a partir dos linfonodos. Na primeira, as células invadem áreas de tecidos subjacentes mantendo características anatômicas do tumor de origem. Já nas duas últimas vias, as células doentes atravessam o corpo e podem chegar a locais mais distantes a partir da via sanguínea e do sistema linfático,

respectivamente, o que caracteriza o fenômeno metastático (Polyak, 2007).

Dessa forma, o efeito cumulativo das alterações genéticas confere capacidades biológicas vantajosas às células tumorais, e são conhecidas como os *hallmarks* do câncer. Atualmente, são dez características que constituem esse conceito: sustentação do sinal de proliferação, evasão dos supressores de crescimento, evasão do sistema imune, imortalidade reprodutiva, inflamação promovida pelo ambiente tumoral, ativação de mecanismos de invasão e metástase, indução a angiogênese, instabilidade genômica e mutações, resistência a morte celular e desregulação do metabolismo celular (Hanahan, 2022).

Normalmente, pelo menos uma destas características estão presentes nas células cancerígenas. No entanto, a progressão tumoral pode levar ao surgimento de subpopulações que contenham características distintas da massa tumoral original. Por isso, é dito que o câncer é uma doença heterogênea e complexa. Essa heterogeneidade pode ser confirmada a partir da determinação da classificação dos subtipos histopatológicos e moleculares e testes diagnósticos, que estão diretamente ligados a escolha de um tratamento mais adequado (Hanahan, 2022).

2.1.2 Classificação histopatológica e molecular do câncer de mama

A Conferência Internacional de Câncer de Mama de St. Gallen, ocorrida no início da década de 2010 foi um marco para a nova classificação dos subtipos de câncer de mama. Em seguida, a própria OMS publicou um material que trazia a nova classificação baseada em aspectos moleculares, visto que a classificação histopatológica utilizada era insuficiente, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico poderiam apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia (Goldhirsch *et al.*, 2011; Sierra *et al.*, 2014).

Em resumo, anteriormente aos anos 2000, o câncer de mama era classificado apenas de acordo com características morfológicas e histológicas. Essa classificação é baseada no local de origem da condição maligna, seja em células epiteliais dos ductos ou dos lóbulos mamários. Outro parâmetro classificatório é o nível de confinamento dessas células malignas, isto é, se elas permanecem no local de origem (*in situ*) ou se elas adquirem um caráter migratório (invasivo). Dessa forma, os quatro

tipos histológicos básicos do câncer de mama são os tipos ductal *in situ*, ductal invasivo, lobular *in situ* e lobular invasivo. A condição *in situ*, normalmente não gera sintomas nem fatalidades. No entanto, ao longo do tempo os cânceres podem progredir e se tornarem invasivos, não só tomando o tecido mamário, mas também migrando para outros tecidos (Nascimento, Otoni, 2020).

No entanto, devido à alta heterogeneidade do câncer de mama, atualmente é impossível prever o real comportamento da patofisiologia do câncer, assim como os tratamentos mais eficazes para eles apenas com a classificação histológica. Por isso, a partir dos anos 2000, o estudo do câncer de mama baseado em técnicas moleculares ganhou força, e atualmente, a classificação molecular de seus subtipos possui papel importante no diagnóstico e cura desta condição. Esta classificação é realizada a partir da análise de expressão gênica e análise imuno-histoquímica que verificam a presença de alguns marcadores moleculares. Os principais marcadores analisados são os receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2) e Ki67, uma proteína expressa nas fases do ciclo celular, que indica proliferação celular (Goldhirsch *et al.*, 2011). No entanto, a necessidade de maiores informações quanto a riscos de recorrência, prognóstico detalhado e eficiência de terapias adjuvantes pressionou o desenvolvimento de testes de verificação múltipla de genes que podem prever com mais detalhes e assertividade os parâmetros acima listados (Nascimento; Otoni, 2020).

Apesar dos recentes questionamentos quanto a classificação molecular do câncer de mama, a partir de 2010 os principais subtipos moleculares foram descritos: triplo-negativo, HER2, Luminal A e Luminal B (Tabela 1). O Triplo-negativo é o tipo mais agressivo e possui altas taxas de proliferação e de metástase. Suas principais características moleculares são ausência dos três principais receptores analisados (RE, RP e HER2). O tipo Superexpressor de HER2, no entanto, possui a duplicação da expressão deste gene e ausência de RE e RP. Além disso, apresenta alta taxa de proliferação, também levando a um prognóstico ruim. Os subtipos Luminal são caracterizados por expressarem os receptores hormonais. O Luminal A possui origem no epitélio luminal dos ductos e apresenta taxa de proliferação reduzida (abaixo de 14%) e ausência de receptor HER2. É o subtipo mais comum e com melhor prognóstico. Por fim, o subtipo Luminal B difere do anterior devido a oscilação de expressão dos RP e de HER2 e taxa de proliferação acima de 14% (Goldhirsch *et al.*,

2011; Eroles *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2014; Barros; Leite, 2015, Nascimento; Otoni, 2020), o que resulta em um pior prognóstico (Eroles *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Classificação molecular dos quatro principais subtipos de câncer de mama e sua relação com resposta a terapias

Subtipos Moleculares	Triplo-Negativo	Hiperexpressor de HER2	Luminal A	Luminal B	
				HER2+	HER2-
Biomarcadores	RE- RP- HER2- Ki67 alto	RE- RP- HER2+ Ki67 alto	RE+ RP+ HER2- Ki67 baixo	RE+ RP- HER2- Ki67 alto	RE+ RP-/+ HER2+ Ki67 baixo/alto
Frequência (%)	10-20	15-20	40-50	20-30	
Prognóstico	Ruim	Ruim	Bom	Intermediário	
Responsividade Terapêutica	Quimioterapia	Quimioterapia	Endócrina	Quimioterapia Endócrina	

Fonte: Elaborado pela autora (2024), traduzido de Nascimento; Otoni, 2020.

É importante destacar, que o tipo molecular do câncer, pode ser uma característica determinante na escolha do tratamento mais eficaz (Nascimento; Otoni, 2020), aumentando as chances de cura principalmente em casos de diagnóstico precoce.

2.1.3 Diagnóstico e tratamentos convencionais para o câncer de mama

O “Outubro Rosa” é um movimento internacional de conscientização para o controle do câncer de mama e foi criado no início da década de 1990 pela Fundação *Susan G Komen for the Cure* nos Estados Unidos. Esse movimento busca orientar a população sobre o câncer de mama e destaca a importância da detecção precoce, a fim de contribuir para a redução da incidência e da mortalidade pela doença. Além disso, outras estratégias como o rastreamento ativo realizado pelos sistemas de saúde públicos através da mamografia reforçam o comprometimento dos países no enfrentamento a doença (Brasil, 2023).

Além da mamografia, os métodos mais utilizados na detecção da doença são o ultrassom da mama, ressonância magnética e a biópsia. Esses métodos, no entanto, não determinam se as células cancerígenas estão restritas ao local primário ou se já invadiram outros tecidos. Para isso, são realizados exames complementares, como biópsia de linfonodo sentinela, raio-X, cintilografia óssea e tomografia computadorizada. Além disso, testes específicos devem ser realizados para determinar as características histopatológicas e moleculares do câncer, como a análise de lâminas histopatológicas a partir de material coletado em biópsia, testes que determinam a quantidade de receptores hormonais e HER2 no tecido mamário e testes multigênicos. Em conjunto, estes exames são necessários para a determinação do prognóstico do paciente, isto é, a probabilidade de cura, assim como na escolha do tratamento mais eficaz (Moo et al., 2018; NIH, 2023).

Os procedimentos mais utilizados para o tratamento de câncer de mama são didaticamente divididos em locais e sistêmicos. Os tratamentos locais são a cirurgia (conservativa ou a mastectomia), e a radioterapia, que utiliza emissão de radiação ionizante para eliminação das células cancerosas proveniente de uma fonte externa ou interna (braquiterapia) e são mais utilizados em estágios menos avançados do câncer. Ao contrário da cirurgia que é um procedimento invasivo, a radioterapia em sua maioria não possui este caráter. Entretanto, os efeitos colaterais da radioterapia incluem inchaço do seio, mudanças nas características da pele na área tratada, além de problemas na amamentação, danos nos nervos dos braços, linfedema e, raramente, angiossarcoma (Harbeck; Gnant, 2017; NIH, 2023; ACS, 2023).

Dentre os tratamentos sistêmicos estão a imunoterapia, quimioterapia e hormonioterapia. A imunoterapia combate o avanço do câncer de mama a partir da ativação do sistema imunológico do próprio paciente. Para isso, podem ser utilizados anticorpos monoclonais, inibidores de tirosina quinase, inibidores quinase dependentes de ciclina, inibidores da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), inibidores de poli[adenosina difosfato-ribose] polimerase (PARP), inibidores de checkpoint imunológico, imunomoduladores diversos e vacinas terapêuticas, além da terapia celular (CAR-T) (Harbeck; Gnant, 2017; NIH, 2023).

No entanto, os tratamentos mais comuns ainda são a quimioterapia e hormonioterapia. A quimioterapia consiste na administração de medicamentos que interferem diretamente na divisão celular. No entanto, esses medicamentos agem de

forma inespecífica e causam efeitos colaterais, principalmente em tecidos cujas células possuem alta taxa de proliferação. Os mais comuns são a perda de pelos, náuseas, vômitos, diarreia, problemas de fertilidade e de coração, além de diminuir a eficiência do sistema imune, deixando o paciente vulnerável a infecções (Harbeck; Gnant, 2017; NIH, 2023; ACS, 2023).

Alguns tipos de câncer são dependentes da ação de hormônios para a proliferação e sobrevivência celular. Para isso, algumas estratégias podem ser aplicadas para a manipulação dos hormônios a fim de interferir no crescimento tumoral. Algumas destas estratégias envolvem a retirada cirúrgica de glândulas endócrinas, administração de doses supra-fisiológicas de hormônios ou administração de fármacos inibidores da síntese de hormônios ou competidores de seus receptores (Harbeck; Gnant, 2017; NIH, 2023; ACS, 2023). Um dos fármacos mais utilizados na hormonoterapia é o tamoxifeno (ACS, 2023).

2.2 TAMOXIFENO E *HOXB7*: A COMBINAÇÃO CONTRA O CÂNCER DE MAMA RECEPTOR DE HORMÔNIO POSITIVO.

2.2.1 Tamoxifeno

Os subtipos moleculares Luminal compreendem a maior parcela de incidência de diagnósticos no câncer de mama. Entre 60% e 80% dos pacientes apresentam os subtipos que expressam o receptor de estrogênio, sendo que praticamente 2/3 dos casos são classificados como Luminal A (Nascimento; Otoni, 2020). Apesar de possuírem o melhor prognóstico dentre os subtipos moleculares, o tratamento precoce ainda é indispensável para a total cura com poucos efeitos colaterais e menor taxa de recidiva no paciente. Embora possuam baixa taxa de crescimento e proliferação, não se pode ignorar que o subtipo Luminal A pode se tornar invasivo, e possui correlação significativa com metástase em osso, fígado, cérebro e pulmão (Xiao *et al.*, 2018)

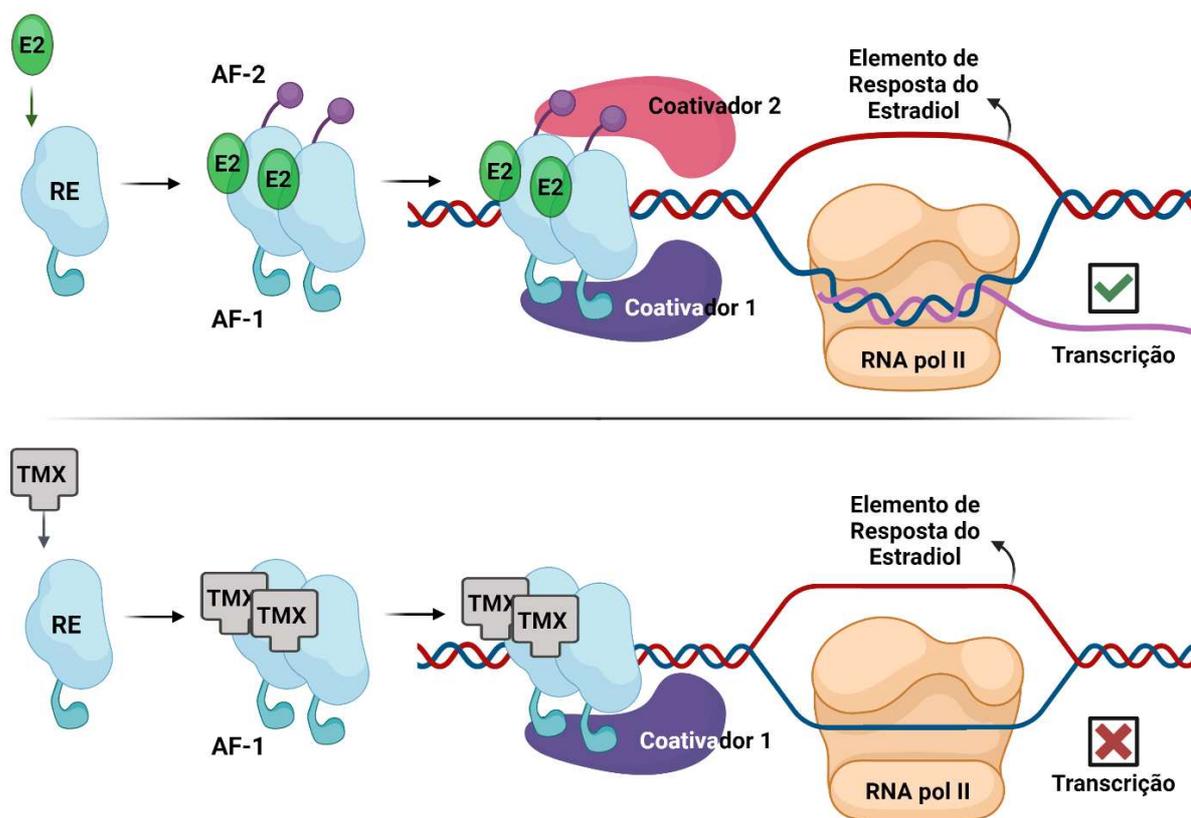
Conforme característica molecular do Luminal A (Tabela 1), estes carcinomas possuem benefício limitado à quimioterapia e são mais sensíveis aos tratamentos

endócrinos, seja por inibidores de aromatase ou por moduladores seletivos do receptor de estrogênio. A aromatase é uma enzima que promove a catálise dos hormônios andrógenos em hormônios estrógenos, como o estrogênio/estradiol e estrona. Dessa forma, os inibidores de aromatase são drogas que irão reduzir ou impedir a biossíntese do hormônio estrogênio. A outra opção de tratamento está associada a utilização de drogas na modulação do receptor de estrogênio. Estes medicamentos irão competir com o hormônio pelo seu receptor e impedir a ação dele. O fármaco mais utilizado desta classe é o tamoxifeno (TMX) (Eroles *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2014, Nascimento, Otoni, 2020).

O TMX foi sintetizado na década de 1970. Primeiramente, este composto foi testado em ratos e agia como contraceptivo, mas em humanos induziu a ovulação. No entanto, em testes antitumorais, o TMX obteve resultados positivos e foi menos tóxico que outros fármacos utilizados na época (Jordan, 2007).

O TMX pertence à classe de competidores de estrógeno e é um modulador seletivo do RE. Isto significa que este medicamento pode agir de inibindo ou estimulando a ação do hormônio a depender do órgão. Na mama, o TMX possui ação antagonista ao RE, isto é, age bloqueando a regulação gênica promovida pela ligação do estrogênio ao seu receptor, cuja ação principal está relacionada à proliferação celular (Jordan, 2007). Em condições normais, o estradiol se liga ao seu receptor, que sofre homodimerização, se desloca para o núcleo e se liga ao elemento de resposta ao estradiol (ERE). Os domínios ativadores de função 1 e 2 (AF-1 e AF-2) presentes no complexo se ligam a coativadores e regula a expressão gênica pela RNA polimerase II (Figura 3). Assim, o RE age como um fator de transcrição. No entanto, na presença de TMX, o AF-2 é inativado e promove a redução ou inibição da expressão gênica e, conseqüentemente, a proliferação celular (Howell *et al.*, 2000; Clemons; Danson; Howell, 2002).

Figura 3 - Via de ação do tamoxifeno



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024)

E2: estradiol; RE: receptor de estrogênio; TMX: tamoxifeno; AF-1: ativador de função 1; AF-2: ativador de função 2

Assim como na quimioterapia, os fármacos utilizados na hormonioterapia também atingem células saudáveis do organismo. Ainda, alguns efeitos colaterais significativos do TMX são o aumento na incidência de câncer endometrial e eventos tromboembólicos (Leite *et al.*, 2012). Além disso, Du e colaboradores (2014) observaram que a administração de TMX teve relação com o aumento da expressão do gene *VEGF*, responsável pela angiogênese (Du *et al.*, 2014).

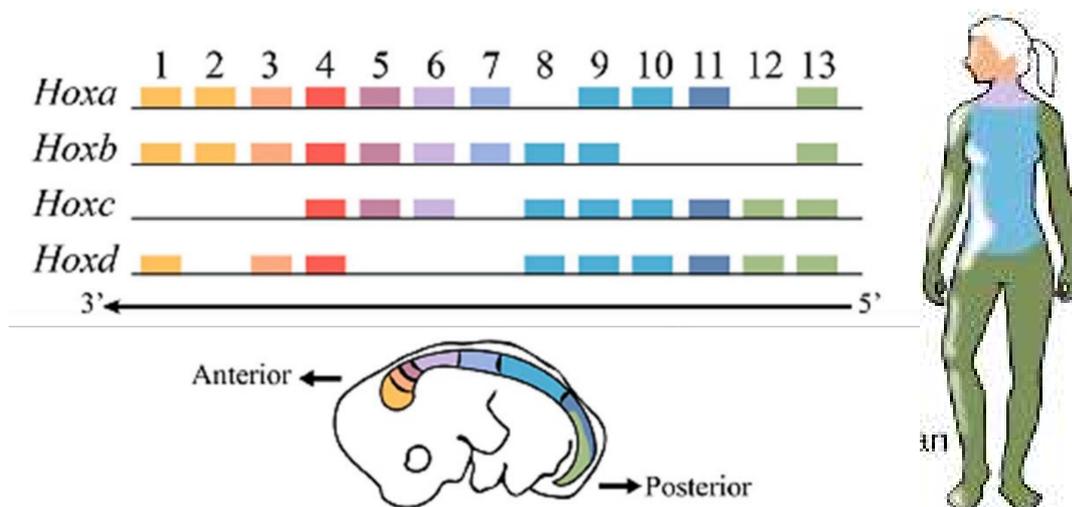
Um dado alarmante é que aproximadamente 40% da recorrência de câncer de mama positivo para receptores de hormônio não voltam a responder à terapia endócrina. Alguns mecanismos que promovem a resistência a hormonioterapia já foram descritos, e envolvem a falta da expressão do receptor de hormônio (Hoefnagel *et al.*, 2012), superexpressão de receptores tirosina quinase, como EGFR e HER2 (Newby *et al.*, 1997), mutação no gene que expressa o RE (*ESR1*) (Joselsohn *et al.*, 2015) e a inatividade dos alelos do citocromo P450, responsável pela metabolização dos medicamentos (Musgrove; Sutherland, 2009). Em concordância, estudos reportam

uma relação estreita entre a resistência à ação do TMX com a superexpressão do gene *HOXB7* em células de câncer de mama do subtipo Luminal A.

2.2.2 O gene *HOXB7*

A família *Homeobox* é um conjunto de genes que agem na regulação da expressão gênica atuando como fatores de transcrição, principalmente no processo de embriogênese. Estas proteínas possuem um homeodomínio, isto é, uma sequência conservada de 61 aminoácidos que se liga a sequências específicas de DNA (Shah; Sukumar, 2010). Primeiramente, esta família foi descrita em *Drosophila*, que possuem apenas um conjunto de oito genes. Por isso, é sabido que esta família sofreu duplicação por duas vezes, já que em humanos, os genes *HOX* são divididos em quatro grupos (*HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*) localizados em quatro cromossomos distintos, totalizando 39 genes (Figura 4) (Favier; Dolle, 1997; Shah; Sukumar, 2010).

Figura 4 - Organização dos genes *HOX* em clusters



Fonte: Afzal *et al.*, 2022, com modificações

Os genes com mesma numeração representam grupos parálogos, ou seja, genes que possuem um ancestral comum e atuam em funções semelhantes, mas que se divergiram por duplicação. Além disso, a expressão desses genes é específica a

cada órgão e segue uma colinearidade espaço-temporal, onde genes mais próximos da extremidade 3' são expressos primeiramente e são responsáveis pelo desenvolvimento da parte anterior do corpo, e aqueles próximos da extremidade 5' são expressos posteriormente e correspondem a partes posteriores do corpo (Figura 4) (Shah; Sukumar, 2010).

Os genes desta família possuem papéis cruciais na embriogênese e regulam processos relacionados a divisão celular, adesão celular, apoptose e diferenciação celular (Favier; Dolle, 1997; Shah; Sukumar, 2010). Entretanto, anormalidades na expressão de alguns destes genes são associados a diversas neoplasias, como carcinoma de ovário, cervical, pulmão, próstata e inclusive, câncer de mama (Shah; Sukumar, 2010; Jin; Sukumar, 2015). Cantile e colaboradores e Svingen e colaboradores destacam a importância dos genes desta família na evolução do câncer e enfatizam o potencial alvo terapêutico destes genes em futuras terapias antitumorais (Cantile *et al.*, 2003; Svingen *et al.*, 2003).

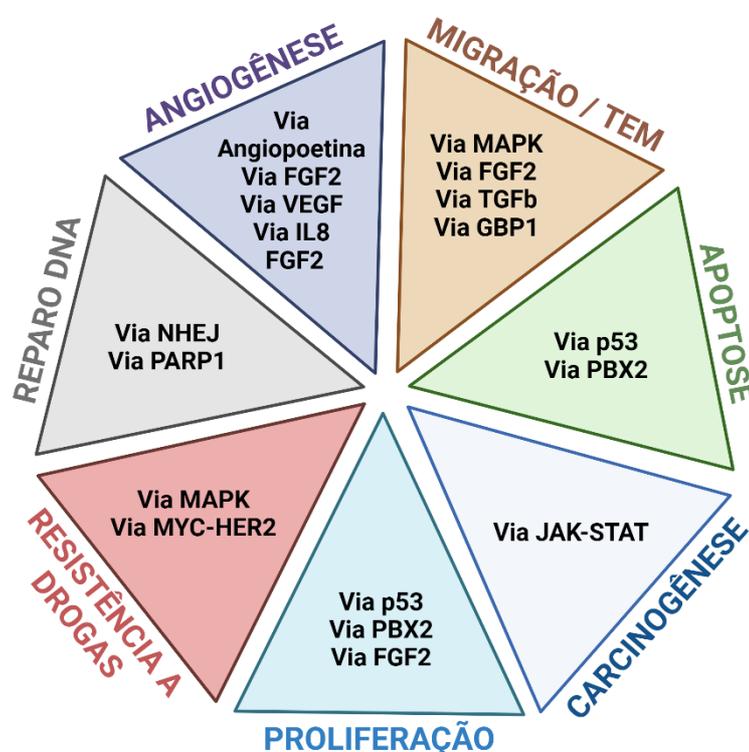
O gene *HOXB7* pertence ao grupo *HOXB*, composto por 10 genes que se organizam em *cluster* e estão localizados no cromossomo 17q21.32. A transcrição deste gene resulta em um RNA mensageiro (RNAm) de 1377 pb com dois éxons, que traduzem uma proteína de 217 aminoácidos, na qual existe um domínio *homeobox* conservado e localizado entre os aminoácidos 141 e 193 (NCBI, 2023). Em condições normais, o *HOXB7* está envolvido no desenvolvimento embrionário (Caré *et al.*, 1998; Chen; Sukumar, 2003), no entanto, a superexpressão deste gene é observado em alguns tipos de cânceres como câncer de ovário, de pulmão, de pâncreas, oral, gástrico, de esôfago, colorretal, de fígado, mieloma, e melanoma (Care *et al.*, 1996; Naora *et al.*, 2001; Destro *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2011; Stortl *et al.*, 2011; Chile *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; He *et al.*, 2017; Huan *et al.*, 2017).

Ademais, este gene se encontra diferencialmente expresso em algumas linhagens de câncer de mama. A partir do mapeamento de expressão gênica de todos os genes *HOX* em oito linhagens de câncer de mama foi observado que o *HOXB7* é expresso nas linhagens BT474, T47D, HCC1428, HCC70 e MCF7. Exceto por HCC70, as outras quatro linhagens são receptoras de hormônio positivo. Na linhagem triplo-negativa mais estudada, MDA-MB-231, a expressão do *HOXB7* foi nula, assim como na linhagem não-tumoral de tecido mamário, MCF10A (Hur *et al.*, 2014).

No câncer, a proteína *HOXB7* age nas vias metabólicas (Figura 5) de

proliferação celular, angiogênese, invasão, reparo do DNA, sobrevivência celular e resistência ao TMX (Care, 1998; Wu *et al.*, 2006; Rubin *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2012). Ainda, já foi observado por Jin e colaboradores (2012) e reconfirmado por Azuma e colaboradores a indução da formação do tumor pela expressão do *HOXB7* (Jin *et al.*, 2012; Azuma *et al.*, 2022), e que isto se deve a transformação celular pela via JAK-STAT (Azuma *et al.*, 2022).

Figura 5 - Vias metabólicas em que o gene *HOXB7* está envolvido



Fonte: Elaborado pela própria autora com BioRender (2024). TEM: transição mesenquimal-epitelial.

Em linhagem de câncer de mama com superexpressão de *HOXB7*, alguns autores observaram o aumento de 3 a 10 vezes de fatores de crescimento relacionados à angiogênese como *VEGF*, *GRO α* , *IL-8*, *Ang-2* e *CD31* (CARE *et al.*, 2001). Ainda, outros estudos também mostraram uma relação entre a expressão de *HOXB7* e de *FGF2* (fator 2 de crescimento de fibroblasto), atuante em vias mitogênica e angiogênica (Care *et al.*, 1996; Care *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2006). Care e colaboradores observaram que a expressão do gene *FGF2* aumentou a proliferação

em pelo menos 10 vezes (Care *et al.*, 1998). Ainda, Wu e colaboradores evidenciaram que a inibição do receptor FGF (*FGFR*) bloqueou a invasividade em 80% e que o *FGF2* é um importante mediador da transição epitelial-mesenquimal (TEM) iniciada pelo *HOXB7* (Wu *et al.*, 2006).

A TEM é um processo natural e importante na embriogênese. Entretanto, a TEM também é considerada como um mecanismo de conversão de tumores iniciais para um fenótipo invasivo. Essa conversão ocorre a partir da perda da aderência epitelial e de proteínas de junção, que promove a falta do contato célula-célula e permite um remodelamento do citoesqueleto que facilita a motilidade celular e invasão. Ao transfectarem a linhagem não tumorigênica MCF10A com plasmídeo codificando *HOXB7*, Wu e colaboradores observaram que as células epiteliais se diferenciaram em mesenquimais e sofreram rearranjo no citoesqueleto típico de TEM. Moléculas de adesão celular (e-caderina) e proteínas de junção (claudinas) não foram encontradas em células MCF10A-*HOXB7*. Em concordância, foram encontrados marcadores de células mesenquimais nas mesmas células, indicando uma atividade metastática (Wu *et al.*, 2006). Além disso, recentemente, Azuma e colaboradores mostraram que a superexpressão do gene *HOXB7* impacta diretamente o aumento de níveis da proteína vimetina, um marcador mesenquimal, sugerindo que o *HOXB7* induz, pelo menos parcialmente, a TEM além de influenciar a formação de metástase no pulmão (Azuma *et al.*, 2022).

A via Ras-Raf-MAPK é uma via importante na indução de TEM. Em células superexpressoras de *HOXB7*, Wu e colaboradores observaram aumento das proteínas RhoA, Ras e p42/p44 MAPK. Somado a isto, a inibição das últimas duas proteínas resultou na supressão do fenótipo invasivo. Além disso, o silenciamento do gene *HOXB7* inibiu a via Ras-Raf-MAPK e, conseqüentemente, a capacidade de invasão do tumor (Wu *et al.*, 2006). Jin e colaboradores também observaram aumento de MAPK após superexpressão de *HOXB7* (Jin *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que a superexpressão do gene ativa o gene *TGF β* (fator de transformação do crescimento β) em células de câncer de mama humano e murino. A produção da proteína *TGF β* induzida por *HOXB7* promoveu a progressão tumoral e metástase pela via *TGF β* -SMAD3. O silenciamento de *TGF β 2* inibiu significativamente a migração celular em células com superexpressão de *HOXB7*, quando comparado a células controle (Liu *et al.*, 2015). Em concordância, Caré e colaboradores (2001) mostraram que em células

com expressão de *HOXB7* aumentada, algumas metaloproteinases (MMP) também são superexpressas. Essas proteinases estão diretamente relacionadas a TEM. Nesse estudo, a *MMP9* teve aumento de trinta e oito vezes da sua expressão normal (Care *et al.*, 2001).

Outra via que o *HOXB7* age em células de câncer de mama é na via de reparo de DNA e sobrevivência celular. Ensaio genotóxico mostraram que células expressando *HOXB7* possuíam vantagem duas vezes maior de sobrevivência frente a danos infringidos por radiação ionizante. Na linhagem MCF7, o silenciamento desse gene reduziu a sobrevivência significativamente. Ainda, anomalias cromossômicas devido à radiação foram significativamente menores em células SkBr3 expressando o *HOXB7*. Em concordância, a via de reparo de DNA por união de extremidade não-homóloga estava 2,5 vezes mais estimulada nestas células. Por fim, esses autores mostraram que células expressando *HOXB7* eram capazes de proliferar mesmo em meio deficiente de suplementação (Rubin *et al.*, 2007).

Como mostrado, o *HOXB7* participa de diversas vias de sinalização responsáveis pela formação e progressão do câncer de mama e por isso, este gene foi escolhido como alvo terapêutico no presente estudo. Por fim, a sua relação com linhagens de câncer de mama resistentes a terapia endócrina faz dele um alvo promissor, tanto para a terapia direta por RNAi quanto para a terapia combinada RNAi-hormonioterapia (Jin *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2015).

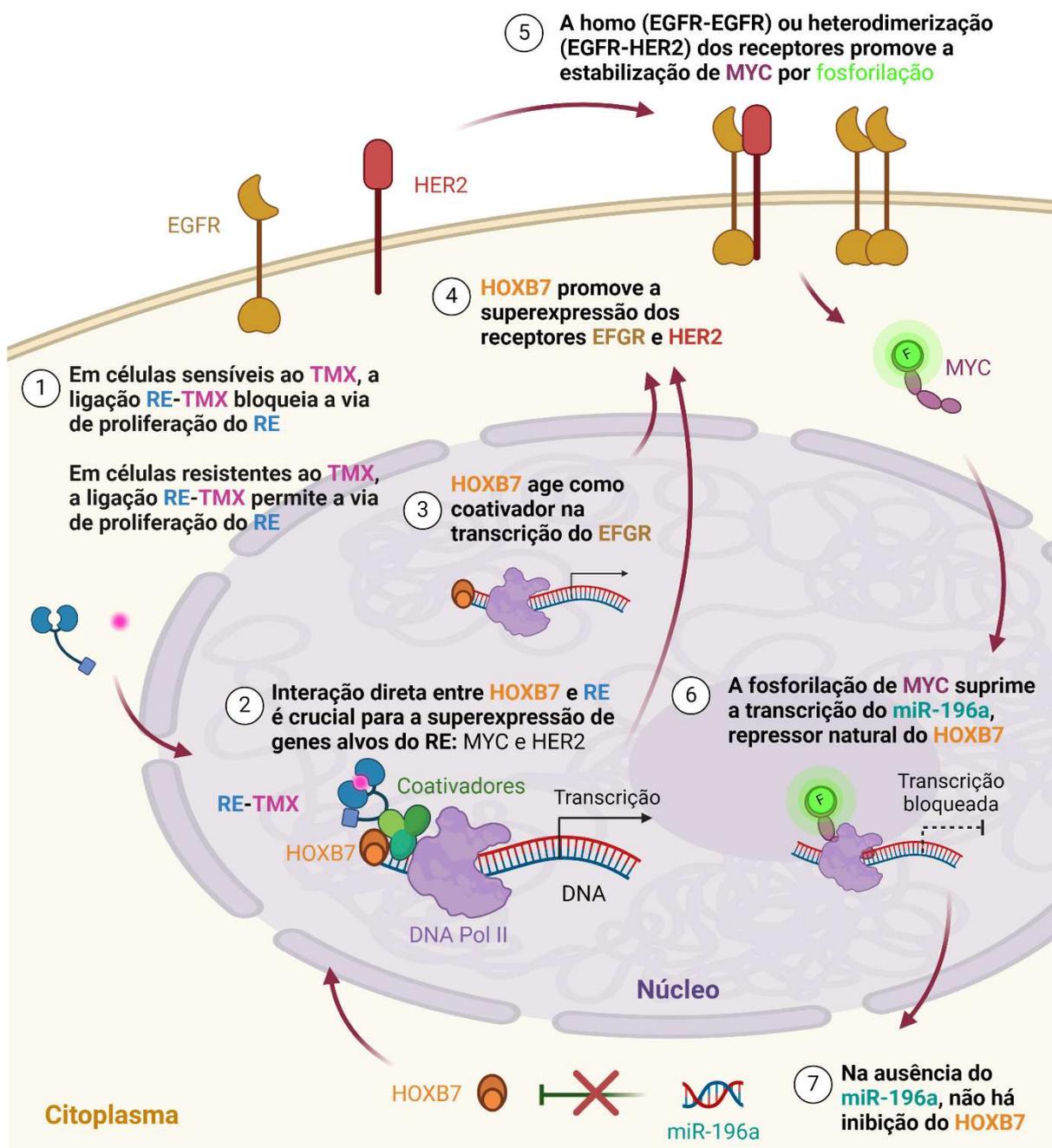
2.2.3 Relação entre tamoxifeno e *HOXB7*

Proteínas tirosina quinase (PTKs) são responsáveis pela transdução de sinais, ao fosforilar resíduos de tirosina nas proteínas, desencadeando diversas cascatas de sinalização, inclusive, na regulação da expressão gênica (HUBBARD, 2002). Alguns receptores importantes pertencentes a superfamília PTK são o EGFR (receptor do fator epidermal de crescimento) e HER2 (receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2), que estão diretamente envolvidos na proliferação celular (NCBI, 2023). A terapia endócrina prolongada é associada ao aumento na expressão de receptores EGFR e HER2 que leva a resistência de drogas utilizadas na terapia hormonal (Nicholson *et al* 2005). Jin e colaboradores (2012) verificaram que a superexpressão

de *HOXB7* promove resistência das células de câncer de mama ao TMX através da ativação da via EGFR-MAPK. Em consonância, a inibição de EGFR utilizando *gefitinib* sensibilizou as células ao tratamento com esse hormonioterápico (Jin *et al.*, 2012).

Ainda, foi observado que uma interação direta entre *HOXB7*, que age como coativador, e o receptor de estrogênio (RE) foi crucial para a regulação dos genes alvos do RE em câncer de mama, como MYC, HER2, GREB1 e CCND1 (ciclina D1). O gene *MYC* é um proto-oncogene que tem papel importante na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular e é estabilizado através da sinalização da via EGFR-HER2. A fosforilação do *MYC* pelo HER2 suprime o mi-196a, repressor natural do *HOXB7*, promovendo alta expressão desse gene (Figura 6). Ainda, a expressão aumentada de HER2 ativa vias importantes como Akt, p44/42 MAPK, S6K e 4EBP1 (Jin *et al.*, 2012). O mesmo estudo demonstrou que em células de câncer de mama com superexpressão de *HOXB7*, o TMX pode oscilar de antagonista para agonista, ou seja, agir em concordância com o estrogênio, desencadeando a cascata de proliferação celular, ao invés de bloqueá-la (Jin *et al.*, 2015).

Figura 6 - Relação entre tamoxifeno e *HOXB7* na via de sinalização de câncer de mama resistente ao TMX



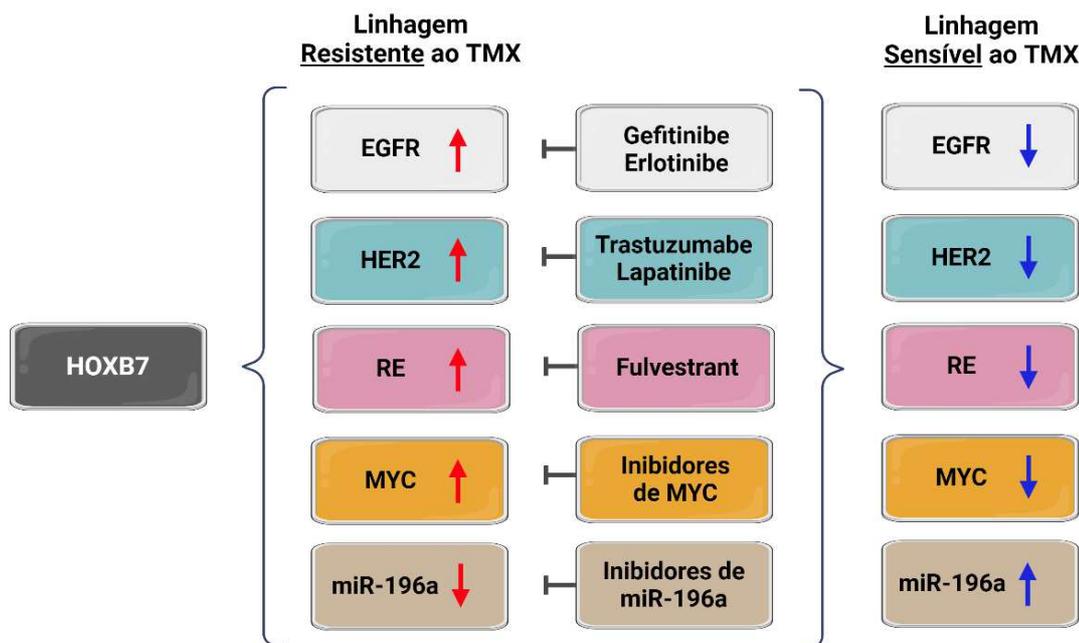
Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024)

E2: estradiol; RE: receptor de estrogênio; TMX: tamoxifeno.

Desta forma, Jin e Sukumar resumiram algumas vias de ação do gene *HOXB7* e como alguns fármacos poderiam agir na prevenção e/ou superação da resistência ao TMX em câncer de mama (Figura 7). No entanto, este tipo de estratégia se torna inviável, tanto economicamente quanto em termos práticos. Por isso, terapias direcionadas que consigam afetar todas as vias ao atingir apenas o *HOXB7* podem ser de grande valia para atingir efeitos similares (Jin; Sukumar, 2015). Um exemplo de

terapias direcionadas é a terapia por RNA interferente (RNAi).

Figura 7 - Vias de ação do *HOXB7* associado a possíveis estratégias terapêuticas na sensibilização do câncer de mama ao TMX



Fonte: Elaborado pela própria autora com BioRender (2024), traduzido de Jin; Sukumar, 2015

2.3 MECANISMO E TERAPIA DE RNA POR INTERFERÊNCIA (RNAi)

A regulação da expressão gênica é realizada através de diversos mecanismos, seja antes, durante ou após a transcrição de um determinado gene. Pequenas moléculas de RNA regulam e atuam diretamente no silenciamento pós-transcricional de genes, e a este mecanismo dá-se o nome de interferência por RNA (RNAi) (Menck, 2010).

O fenômeno foi descrito em 1998 e é atribuído aos pesquisadores Andrew Fire e Craig Melo (Fire *et al.*, 1998), ganhadores do Nobel de Medicina de 2006 por esse achado. O RNAi é um mecanismo evolutivamente conservado que ocorre naturalmente em eucariotos e foi primeiramente reconhecido como um mecanismo de defesa contra elementos transponíveis e elementos exógenos, como vírus de RNA

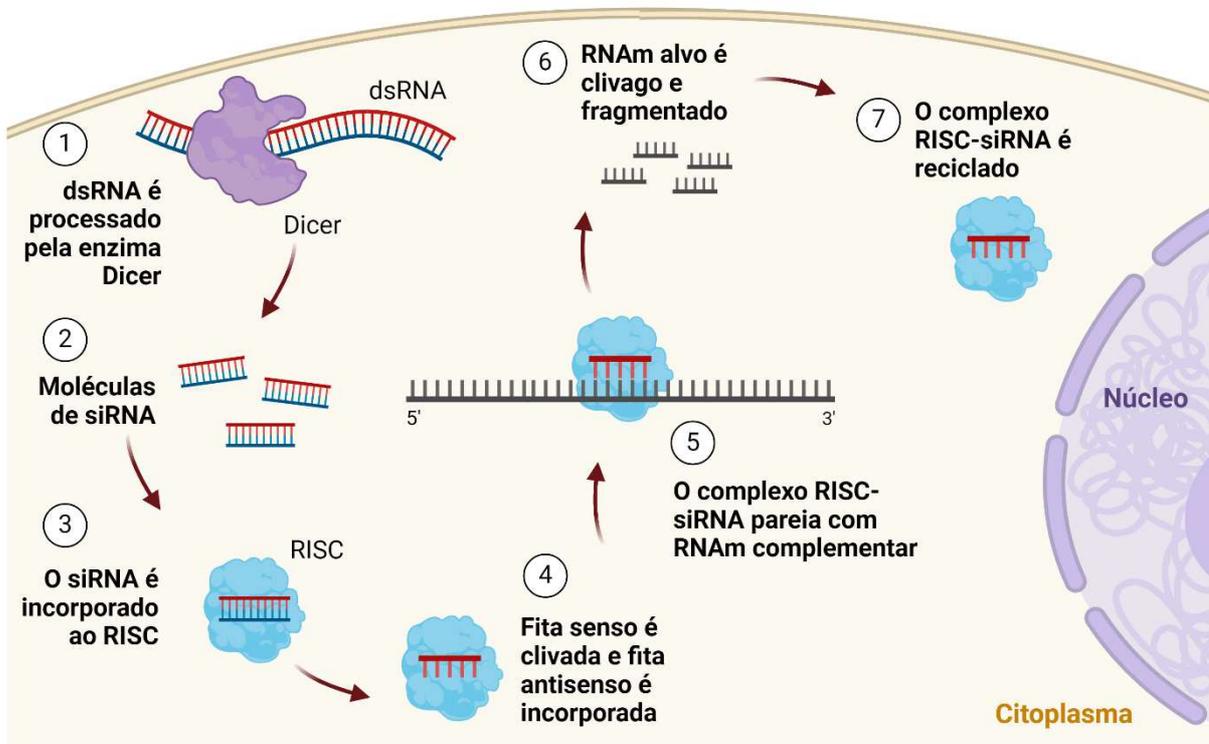
(Almeida; Allshire, 2005). No entanto, sabe-se hoje que este mecanismo também é responsável pela regulação gênica de praticamente todos os processos biológicos, incluindo proliferação e crescimento celular, diferenciação de tecidos, respostas celulares e imunológicas, entre outros. Na ciência este mecanismo foi primeiramente utilizado na investigação de função gênica (Wianny; Zernicka-Goetz, 2000) e, até os dias atuais, é majoritariamente estudado devido ao seu grande potencial em diagnóstico e terapêutico de diversos tipos de doenças (Menck, 2010).

Ao contrário da terapia gênica, que consiste na modificação (introduzir ou modificar, inativar, e substituir) de um gene (DNA) do indivíduo de forma permanente, a terapia por RNAi atua no RNA (pós-transcricional) e visa a redução transitória da expressão de genes associados a diversas vias de interesse, como as vias angiogênica, apoptótica, de proliferação e sobrevivência celular e de resistência a drogas (Nieth *et al.*, 2003; Pittella *et al.*, 2012; Mello Jr. *et al.*, 2017; Souza *et al.*, 2021). Atualmente, devido às incertezas de especificidade relacionadas aos diversos tipos de terapias que visam o aumento ou diminuição da expressão gênica, a condição transitória desta terapia é considerada vantajosa. Além disso, possui uma supressão gênica efetiva a um custo relativamente baixo e com alta especificidade devido a necessidade de complementariedade exata dos seus pares de bases com o RNAm do gene alvo (Aigner, 2019). Ainda, um mesmo complexo RISC-siRNA pode clivar várias moléculas de RNAm alvo.

O mecanismo de RNAi possui algumas moléculas efetivas, dentre elas o pequeno RNA interferente (siRNA) e os microRNAs (miRNA). As moléculas de siRNA possuem aproximadamente 22 pb com pequenos *overhangs* de dois nucleotídeos na extremidade 3' e com um grupo fosfato livre na extremidade 5'. Efetivamente, as moléculas de siRNA endógenas estão envolvidas nos mecanismos de defesa contra vírus e elementos transponíveis, enquanto as moléculas de miRNA atuam na regulação da expressão gênica dos mamíferos. As principais características que diferenciam estas moléculas estão relacionadas ao seu processo de biogênese e a sua forma de atuação, que pode ser a inibição total ou total/parcial, respectivamente (Elbashir; Lendeckel; Tuschl, 2001).

Brevemente, o mecanismo de RNAi (Figura 8) consiste na transcrição da molécula precursora (longas sequências de RNA dupla-fita, ou dsRNA), cuja origem pode ser exógena ou endógena.

Figura 8 - Mecanismo de interferência por RNA e sua utilização na terapia por RNAi



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024).

Em seguida, é realizado o processamento da mesma por endonucleases da família RNase III em pequenas moléculas de RNA dupla-fita, seja o siRNA ou o miRNA (Elbashir; Lendeckel; Tuschl, 2001). Essas moléculas são então carregadas na proteína Argonata 2 (Ago2), responsável pela separação da dupla-fita e clivagem da fita senso (passageira). Posteriormente, a fita antisenso (guia) é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, em inglês), formado por diversas proteínas e pela Ago2, que forma o sítio ativo do complexo (Rand *et al.*, 2004; Rand *et al.*, 2005). A incorporação da fita guia promove a ativação do complexo RISC, que irá realizar uma busca ativa por sequências complementares de RNAm presentes no citoplasma. Após o encontro, a proteína Ago2 irá clivar a estrutura fosfodiéster do RNAm entre os pares de base 10 e 11 *upstream* da extremidade 5' do siRNA (sentido 3' – 5') e todo o complexo pode ser reciclado. O RNAm restante é fragmentado por diferentes exonucleases (Elbashir; Lendeckel; Tuschl, 2001; Reynolds *et al.*, 2004). Esse processo resulta na inibição total ou parcial da tradução da proteína codificada

pelo RNAm.

A partir destas descobertas, cientistas iniciaram estudos utilizando a maquinaria natural dos eucariotos para a introdução de moléculas desenhadas e sintetizadas artificialmente a fim de estudar os efeitos de silenciamento de genes específicos (Figura 7). Atualmente, é comumente denominado siRNA, a molécula exógena, sintetizada artificialmente e vastamente utilizada no campo científico. O siRNA pode ser facilmente comprado em grandes empresas que possuem autonomia no desenho e produção desse tipo de molécula. No entanto, o design racional destas moléculas é vantajosa e permite a otimização dos parâmetros a fim de se obter moléculas com a maior eficiência possível.

2.3.1 Otimização da terapia por RNAi: design de moléculas de siRNA

Devido à alta variedade da atividade e especificidade das moléculas de siRNA, iniciou-se uma investigação para entender os melhores critérios para o desenho eficiente dessa molécula. Dentre outros, pode-se citar a influência da região complementar do RNAm, preferência de bases nucleotídicas, e conteúdo G/C (Reynolds *et al.*, 2004; Ui-Tei *et al.*, 2004; Amarzguioui *et al.*, 2004). Os critérios mais utilizados desde que foram publicados até os dias atuais são de Reynolds *et al.*, Ui-Tei *et al.* e Amarzguioui *et al.* (Tabela 2). Estes autores realizaram o design da molécula de siRNA e as validou em experimentos *in vitro*, relacionando os dados de silenciamento gênico com a estrutura de cada oligonucleotídeo.

Tabela 2 - Critérios mais considerados nos estudos de desenho de siRNA.

Reynolds <i>et al.</i>	Ui-Tei <i>et al.</i>	Amarzguioui <i>et al.</i>
1. Ausência de repetições invertidas.	1. Presença de nucleotídeos A/U na extremidade 5' da fita antisense.	1. Assimetria na estabilidade das extremidades do duplex.
2. Estabilidade interna baixa na extremidade 3' da fita senso.	2. Presença de nucleotídeos G/C na extremidade 5' da fita senso	2. Posição 1: ausência de U.
3. Conteúdo G/C: 30 a 52%.	3. Presença de pelo menos	3. Posição 1: G ou C.

4. Posição 3: A.	cinco nucleotídeos A/U na extremidade 5' da fita antisense.	4. Posição 6: A.
5. Posição 10: U.		5. Posição 19: ausência de G.
6. Posição 13: ausência de G.	4. Ausência de G/C em mais de nove nucleotídeos seguidos	6. Posição 19: A ou U.
7. Posição 19: A.		
8. Posição 19: ausência de G e C.		

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A principal característica do mecanismo e RNAi é a incorporação da fita correta ao complexo RISC, isto é, da fita guia. A incorporação acidental da fita passageira leva a formação de um complexo RISC-siRNA incapaz de clivar o alvo e efeitos *off-target*. A fim de assegurar que a fita correta seja incorporada, a principal característica desejada no design racional é a assimetria na estabilidade interna das extremidades do duplex de siRNA. Assim, a fita cuja extremidade 5' seja mais instável, ou seja, não esteja estavelmente pareada com a fita complementar do duplex, é preferencialmente incorporada ao RISC (Amarzguioui *et al.*, 2004). Essa característica pode ser observada nos critérios 2 de Reynolds *et al.*, 1,2 e 3 de Ui-Tei *et al.* e no critério 1 de Amarzguioui *et al.*, além da presença de pares de bases específicos nas extremidades do duplex. Essa assimetria é calculada a partir de valores termodinâmicos dos últimos pares de base de cada fita (Reynolds *et al.*, 2004; Ui-Tei *et al.*, 2004; Amarzguioui *et al.*, 2004).

Ainda, a adição de modificações químicas pode aumentar a estabilidade do duplex quanto a degradação e imunogenicidade e até aumentar a eficácia do efeito RNAi. Essas modificações podem ocorrer nas ligações fosfodiéster, na ribose, na base nucleotídica e no grupo 2'-OH do açúcar, porém sempre em locais que não afete a atividade normal do siRNA (Angart; Vocelle; Chan; Walton, 2013). Elbashir e colaboradores observaram que o *overhang* colaboram com a reconstrução do complexo RISC e que siRNA com essa modificação são mais eficientes que aqueles sem (Elbashir; Lendeckel; Tuschl, 2001). Em concordância, ao comparar moléculas de siRNA com extremidades contendo ou não *overhangs*, Ghosh e colegas observaram uma lentidão 2x maior para a formação do complexo RISC-siRNA na ausência de *overhangs* (Ghosh *et al.*, 2009).

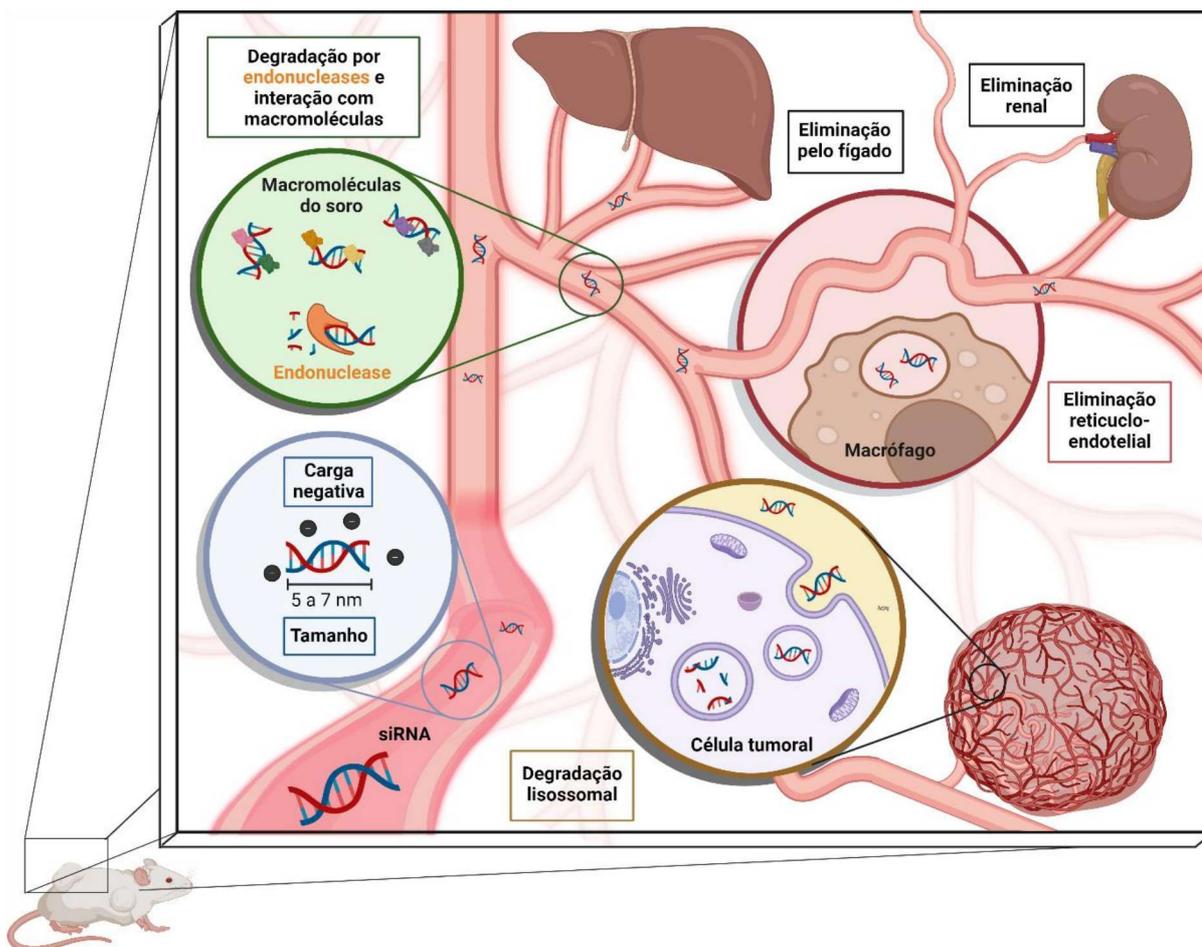
Além destes critérios principais, deve-se atentar ao conteúdo G/C, a

possibilidade de estruturas secundárias da fita antisenso, repetições internas e sequências palindrômicas (Angart; Vocelle; Chan; Walton, 2013). No entanto, é importante destacar que, a eficiência da terapia por RNAi não está exclusivamente relacionada à estrutura da sequência de siRNA, mas também a eficiência de entrega e liberação desta molécula no citoplasma celular e a quantidade de moléculas entregues. No entanto, para que isso ocorra, as moléculas de siRNA devem enfrentar e superar diversas barreiras biológicas.

2.3.2 Barreiras biológicas *in vitro* e *in vivo* na administração de moléculas de siRNA

É sabido que a molécula de siRNA, assim como qualquer tipo de material genético, possui baixa eficiência de entrega e especificidade se administrados na ausência de um agente de transfecção. Este fato se deve a características intrínsecas da molécula, assim como o enfrentamento de diversas barreiras biológicas (Figura 9), seja *in vitro* ou *in vivo*.

Figura 9 - Barreiras intrínsecas e biológicas encontradas pelo siRNA



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024), adaptado de Valle, Gualberto, Pittella, 2019.

ECM: matriz extracelular. DS: sistema de entrega. RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA. *RNA_m*: RNA mensageiro.

Tendo em vista que o siRNA possui mesma largura que a membrana plasmática (6-10 nm) e mesma carga superficial negativa, existe uma dificuldade em relação ao seu transporte passivo através da membrana celular. Além disso, o siRNA livre está totalmente exposto a degradação pela ação de nucleases ou a inutilidade após ligações inespecíficas com macromoléculas ou proteínas do meio em que se encontra, seja em experimentos *in vitro* ou *in vivo* (Soutschek *et al.*, 2004, Choi *et al.*, 2007). Ademais, caso a molécula de siRNA livre tenha sucesso na internalização celular, é improvável que ela consiga promover o seu efeito, pois logo será degradada caso não consiga realizar o escape endossomal após englobada pela via endocítica. Por isso, é imprescindível que o siRNA seja liberado por essas vesículas antes de ser degradado pelo lisossomo. No entanto, na ausência de qualquer tipo de modificação ou gatilho específico, dificilmente essa molécula permanecerá intacta.

Ainda, relacionado a experimentos *in vivo*, deve ser ressaltado outros aspectos importantes. Após administração intravenosa, o siRNA livre é capaz de ativar o sistema retículo endotelial, que logo considerará a molécula como um corpo estranho, degradando-a (Judge *et al.*, 2005). Somado a este fato, moléculas menores que 50 kDa ou 10 nm possuem rápida excreção renal, o que resulta em baixa biodistribuição e biodisponibilidade (Khaled *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2011).

Diante do exposto, a utilização de moléculas de siRNA sem nenhum tipo de auxílio resultará em uma ineficiência do mecanismo de RNAi. Assim, diversos tipos de agentes de transfecção são testados há mais de 30 anos, no intuito de proteger o siRNA do sistema imune e de nucleases, além de terem a capacidade de extravasar para o tecido tumoral, resistir ao meio extracelular, transpor a membrana plasmática, promover o escape endossomal e liberar as moléculas de forma eficaz ao citoplasma (Whitehead; Langer; Anderson, 2009; Guo *et al.*, 2011; Pittella *et al.*, 2011). Dentre estes agentes, destacam-se os aptômetros, conjugados com GalNAc e nanocarreadores.

2.4 NANOTECNOLOGIA E O USO DAS NANOPARTÍCULAS COMO *DELIVERY SYSTEM*

Os chamados nanomateriais são materiais com pelo menos uma dimensão externa em nanoescala, isto é, escala de tamanho entre 1 e 100 nm (ISO, 2010). Dessa forma, diferentes sistemas dentro destas características dimensionais podem ser considerados nanomateriais e classificados de acordo com a Tabela 3. Os nanocarreadores ou nanopartículas são classificados como 0-D e definidos como nanomateriais que possuem todas as suas dimensões externas dentro da escala nanométrica (ISO, 2010). A escala nanométrica promove propriedades físicas, químicas, mecânicas e ópticas únicas. Isto se deve aos efeitos quânticos que regem o comportamento desses materiais, ao contrário de quando a mesma substância está em escala maior (Mittal; Banerjee, 2016). Os efeitos relacionados a superfície-volume também são uma propriedade chave na explicação desse comportamento. Isto é, quanto menor o material, maior o número de átomos dispostos na sua superfície em relação ao seu volume, e isto aumenta a reatividade do material em nanoescala (Cao,

2011).

Tabela 3 - Classificação de nanomateriais de acordo com sua dimensionalidade.

	DESCRIÇÃO	EXEMPLOS
0-D	Nanomateriais que possuem todas as suas três dimensões na escala nanométrica.	Quantum dots, fulereno e nanopartículas.
1-D	Nanomateriais que possuem uma dimensão fora da escala nanométrica.	Nanotubos, nanofibras, nanorods e nanofios.
2-D	Nanomateriais que possuem duas dimensões fora da escala nanométrica.	Nanofilmes e nanocamadas.
3-D	Materiais que não possuem nenhuma de suas dimensões na escala nanométrica.	Dispersão de nanopartículas.

Fonte: Elaborado pela autora (2024) traduzido de Joudeh e Link (2022).

Apesar de serem explorados por poucas décadas para fins científicos, os nanomateriais e seus princípios estão presente na civilização há séculos. Um bom exemplo disso é o “Cálice de Licurgo”, objeto da Roma Antiga que possui mais de 1.600 anos e é composto por nanopartículas de prata e ouro, que permite um efeito visual único, porém desconhecido por milênios, até o desenvolvimento da microscopia no final do século XX (Joudeh, Link, 2022).

A década de 1960 é considerada um marco na nanomedicina. Além da famosa palestra “*There`s Plenty of Room at the Bottom*” do cientista Richard Feynman em 1959 na reunião da Sociedade Americana de Física, em 1965 foi descrita a síntese dos lipossomas (Bangham *et al.*, 1965), as primeiras nanopartículas desenvolvidas em laboratório. Trinta anos depois, os vetores virais foram utilizados com sucesso na entrega de informação genética (Blaese *et al.*, 1995) e foram continuamente explorados devido à uniformidade morfológica, alta eficiência de encapsulação e fácil modelação de tamanho e funcionalização. No entanto, a alta toxicidade e resposta imune destes sistemas impactou o seu desenvolvimento e utilização (Tomanin; Scarpa, 2004). Dessa forma, ainda existe uma busca incessante para o desenvolvimento de agentes de transfecção que sejam eficientes na entrega de

fármacos ou material genético sem promover efeitos indesejáveis.

Atualmente, muitos estudos evidenciam o uso de nanopartículas de diferentes naturezas como sistemas de *drug delivery*. A aplicação da nanotecnologia na área biomédica e farmacêutica é explorada na construção de nanocarreadores inteligentes, ou seja, carreadores que conduzem fármacos de forma específica à células ou tecidos e que também são capazes de liberá-lo de maneira controlada, prolongada e eficaz (Allen; Cullis, 2004; Jhaveri; Deshpande; Torchilin, 2014; Siafaka *et al.*, 2016; Hossen *et al.*, 2019). Além disso, o uso de nanopartículas como sistemas de entrega podem apresentar outras vantagens, como: i) redução da toxicidade; ii) redução da resposta imune pelo sistema reticuloendotelial; iii) proteção do composto encapsulado; iv) incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto de substâncias lipofílicas; v) melhora da estabilidade e por consequência maior biodisponibilidade e tempo de circulação (Allen; Cullis, 2004); vi) maior especificidade; vii) solubilização de substâncias acima do limite de solubilidade; e viii) redução da dose efetiva. No entanto, é necessário considerar características como biocompatibilidade e biossegurança ao escolher o nanomaterial a ser administrado. Atualmente, muitos estudos estão focados na avaliação da toxicidade que estes materiais podem provocar para o ser humano, animais, plantas e ao meio ambiente a curto e longo prazo.

O primeiro nanomedicamento a ser aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para terapia anticâncer foi uma formulação lipossomal incorporando o fármaco doxorrubicina para o tratamento de sarcoma de Kaposi. Esta formulação é chamada Doxil e foi aprovada em 1995 (Tabela 4), 30 anos após a descrição dos lipossomas (James *et al.*, 1994). Dez anos depois, o medicamento Abraxane foi aprovado pela mesma organização para o tratamento de câncer de mama, pulmão e pâncreas. Essa formulação consiste em nanopartículas à base de albumina incorporando outra droga antitumoral, o paclitaxel (Green *et al.*, 2006). Em 2013, a Kadcyla, um conjugado anticorpo-fármaco, foi autorizada para o tratamento em pacientes com câncer de mama do subtipo superexpressor de HER2 (Kamaly *et al.*, 2012).

No entanto, a aprovação de nanomedicamentos enfrenta diversos obstáculos. Diferente da análise de um fármaco convencional específico, as nanoformulações possuem natureza complexa com propriedades físico-químicas únicas. Alguns desses obstáculos são intrínsecos à própria formulação, principalmente, relacionado à sua

capacidade de enfrentamento das barreiras biológicas, mas também envolve a falta de regulamentação, falta de suporte, preocupação com a biossegurança, escalabilidade e investimento (Thapa; Kim, 2022) (Figura 10) Evidência disso é a admissão de apenas 90 nanomedicamentos pela FDA e pela *European Medicines Agency* (EMA) em 28 anos desde o primeiro nanomedicamento aprovada (Tabela 4) (Jia *et al.*, 2023).

Os motivos mais comuns de fracasso nos testes clínicos de nanoformulações voltadas para aplicações biomédicas são toxicidade, reconhecimento pelo sistema imune, excreção e o tipo de nanocarreador, já que as propriedades físico-químicas do sistema de entrega ditam o seu comportamento após aplicação no organismo. Ainda, falhas no processo de manufatura, reprodutibilidade e correta seleção do público-alvo interferem no sucesso do ensaio clínico (Halwani, 2022).

Figura 10 - Desafios para o desenvolvimento e comercialização de nanomedicamentos.



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024), traduzido e adaptado de Thapa e Kim (2022).

Tabela 4 - Nanomedicamentos para câncer comercialmente disponíveis e aprovadas pela FDA e EMA.

	Nome comercial	Empresa	Data	Tipo de Nanocarreador	Ativo	Tipo de câncer	Refs
LIPÍDICA	Doxil/Caelyx	Sequus Pharmaceuticals	FDA (1995), EMA (1996)	Lipossoma	Doxirrubicina	Câncer de ovário metastático	1,2,3,4
	Lipodox	Sun Pharma Global FZE	FDA (2013)	Lipossoma	Hidrocloreto de doxirrubicina	Câncer de ovário metastático	1,3
	Onivyde	Merrimack Pharmaceuticals	FDA (2015)	Lipossoma	Irinotecan	Câncer de pâncreas metastático	1,2,3,4
	Myocet	IDM Pharma	EMA (2000)	Lipossoma	Hidrocloreto de doxirrubicina	Câncer de mama	1,2,3,4
	Mepact	Takeda Inc.	EMA (2009)	Lipossoma	Mifamurtide	Osteosarcoma	1,2,3
	Marqibo	Talon Therapeutics	FDA (2012)	Lipossoma	Vincristina	Leucemia mielogênica	1,2,3,4
	Lipusu	Luye Pgarna	FDA (2016)	Lipossoma	Paclitaxel	Câncer de mama e de pulmão	1,2,3
	Vyxeos	Jazz Pharmaceuticals	FDA (2017), EMA (2018)	Lipossoma	Daunorrubicina e Citarabina	Leucemia mieloide aguda	1,2
	DaunoXome	Gilead Sciences	FDA (1996)	Lipossoma	Citrato de daunorrubicina	Leucemia mieloide aguda	4

	Zevalin	Bayer Pharma	FDA (2002)*, EMA (2004)	-	Ibritumomab tiuxetano [⁹⁰ Y]	Linfoma	1
POLIMÉRICA	Apealea	Oasmin Pharmaceutical AB	EMA (2018)	Micela	Paclitaxel	Câncer de ovário, peritônio e trompa de Falópio	1,3
	Oncaspar	Enzon Pharmaceuticals Inc.	FDA (1994), EMA (2016)	L-asparaginase-PEG	L-asparaginase	Leucemia linfoblástica aguda e mielogênica crônica	1,2,4
	Genexol-PM	Samyang Pharmaceuticals	FDA (2007)	Micela	Paclitaxel	Câncer de mama	1,2,3,4
	Nanoxel-M	Samyang Pharmaceuticals	FDA (2012)	Micela	Docetaxel	Câncer de mama metastático e de ovário	2
	Paclical	Oasmia Pharmaceuticals	RFMPH (2015)	Micela	Paclitaxel	Câncer de ovário	2
	Eligard	Tolmar Pharmaceuticals Inc.	FDA (2002)	-	Acetato de leuprolida	Câncer de próstata	1,4
PROTEÍNA	Abraxane	Celgene Pharmaceutical Co. Ltd.	FDA (2005, 2012, 2013), EMA	Albumina	Paclitaxel	Câncer de mama metastático, de pulmão e de pâncreas	1,2,3,4

	(2008)						metastático
	Nanocoll	CIS Bio	FDA (1995)	Abulmina	Albumina e estanoso	Câncer de mama e melanoma	2,4
	Ontak	Eisai	FDA (1999)	Fusão de proteínas	Toxina diftérica	Leucemia e linfoma de célula T	1,2,3,4
INORGÂNICA	Hensify	Nanobiotix	EMA (2019)	Nanopartículas de Óxido de Háfênio	NP de óxido de háfnio	Carcinoma de células escamosas	1

Fonte: Adaptado de Hawani, 2022 (1); Jia *et al.*, 2023 (2); Thapa e Kim, 2022 (3); e Gadekar *et al.*, 2021 (4).

*Descontinuado.

Destaque em rosa, formulações indicadas para o câncer de mama. RFMPH: Federação Russa; FDA: *Food and Drug Administration*. EMA: *European Medicines Agency*.

2.4.1. Aspectos Gerais na Eficiência de Entrega do Nanocarreador

Levando em consideração os desafios levantados na sessão anterior, os sistemas de entrega nanoparticulados devem ter propriedades específicas durante o seu desenvolvimento, visando o aumento da eficiência terapêutica e redução da toxicidade. Dentre eles estão: i) capacidade alta de encapsulamento; ii) capacidade de funcionalização de sua superfície; iii) alta estabilidade coloidal; iv) controle da taxa de liberação; v) biocompatibilidade, biodegradabilidade e não imunogenicidade; vi) produção com ausência de solventes orgânicos e ingredientes tóxicos; vii) componentes seguros, acessíveis e comercialmente disponíveis; viii) escalabilidade; ix) estabilidade durante processos de manufatura; x) e estabilidade de armazenamento (Halwani, 2022).

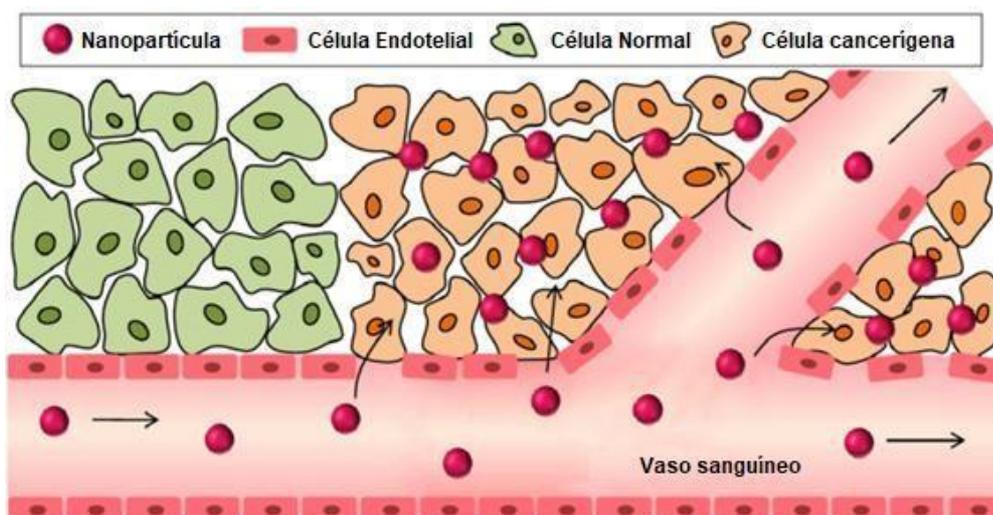
Inicialmente, o desenho racional de nanocarreadores deve levar em consideração não só a encapsulação do material, mas também as estratégias de liberação desse material. Os gatilhos de liberação são convencionalmente classificados em gatilhos extrínsecos (exógenos) e intrínsecos (endógenos). Os gatilhos extrínsecos mais comuns para a terapia antitumoral são: i) a temperatura, onde uma fonte de calor externa é utilizada, e conseqüentemente desorganiza o nanosistema que é estruturalmente dependente de temperaturas mais baixas; ii) ultrassom; iii) e a luz, por fotodegradação utilizando por exemplo, o laser em determinado comprimento de onda. Em relação aos gatilhos endógenos destacam-se, i) o pH, já que o pH tumoral geralmente é menor (<7,0) que em tecidos saudáveis (7,2-7,4) devido ao aumento de ácido lático; ii) o potencial redox, devido ao aumento dos níveis de glutathione em ambientes tumorais quando comparado ao meio extracelular e a células normais; iii) e a temperatura, já que a hipertermia é uma consequência de um ambiente inflamado (Jhaveri; Deshpande; Torchilin, 2014).

No entanto, para que o nanomaterial chegue ao tecido alvo e seja possível a liberação da molécula encapsulada, duas estratégias podem ser utilizadas para a entrega dos nanocarreadores: a acumulação ativa ou acumulação passiva. A funcionalização da superfície de nanopartículas é realizada a fim de direcionar estes sistemas ao tecido de interesse e é o principal método de acumulação ativa. Algumas funcionalizações são feitas a partir da conjugação de ligantes como anticorpos,

aptâmeros e polímeros (Nam *et al.*, 2013).

A acumulação passiva é bastante utilizada, e criticada, na terapia antitumoral. Esta estratégia vale-se do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR) (Figura 11) (Matsumura; Maeda, 1986). Em vasos sanguíneos saudáveis, as células endoteliais possuem espaçamento entre elas de poucos nanômetros, o que inviabiliza a passagem de nanocarreadores com tamanhos superiores (Allen; Cullis, 2004; Vieira; Gamarra, 2016). Entretanto, a alta taxa de proliferação celular de tecidos tumorais leva à rápida angiogênese e, conseqüentemente, formação de vasos sanguíneos desorganizados, o que promove lacunas (Guo *et al.*, 2011; Kanwar; Mahidhara; Kanwar, 2011) de até 800 nm entre as células do endotélio vascular (Allen; Cullis, 2004). O tamanho destas lacunas difere de acordo com as características dos diversos tumores sólidos. Enquanto em modelos de câncer de colón, nanopartículas de até 400 nm acumularam de forma significativa, em câncer de pâncreas apenas aquelas com aproximadamente 30 nm promoveram atividade antitumoral satisfatória (Kim *et al.*, 2016). Visto que o tecido tumoral não possui sistema linfático, os nanocarreadores seguem retidos no tecido cancerígeno, o que aumenta a probabilidade de adentrar nas células e exercer o efeito antitumoral (Matsumura; Maeda, 1986). Isto leva a maior probabilidade de promover o efeito desejado já que as concentrações de fármacos nanoencapsulados podem chegar a uma quantidade 10x maior que o mesmo livre (Northfelt *et al.*, 1996).

Figura 11 - Mecanismo de ação passivo das nanopartículas através do efeito de permeabilidade de retenção aumentada (EPR)



Fonte: traduzido de Nam *et al.*, 2013

Desta forma, tamanhos médios de até 200 nm são indicados para aplicações biomédicas e terapêuticas, especialmente se as moléculas devem ser entregues ao meio intracelular (Guo *et al.*, 2011). A rota de internalização da nanopartícula também deve ser considerada. Em casos em que estes sistemas são endocitados pela célula, um tamanho menor que 100 nm é desejado (Kakizawa *et al.*, 2004b). Além disso, é sabido que quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior a profundidade de alcance da mesma nos tumores sólidos *in vivo* (Kim *et al.*, 2016).

Em adição, a carga superficial também possui papel importante na eficiência de entrega dos nanocarreadores. Para isso, é necessário considerar tanto o aspecto celular, quanto o aspecto sistêmico. Em termos de entrega celular, o mais óbvio seria que o nanocarreador tivesse carga superficial positiva, o que iria favorecer o contato com a membrana celular que possui carga negativa. Estudos *in vitro* mostram uma ótima internalização celular utilizando nanocarreadores carregados positivamente. No entanto, nanocarreadores eletricamente carregados podem ser altamente ineficientes. Isso se deve a possível ligação com proteínas do soro e ativação do sistema imune. Assim, nanocarreadores com cargas superficiais mais neutras são mais recomendados, e para isso, moléculas com grupos hidroxil, como o polietilenoglicol (PEG), ou ligantes zwitteriônicos são utilizados (Nam *et al.*, 2013).

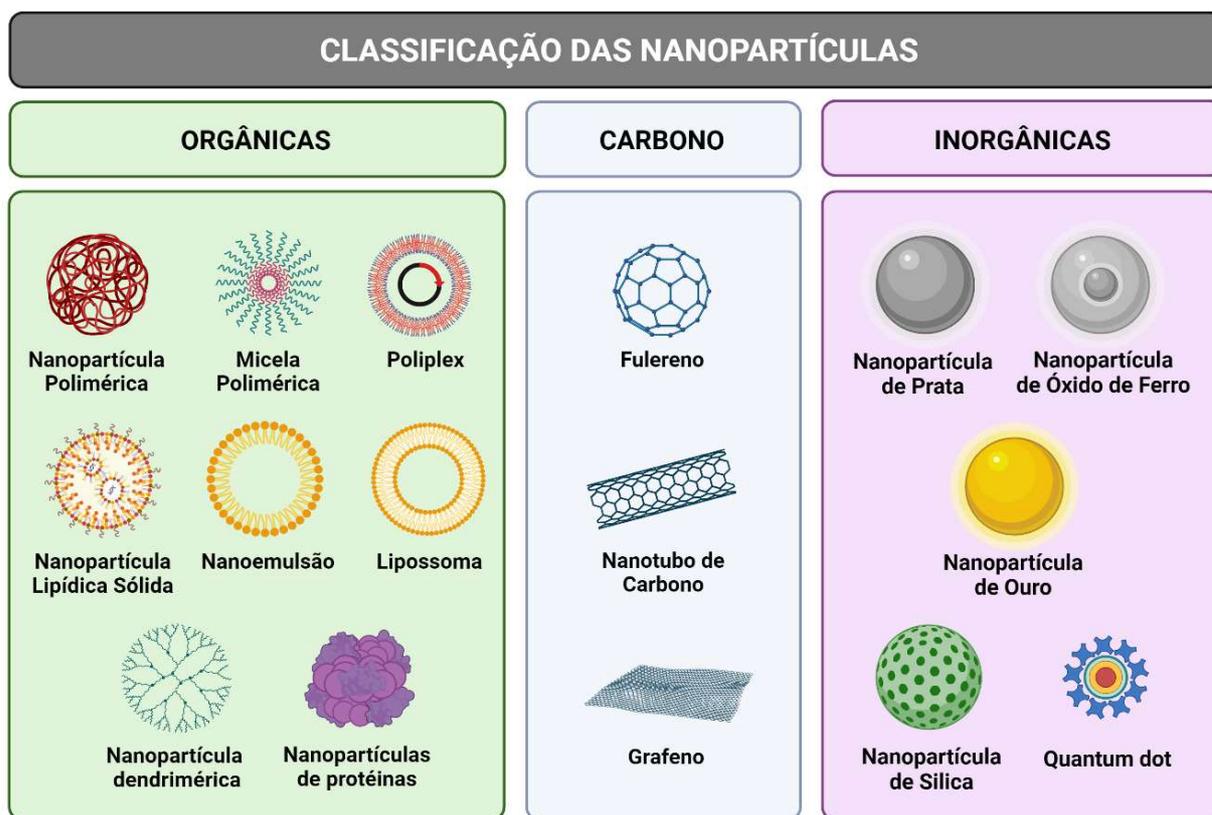
Além do tamanho e carga superficial, outros parâmetros intrínsecos do nanocarreador devem ser observados e testados. A estrutura do nanocarreador deve ser estável suficiente para superar as barreiras biológicas já mencionadas e liberar o fármaco de forma eficaz no local de ação, seja no meio extracelular, citoplasmático ou nuclear. A utilização de materiais biocompatíveis também é um fator importante no desenho de nanocarreadores, no intuito evitar efeitos tóxicos a nível celular e tecidual, além de estratégias para evitar a ativação de respostas imunes. Ainda, a depender da natureza química da molécula a ser encapsulada e da via de administração, certos nanomateriais são mais indicados que outros. Por exemplo, nanopartículas compostas por lipídeos são mais recomendadas para a encapsulação de fármacos hidrofóbicos e em formulações de uso tópico do que nanopartículas de natureza hidrofílica (Nam *et al.*, 2013).

Além disso, a natureza química dos nanocarreadores é utilizada para a

classificação deles. Assim, as nanopartículas não-virais podem ser classificadas de acordo com o componente predominante na sua estrutura em orgânicas, inorgânicas ou baseadas em carbono (Figura 12).

Dentre os componentes inorgânicos, os mais estudados são os metais, materiais semicondutores e as cerâmicas. Nanopartículas de cerâmicas são feitas de carbonatos, carbonetos, óxidos metálicos, metaloides e fosfatos. Estes materiais possuem algumas vantagens importantes como alta estabilidade e capacidade de carga (Joudeh, Linke, 2022). Das mais diversas substâncias químicas dos componentes cerâmicos, pode-se dizer que uma das mais estudadas é o fosfato de cálcio.

Figura 12 - Representação esquemática da classificação dos nanocarreadores



Fonte: Elaborado pela autora com Biorender (2024).

2.4.2. Nanopartículas Híbridas: fosfato de cálcio e polietilenoglicol (PEG)

O fosfato de cálcio é um sal formado por íons de fosfato e cálcio. Este mineral

é um composto biocompatível e com baixa toxicidade celular e é encontrado em ossos, dentes e tendões (Zhang; Kataoka, 2009). Ainda, são interessantes devido a possibilidade de dupla função na aplicação biomédica como agentes teranósticos, além de permitir facilmente a funcionalização da sua superfície que pode promover vantagens como a biocompatibilidade e especificidade. Ainda, exibem alta estabilidade coloidal em relação a tempo, temperatura e pH e não são suscetíveis a ataques microbiológicos (Halwain, 2022). Relatos de estudos deste material datam do século XVIII na utilização de fosfato de cálcio no tratamento de doenças ósseas (Van Rijt *et al.*, 2022). Ao longo dos anos, a aplicação deste material foi evoluindo, e em 1973, Graham e Van der Eb demonstraram a utilização do fosfato de cálcio como sistema de entrega produzido a partir do método de precipitação (Graham; Van der Eb, 1973).

A precipitação dos cristais de fosfato de cálcio é realizada a partir da mistura de soluções aquosas em condições estequiométricas (Kakizawa; Kataoka, 2002). Ao início deste processo, ocorre a fase de nucleação onde se formam pequenos agregados iniciais e instáveis de fosfato de cálcio amorfo até que um dos solutos seja totalmente consumido. Esta substância amorfa apresenta estrutura atômica desorganizada e permite a incorporação de moléculas de interesse. Em seguida, a esse material amorfo irá se reorganizar, agregar e crescer. Esta é a fase de crescimento (Uskokovic; Uskokovic, 2010). No entanto, este material é incapaz de permanecer em uma escala nanométrica sem uma molécula estabilizadora. Por isso, uma etapa adicional de estabilização é necessária para evitar o crescimento descontrolado dos cristais (Sousa Filho; Serra, 2015).

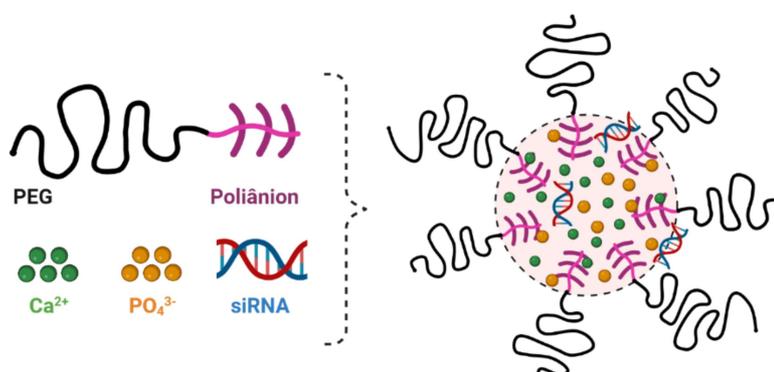
A estabilidade dos nanocarreadores pode ser alcançada a partir de duas estratégias principais: estabilização eletrostática ou estabilização estérica. A primeira possui origem na força repulsiva das cargas superficiais das partículas. Esta carga superficial é denominada potencial Zeta, e é comumente estabelecido que um valor maior que $|30 \text{ mV}|$ é suficiente para manter o sistema estável a partir da repulsão eletrostática entre as nanopartículas (Nam *et al.*, 2013; Bhattacharjee, 2016). Já a estabilização estérica, vale-se do uso de moléculas não iônicas de caráter hidrofílico que geram potencial Zeta neutro (Evans; Napper, 1973; Lourenço, 1996; Perrault *et al.*, 2009). A molécula mais conhecida para este fim é o polietilenoglicol (PEG).

O PEG é um polímero de caráter não-iônico e hidrofílico muito utilizado no desenvolvimento de nanocarreadores (Kakizawa *et al.*, 2004a; Kakizawa *et al.*,

2004b), principalmente na conferência de estabilidade coloidal. Outras vantagens importantes proporcionadas por este polímero é a redução de interações com biomacromoléculas *in vivo* (Pelaz *et al.*, 2015) e maior tempo de circulação no sangue, que leva a uma maior biodisponibilidade e maior probabilidade de acumulação das nanopartículas no tecido neoplásico devido ao efeito EPR (Perrault *et al.*, 2009).

Dessa forma, em 2002, Kakizawa e Kataoka publicaram pela primeira vez um estudo que utilizava o PEG em copolímero em bloco não só no controle do crescimento dos cristais de fosfato de cálcio, mas também na estabilização coloidal da dispersão como um todo. Copolímeros em bloco são formados por uma sequência de monômeros de tipo X ligados covalentemente a uma sequência de monômeros de tipo Y. No caso dos autores, eles utilizaram o polímero poli(ácido aspártico) ligado ao PEG. Esse copolímero permite a ligação ao íon cálcio a partir do bloco polianiónico. Assim, a região aniônica é internalizada, enquanto a região do PEG permanece externa, recobrando a nanopartícula (Kakizawa; Kataoka, 2002). A união do fosfato de cálcio inorgânico com o bloco de copolímero PEG-poliânion permite a produção das chamadas nanopartículas híbridas (Figura 13) onde o siRNA está incorporado no núcleo de fosfato de cálcio (Kakizawa, Kataoka, 2002; Pittella *et al.*, 2011).

Figura 13 - Representação da nanopartícula híbrida formada pelo núcleo inorgânico composto por fosfato de cálcio, com siRNA complexado, e pelo revestimento orgânico de bloco de copolímero PEG-poliânion



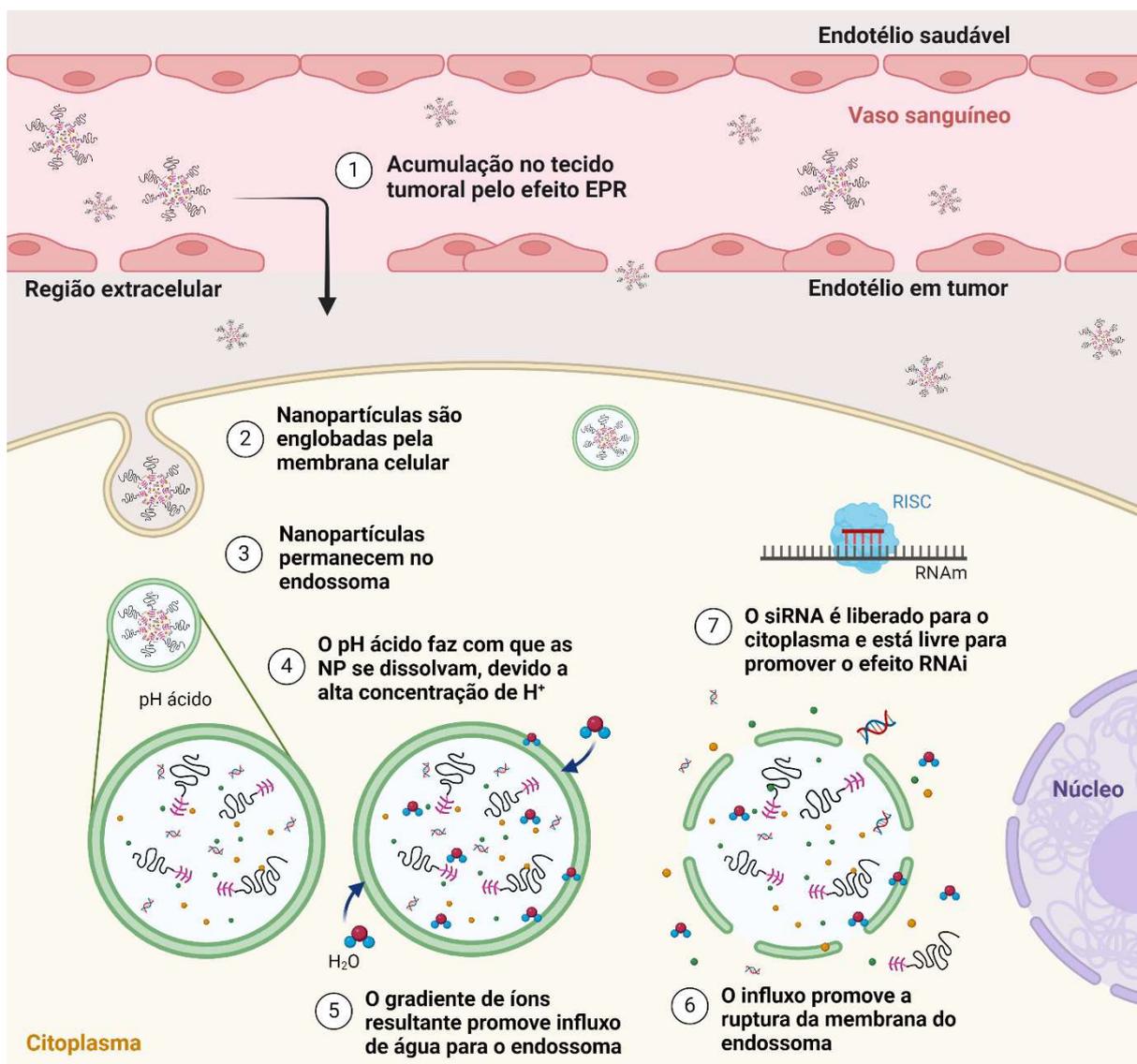
Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024), adaptado de Pittella *et al.*, 2011.

Diversos estudos utilizaram nanopartículas híbridas similares como carreador

de fármacos ou genes (Kakizawa; Kataoka, 2002; Kakizawa *et al.*, 2004a; Kim *et al.*, 2011; Pittella *et al.*, 2011, 2012, 2014; Maeda *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2021; Mello Jr *et al.*, 2017, Valle *et al.*, 2019). Uma das grandes vantagens destas nanopartículas é o seu processo de síntese, que é realizada a partir da mistura de soluções de íons de fosfato e cálcio em condições estequiométricas. Isso resultará na formação de cristais em escala nanométrica por simples auto-associação dos constituintes (Kakizawa; Kataoka, 2002). Ademais, não é necessária a utilização de solventes orgânicos, possuem baixo custo e encapsulam eficientemente o material genético (Zhang; Kataoka, 2009).

Tão importante quanto a internalização do composto desejado, é a liberação do mesmo. Estudos anteriores já observaram que nanopartículas de fosfato de cálcio são internalizadas pelas células através da endocitose (Kakizawa *et al.*, 2004b; Pittella *et al.*, 2011). Uma vez endocitadas, as nanopartículas seguem no interior de endossomas/lisossomas, e o pH ácido deste compartimento celular promove uma desorganização das nanopartículas, devido a maior concentração de íons H^+ . O gradiente de íons resultante promove o influxo de água do meio intracelular para o interior do endossoma. Este influxo causa a ruptura da membrana deste compartimento (Figura 14) e o material encapsulado é liberado ao citoplasma. No caso da terapia por RNAi, o local de ação das moléculas de siRNA é o citoplasma e, uma vez liberadas, estas moléculas são capazes de promover o efeito de interferência por RNA (Kakizawa *et al.*, 2004b). Assim, diante do exposto, está evidente a grande vantagem em utilizar os nanocarreadores híbridos de fosfato de cálcio recobertos com PEG na entrega de genes na terapia antitumoral.

Figura 14 - Representação de internalização e escape endossomal promovido pelas NP



Fonte: Elaborado pela autora com BioRender (2024).

2.4.3 Nanoformulações e a terapia de RNAi

Finalmente, após 23 anos da aprovação do primeiro nanomedicamento e 20 anos após a descrição do mecanismo de RNAi, a formulação comercialmente denominada Onpattro (Patisiran) foi o primeiro medicamento baseado nesse mecanismo aprovado pelo FDA em 2018 (Kaiser, 2018). Esse medicamento foi desenvolvido pela Alnylam Pharmaceuticals e é destinado ao tratamento uma doença

rara chamada amiloidose de transtirretina (TTR). Transtirretina é uma proteína responsável pelo transporte de vitamina A e do hormônio tireoideano tiroxina. No entanto, nesta enfermidade esta proteína é produzida de forma anormal. A proteína defeituosa é depositada no coração e nervos periféricos, causando cardiomiopatia. Assim, o silenciamento do gene que traduz esta proteína defeituosa é realizado a partir da terapia por RNAi com o auxílio de nanopartículas lipídicas incorporando siRNA (Onpattro, 2018).

A aprovação do Onpattro abriu as portas para uma nova classe de medicamentos baseados em RNAi, e até o presente momento já foram aprovados outros cinco nanomedicamentos baseados nesse mecanismo, cujas plataformas de entrega são nanopartículas lipídicas e conjugados de siRNA (Tabela 5). Outras 15 nanoformulações baseadas em RNAi estão em fases de ensaio clínico pela mesma empresa (Alnylam Pharmaceuticals, 2024).

Tabela 5 - Nanoformulações baseadas em RNAi atualmente aprovadas pelo FDA e EMA e disponíveis comercialmente

Nome comercial	Droga	Doença	Ano
ONPATTRO ®*	Patisiran	Amiloidose de transtirretina com polineuropatia	2018
GIVLAARI ®*	Givosiran	Porfíria hepática aguda	2019
OXLUMO ®*	Lumasiran	Hiperoxalúria primária do tipo 1	2020
Leqvio ®*	Inclisiran	Hipercolesterolemia	2021
AMVUTTRA ®*	Vutrisiran	Amiloidose de transtirretina com polineuropatia	2022
Rivfloza TM	Nedosiran	Hiperoxalúria primária	2023

Fonte: Alnylam, 2024.

* Aprovado pela ANVISA

3 OBJETIVOS

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de entrega de nanopartículas híbridas e o efeito de RNAi *in vitro* e *in vivo* no silenciamento do gene HOXB7 na terapia anticâncer com e sem o cotratamento com o tamoxifeno.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.3.1 Preparar nanopartículas híbridas através de auto-associação, utilizando como componentes fosfato de cálcio, PEG-poliânion e siRNA;
- 3.3.2 Caracterizar as nanopartículas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, distribuição de tamanho, potencial Zeta, morfologia, eficiência de encapsulação e estabilidade coloidal;
- 3.3.3 Avaliar a citotoxicidade e potencial migratório das células após o tratamento com NP-siHOXB7;
- 3.3.4 Avaliar a eficiência de entrega de siRNA pelas nanopartículas híbridas *in vitro*;
- 3.3.5 Avaliar a capacidade hemolítica das nanopartículas híbridas;
- 3.3.6 Purificar as nanopartículas híbridas para aplicação *in vivo*, e caracterizá-las;
- 3.3.7 Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* após tratamento com as nanopartículas carreando siRNA-HOXB7 com e sem o cotratamento com tamoxifeno;
- 3.3.8 Verificar o silenciamento do gene HOXB7 no tecido tumoral após tratamento com as nanopartículas carreando siRNA-HOXB7;
- 3.3.9 Avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos após os tratamentos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 MATERIAIS

Cloreto de cálcio, fosfato dissódico, ácido N-[2-Hidroxi-etil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), cloreto de sódio e formaldeído foram adquiridos da Sigma Aldrich. Fosfato de sódio dibásico foi adquirido da Proquimios. Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) foi adquirido da Amersham Biosciences. Bloco de copolímero polietilenoglicol-bloco-poli-L-ácido glutâmico (PEG-pGlu) (peso molecular 13 kDa) foi adquirido da Alamanda Polymers, Inc. Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e tripsina foram adquiridos da Gibco. Azul tripan e brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT) adquiridos da Invitrogen. Matrigel Matrix (Corning, EUA). Citrato de tamoxifeno (TMX) foi adquirido pela Sigma-Aldrich. Cipionato de estradiol foi adquirido da Agrominas (São Paulo, Brasil). Pi-Clear RNA Total foi adquirido da Pi-Biotech Genética Avançada Ltda (Brasil). *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* adquirido da Applied Biosystems (Foster City, California, EUA). *qPCR-SYBR-Green mix* adquirido da Ludwig Biotecnologia Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil). As sequências de siRNA *HOXB7* e siRNA-Cy5 foram sintetizadas pela Sigma-Aldrich. A mesma empresa sintetizou as seguintes sequências de primer: CCAACCGCGAGAAGATGA (*β-actina forward*), CCAGAGGCGTACAGGGATA (*β-actina reverse*), ACCGACACTAAAACGTCCT (*HOXB7 forward*) e AAACCGAACTTGAGGCTGGA (*HOXB7 reverse*).

4.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

As nanopartículas híbridas (NP) foram preparadas por auto-associação dos constituintes através de mistura simples e estequiométrica de soluções aquosas, baseada no trabalho de Kakizawa e Kataoka (2002), com modificações. Inicialmente, uma solução de CaCl₂ 2,5 M (PM=111 g/mol) foi diluída em solução tampão TRIS 25 mM (PM=121,14 g/mol) formando a solução 1 (1:11,5 v/v). A solução 2 foi preparada adicionando-se siRNA, em 1000 µg/mL de poli(etilenoglicol)-bloco-poli(ácido

glutâmico) (PEG-PGlu) (5K-50DP) diluído em TRIS-HCl, e uma solução tampão HEPES 50 mM (PM=238,3 g/mol), Na₂HPO₄ 1,5 mM (PM=142,07 g/mol) e NaCl 140 mM (PM=58,44 g/mol) na proporção de 1:1:3 v/v. A solução 2 foi adicionada a solução 1 e homogeneizadas para a obtenção de concentração final de siRNA em 1,5 µM. Devido à interação eletrostática entre os constituintes, NP incorporando siHOXB7 (NP-siHOXB7) e NP vazias sem siRNA (NP-mock) foram obtidas. Todas as soluções iniciais foram esterilizadas por filtração (0,22 µm). Todas as NP foram preparadas em fluxo laminar, para garantir esterilidade.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

4.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho, do índice de polidispersão e do potencial Zeta das nanopartículas híbridas

A determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas (NP), diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão (Pdl) foram obtidos utilizando o equipamento Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, UK) a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering – DLS*) utilizando cubeta de quartzo (ZEN2112) a 25 °C após a preparação das NP. Essa técnica se baseia na análise das flutuações de intensidade de espalhamento de luz de NP em movimento Browniano em um determinado ângulo (neste caso, 173°), quando um feixe de luz é incidido sobre a dispersão. Essas flutuações são analisadas pelo método cumulativo e o coeficiente de difusão obtido é utilizado para cálculo dos diâmetros hidrodinâmicos e índice de polidispersão da população usando a equação de Stokes-Einstein. Além disso, a concentração de nanopartículas foi analisada no mesmo equipamento pela técnica de espalhamento dinâmico de luz multiangular (*Multi-angle Dynamic Light Scattering - MADLS*).

A mesma técnica foi realizada após purificação das nanopartículas híbridas para posterior injeção em animais. Para isso, os mesmos parâmetros foram analisados, após centrifugação (3000 rpm por 20 min) de 1,2 mL de nanopartícula em dispositivo Amicon de Ultracentrifugação MWCO 30 kDa (Millipore, EUA).

A determinação do potencial Zeta foi realizada a partir da técnica de mobilidade eletroforética com mesmo equipamento. O potencial Zeta se refere ao potencial elétrico na interface da dupla camada de íons entre a partícula e o meio dispersivo. Essa técnica se baseia na análise da velocidade da migração das partículas em direção ao eletrodo com carga oposta após aplicação de um campo elétrico. A velocidade desse deslocamento é diretamente proporcional à intensidade do campo elétrico e do valor de potencial Zeta (Sze *et al.*, 2003). Para isso, foi aplicado um potencial de 10mV utilizando cubeta específica e os valores foram determinados a partir da equação de Smoluchowski.

4.3.2 Determinação da morfologia das nanopartículas

A determinação da morfologia das NP foi realizada no Centro de Investigação Cooperativa de Biomateriais (CIC biomaGUNE, Espanha) utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET) com o equipamento JEOL JEM-1400 PLUS (Jeol LTD., Tokyo, Japan) operado em voltagem de aceleração de 40-120 kV. Uma amostra da solução de NP foi depositada em grades de carbono (previamente limpas com plasma) seguido de secagem por 10 min a temperatura ambiente. Para análise da morfologia, o microscópio foi operado em modo de campo brilhante com ampliação de até 50.000x.

4.3.3 Eficiência de encapsulação de siRNA

A eficiência de encapsulação foi determinada pelo método indireto. Para isso, as amostras de NP-siRNA e *NP-mock* foram primeiramente alocadas em filtros Amicon de Ultracentrifugação MWCO 30 kDa (Merck, EUA), em peso molecular que permite a passagem de moléculas de siRNA (~14 kDa) não encapsuladas. Estes foram centrifugados a 15.000 rpm por 20 min, utilizando centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). O filtrado foi coletado e medido em espectrofotômetro Nanodrop Spectrophotometer ND 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) em comprimento de onda 260nm. Para obter a curva de calibração foram preparadas

soluções de siRNA em água estéril nas concentrações de 0,4 µM a 1,5 µM. A partir da equação da curva de calibração foi possível determinar a concentração de siRNA livre no filtrado e calcular a porcentagem de incorporação de siRNA pelas NP (Fórmula I)

Fórmula I:

$$(I) \% \text{ siRNA encapsulado} = \frac{\text{Concentração inicial} - \text{Concentração final}}{\text{Concentração inicial}} \times 100$$

4.3.4 Estabilidade coloidal das nanopartículas

A estabilidade do sistema nanoestruturado foi avaliada a partir de leituras regulares (0, 15, 30, 90 e 180 dias). Para isso, soluções de NP foram estocadas a 4 °C e avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão, conforme já descrito no item 4.3.1. Além disso, a estabilidade imediata das NP foi avaliada frente a alteração de temperatura (25 °C a 40 °C) e de pH (4,5 a 7,2).

Ainda, um pré-ensaio de liofilização foi realizado utilizando ou não sacarose como crioprotetor. Primeiramente, *NP-mock* foram sintetizadas e submetidas ao processo de congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas ao processo de liofilização utilizando o liofilizador LD Plus Alpha 1-2 (Martin Christ, Alemanha) sob pressão de 0,064 mbar e temperatura -53 °C *overnight*. Após esse período, as NP foram ressuspensas em água Milli-Q estéril e analisadas conforme já descrito.

4.4 ENSAIOS *IN VITRO*

Os experimentos *in vitro* foram realizados com linhagem celular MCF-7 (ATCC). Essa linhagem é do subtipo Luminal A, portanto, possui expressão dos receptores de estrogênio e progesterona. As células foram mantidas em garrafas de cultura celular com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, além de 1% de penicilina-estreptomicina. As garrafas com as células foram encubadas

em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. As células foram semeadas a uma densidade de 1 x 10⁶ células por garrafa e submetidas a transferência a cada 48 h em fluxo laminar. A suplementação com estradiol não foi realizada, já que o vermelho de fenol pode agir como um substituto molecular do estrogênio como já relatado anteriormente (Wesierska-Gadek et al., 2007).

Para cada experimento as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de meio de cultura recomendado. O número de células viáveis foi avaliado através do método de exclusão do Azul de Trypan para posterior plaqueamento de células de acordo com cada experimento.

4.4.1. Viabilidade Celular

Culturas de células com alta viabilidade foram escolhidas e semeadas em 100 µL de meio de cultura a uma densidade de 5 x 10³ de células por poço (n = 6) em placa de 96 poços estéril e incubadas *overnight* a 37 °C em 5% CO₂. Suspensões de nanopartículas (NP) contendo siHOXB7 foram adicionadas aos poços para a obtenção de concentrações finais de 150 nM, 100 nM, 50 nM e 10 nM de siHOXB7. NP-*mock* (sem siRNA) e siRNA *naked* (siRNA livre) foram utilizados como controles negativos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 h e 48 h. Após o tempo de incubação, o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio]} foi adicionado e as placas foram novamente incubadas por 4h nas condições anteriores. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) após o tempo determinado. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Biotek Synergy H1 em comprimento de onda 540 nm. O grupo controle contendo apenas meio de cultura foi considerado como 100% de células viáveis e comparado aos tratamentos, sendo os resultados expressos em porcentagem.

4.4.2. Ensaio de Cicatrização (*Wound Healing*)

Células MCF7 foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 6

x 10⁴ células/poço (n = 4). Após 24h e observação de uma camada única de células, o meio foi removido, seguido de lavagem com PBS 1x e ruptura vertical contínua da monocamada utilizando uma ponteira de 200 µL. As ranhuras foram consistentes entre os poços. Após nova lavagem, as células foram tratadas com NP-siRNA (150 nM) e siRNA (150 nM) e foram obtidas imagens nos tempos 0 h, 6 h, 24 h e 48 h utilizando microscópio de fluorescência invertido Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a câmera digital Hamamatsu Orca-ERcom. As imagens foram processadas e a área livre da ferida foi determinada utilizando o software ImageJ.

4.4.3. Eficiência de Efeito de RNAi: ensaio *GFP*

Primeiramente, células *A549-GFP* (transformadas) foram plaqueadas em placas de 24 poços a uma densidade de 6 x 10⁴ células por poço e incubadas *overnight* em incubadora a 37 °C e 5% CO₂. Os tratamentos e controles foram adicionados e após 24 h o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS1x e meio novo foi adicionado. Após 72 h, as células foram tripsinizadas, realocadas em tubo de vidro e analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCantoll (BD Biosciences, New Jersey, EUA). Os dados foram processados e analisado no software online Floreado.io. Os tratamentos e controles utilizados foram: (1) meio, (3) NP-si*GFP* 150Nm e (4) si*GFP* 150 nM.

4.4.4. Hemólise

A atividade hemolítica foi avaliada visando esclarecer o potencial hemolítico induzido pelos componentes das NP a partir do método descrito por Silva e colaboradores (2021). Primeiramente, amostra de sangue de camundongo saudável foi obtida por punção cardíaca e os eritrócitos foram separados por centrifugação (2.000 rpm por 5 min) e lavados três vezes com solução de cloreto de sódio 0,9%. Em seguida, o equivalente a 1 mL de eritrócitos foram ressuspensos em 10 mL de salina.

Os controles positivo e negativo foram preparados ao adicionar 10% (v/v) de soluções Triton X-100 0,1% e cloreto de sódio 0,9%, respectivamente. O mesmo foi

realizado com os tratamentos em diferentes concentrações de NP incorporando siRNA *scramble* e *NP-mock* (10-200nM).

Em seguida, as amostras foram incubadas por 1h a 37 °C sob agitação e posteriormente centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram removidos e analisados por espectrometria em comprimento de onda de 415 nm. A taxa de hemólise (%) foi calculada a partir da Fórmula II:

Fórmula II:

$$(II) \% \text{ Hemólise} = \frac{ABS \text{ amostra} - ABS \text{ negativo}}{ABS \text{ positivo}} \times 100$$

Em seguida, os pellets foram ressuspensos e 10 µL da dispersão foi depositado em lâmina e coberto com lamínula para observação em microscópio óptico posterior captura de imagem.

4.5. ENSAIOS *IN VIVO*

4.5.1. Preparação do Modelo Animal de Tumor de Mama

Camundongos imunossuprimidos NUDE fêmeas, com idade de 6-8 semanas foram utilizados no ensaio de avaliação de atividade antitumoral. Os animais foram acondicionados e aclimatados em recintos de plástico (15×36×30 cm) forrados com serragem, substituída a cada três dias para higiene e manutenção. O ambiente de permanência e experimentos com os animais teve a temperatura controlada (23 °C± 1 °C) e ciclo claro/escuro de 12 h. Os animais tiveram acesso à água e alimento *ad libitum*. Durante todo o período experimental, sinais de dor, estresse e desconforto foram analisados no intuito de determinar o ponto final humanitário. Além destes, outros fatores foram avaliados como alteração na massa corporal, mudanças no consumo de comida e água e aparência física. Os experimentos seguiram de acordo com os preceitos éticos para experimentação animal e foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), sob parecer número 49/23 (Anexo A).

As células MCF-7 utilizadas no ensaio *in vivo* foram doadas pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Considerando que a linhagem celular MCF7 é

hormônio dependente, os animais foram submetidos a um pré-tratamento com estradiol/óleo de gergelim (1,5 mg/kg) por duas semanas por via intraperitoneal, anteriormente a inoculação das células. Concluído este período, 2×10^6 células (1:1, PBS:Matrigel) foram injetadas pela via subcutânea na mama inferior direita dos animais e o tratamento com estradiol seguiu durante todo o experimento, sendo aplicado duas vezes por semana.

4.5.2. Atividade Antitumoral

O ensaio de atividade antitumoral foi dividido em dois ensaios independentes. Em ambos os ensaios, os animais foram divididos em três grupos. O Ensaio 1 comparou os grupos Salina (n=4), NP-siHOXB7 (n=5) e Cotratamento (n=5). O Ensaio 2 comparou os grupos Salina (n=4), Cotratamento (n=4) e TMX livre (n=4). Os tratamentos com salina de NP-siHOXB7 foram administrados pela via intravenosa através da veia lateral caudal (100 μ L por injeção). A administração das NP-siHOXB7 foi realizado após a purificação das nanopartículas para obtenção de 25 μ g de siRNA por dose. O TMX (10 mg/kg) foi injetado juntamente com estradiol através da via intraperitoneal de maneira lenta e cuidadosa (40 μ L por injeção). Cada tratamento foi realizado cinco vezes distribuídos em 14 dias. Os parâmetros avaliados foram o tamanho do tumor e a massa de cada animal, verificados periodicamente até eutanásia dos animais. Um paquímetro foi empregado para dimensionar os tumores e a seguinte fórmula adaptada (Euhus *et al.*, 1986) foi utilizada para calcular o volume tumoral:

$$volume = 1/2 (comprimento \times largura^2)$$

4.5.3. Avaliação da Expressão Gênica

A avaliação da expressão do gene *HOXB7* foi realizada após 24h da última injeção de tratamento e 100 mg de tecido tumoral foram separados e congelados a -80 °C para posterior processamento e extração de RNA, que se deu utilizando o kit Pi-Clear RNA Total (Pi-Biotech, Brasil), conforme instruções do fabricante. A integridade e concentração de RNA total extraído foi determinada por Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific, EUA)

Anteriormente à reação de transcriptase reversa, a concentração de RNA foi padronizada com água RNase free para a mesma concentração por amostra. A síntese de cDNA foi feita utilizando o High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, EUA) conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf, Alemanha).

Após a síntese de cDNA, a reação de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) para a análise da expressão do gene *HOXB7* foi realizada em equipamento 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems, EUA) utilizando qPCR-SYBR-Green mix (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante nas condições conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Condições da reação de qPCR para o gene *HOXB7*

	Holding		60 ciclos		Curva de dissociação			
Tempo	2 min	2 min	15 s	1 min	15 s	1 min	15 s	15 s
T (°C)	50	95	95	60	95	60	95	60

A normalização da expressão gênica foi feita utilizando a β -actina humana como gene *house-keeper* e a expressão gênica foi quantificada através de curva padrão, normalizada pela expressão de β -actina e relativizada como porcentagem da expressão normalizada do controle não tratado.

4.5.4. Avaliação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Após 24 h da última injeção de nanopartículas e de controles, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca em tubos apropriados contendo heparina dos animais do Ensaio 2. O perfil hematológico dos animais foi determinado a partir de amostras de sangue total, processadas pelo laboratório Gold Lab Vet em São Paulo. Foram realizadas as contagens de leucócitos totais e diferencial, plaquetas, hemácias, além da determinação da concentração de hemoglobina e da porcentagem de hematócrito dos animais, VCM (Volume Corpuscular Médio) e CHCM (Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média). Além disso, a avaliação do perfil bioquímico dos animais incluiu a determinação de AST (Aspartato Aminotransferase), ALT (Alanina Aminotransferase), ureia e creatinina e proteína plasmática. Esse estudo foi realizado

apenas nos grupos Controle, cotratamento e TMX.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) e Two-way ANOVA foi realizada para testar os efeitos dos tratamentos e o teste de Bonferroni foi usado para comparações entre os grupos de tratamentos individuais, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Além disso, teste t pareado foi realizado para avaliar métricas da mesma amostra antes e após determinado tempo ou processo. Ainda, a taxa de sobrevivência foi calculada a partir da curva de Kaplan-Meier com análise Log-rank. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados foram expressos em valores médios \pm erro padrão da média, exceto quando devidamente identificado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

As nanopartículas híbridas (NP) foram preparadas por auto-associação dos constituintes incorporando (NP-siRNA) ou não (*NP-mock*) a molécula de siRNA complementar ao gene *HOXB7* na presença de um bloco de copolímero ânion-PEG. Esse método foi primeiramente proposto por Kakizawa e Kataoka (2002) e vastamente explorado pelo grupo com o objetivo de encapsular material genético. Recentemente, outros autores, compararam dois métodos para a síntese de NP de fosfato de cálcio revestidas com polímero: (1) a precipitação do mineral com posterior adição do polímero e (2) a precipitação juntamente com o polímero. Eles observaram que apenas o segundo método resultou em NP menores que 100 nm (Mitrach *et al.*, 2021), corroborado pelo atual trabalho.

A molécula de siRNA utilizada é a mesma desenhada pela própria autora (Tabela 7) em trabalhos anteriores (Valle, 2019; Valle *et al.*, 2019) e possui quatro dos oito critérios apontados por Reynolds *et al.* (2004), três dos seis critérios apontados por Amarzguioui *et al.* (2004) e dois de quatro dos critérios apontados por Ui-Tei *et al.* (2004) para um desenho mais eficiente de siRNA. Dentre os critérios contemplados, o mais importante e que possui maior correlação com eficiência da molécula de siRNA, é a baixa estabilidade interna na extremidade 3' da fita senso (Amarzguioui *et al.* (2004).

Tabela 7 - Características da molécula de siRNA.

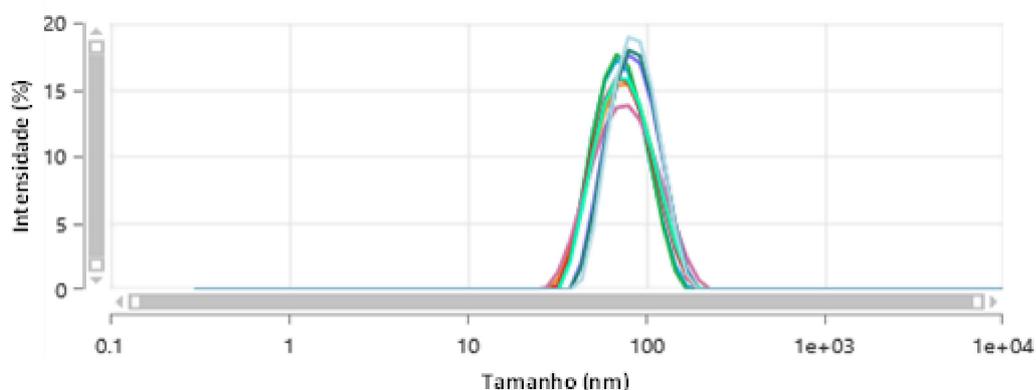
Fita	Sequência (5' – 3')	Espécie	%GC	MW
Senso	ACCUACCACUCGCGUGUUC[dT][dT]	<i>H. sapiens</i>	52,3	13.330
Antisenso	GAACACGCGAGUGGUAGGU[dT][dT]			

5.1.1 Distribuição de tamanho, diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (Pdl) e concentração de NP

Anteriormente, um ensaio de formulação foi realizado para verificar o controle de formação da nanopartícula de acordo com a concentração de polímero usado (dado não mostrado). Importante destacar que, quanto maior a concentração de polímero, menor é a eficiência de encapsulação, porém maior a estabilidade do sistema (Valle, 2019). Portanto, após este estudo, a concentração de 1000 µg/mL foi escolhida para dar seguimento aos experimentos.

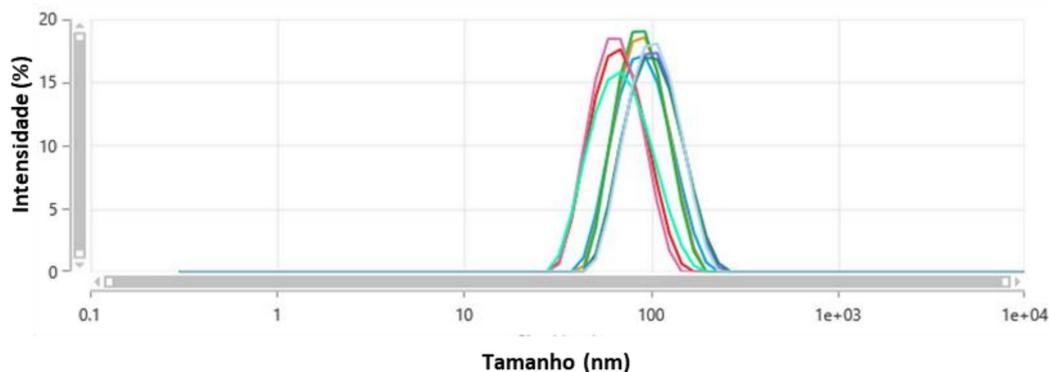
Assim, as NP foram avaliadas de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas. Visualmente é possível observar uma dispersão translúcida, homogênea e livre de precipitados. De acordo com análise microscópica, foi verificada a distribuição de tamanho, tamanho hidrodinâmico médio e índice de polidispersão para NP-siRNA (Figura 15, Tabela 6) e NP-mock (Figura 16, Tabela 6).

Figura 15 - Curva de distribuição de tamanho por intensidade das NP com siRNA encapsulado. Histograma de nove leituras de três NP independentes.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 16 - Curva de distribuição de tamanho por intensidade das NP sem siRNA encapsulado. Histograma de nove leituras de três NP independentes.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os resultados obtidos pela técnica de DLS revelaram tamanho hidrodinâmico médio de aproximadamente 74,4 e 82,2 nm para as NP-siRNA e NP-mock, respectivamente. Observa-se, no entanto, que a NP-mock apresentou um tamanho ligeiramente maior que aquelas incorporando siRNA ($p > 0,05$, Tabela 8). Uma possível explicação é devido a diferente quantidade de cargas negativas dentro da nanopartícula, já que, o grupo fosfato do siRNA não está presente em NP brancas. Isso faz com que o excesso de cálcio consuma maior quantidade de cargas negativas até a estabilização pelo polímero. Ademais, em geral, o PEG foi eficiente no controle do tamanho das nanopartículas de fosfato de cálcio, como também observado por outros autores (Giger, *et al.*, 2012; Maeda *et al.*, 2014; Mello Jr. *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021). Ainda, o revestimento com PEG promove um potencial Zeta próximo de zero às nanopartículas (Tabela 8), o que é importante na camuflagem delas às barreiras biológicas em aplicação *in vivo*.

Tabela 8 - Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta das nanopartículas híbridas

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Pdl	Potencial Zeta
NP-siRNA	74,4 ± 5,5	0,1 ± 0,03	-1,16 ± 0,95
NP-mock	82,2 ± 14,5	0,1 ± 0,02	-0,86 ± 0,1

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

Dessa forma, as NP apresentaram características desejáveis para aplicações biomédicas, principalmente se tratando de administração intravenosa na terapia anticâncer. Isso está relacionado aos tamanhos abaixo de 100 nm, baixo valor de Pdl e distribuição de tamanho com pico unimodal e simétrico, o que indica uma dispersão homogênea. De acordo com alguns autores, tamanhos abaixo de 100 nm são altamente recomendadas para a entrega de moléculas às células cancerígenas (Matsumara; Maeda, 1986; Perrault *et al.*, 2009; Kakizawa *et al.*, 2004b). Complementarmente, valores de Pdl abaixo de 0,3 são considerados ideais e indicam uma distribuição monodispersa do tamanho das nanopartículas (Muller; Henemann, 1992; Statefeld; Mckenna; Patel, 2016). Resultados semelhantes foram observados por Gao e colaboradores (2015), Mello Jr e colegas (2017) e Souza e colaboradores (2021) que utilizaram NP similares.

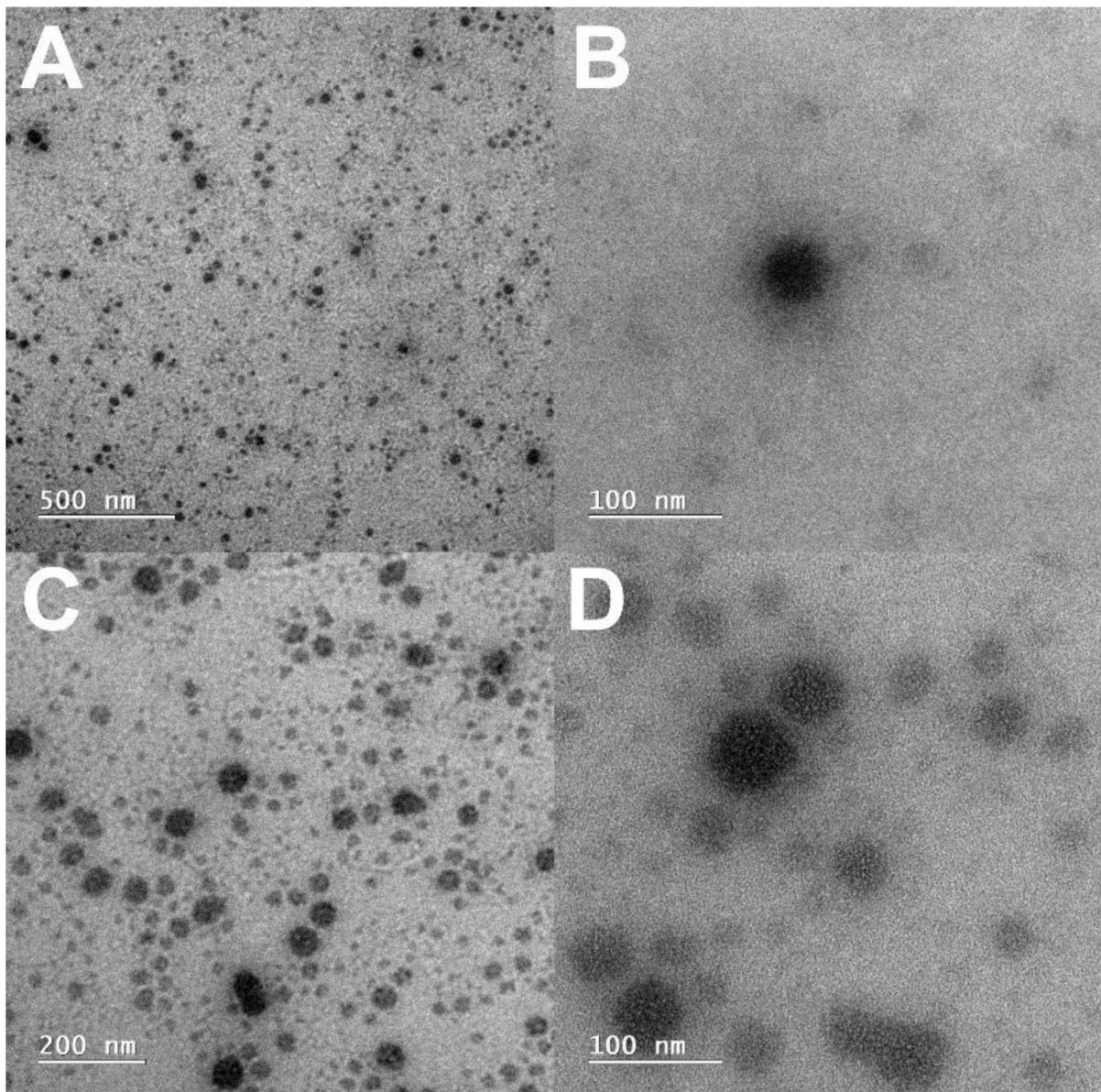
Ainda, a análise da concentração de nanopartículas é importante e pode ser relacionada a diversos parâmetros em estudos *in vitro* e *in vivo*. Existe uma ligação direta entre os resultados de citotoxicidade, efeito terapêutico em animais e a concentração de nanopartículas disponíveis na formulação. É necessário entender essa relação para que seja aplicada a concentração funcional que não proporcionará toxicidade celular e tecidual, mas que permitirá efeito terapêutico significativo (Soenen *et al.*, 2009). Assim, a concentração de nanopartículas observadas nesse estudo foi de $5,8 \times 10^{10} \pm 2,2 \times 10^9$ partículas/mL de dispersão, enquanto Souza (2016) observaram concentração de $1,7 \times 10^{12}$ partículas/mL. Essa diferença pode estar relacionada a pequenas modificações na própria síntese de nanopartículas, assim como a técnica empregada para a quantificação da concentração, que no caso de Souza (2016) foi utilizado a técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e no presente estudo utilizou-se o DLS. No entanto, embora tenha sido obtida concentrações diferentes de nanocarreadores, a concentração final de siRNA é a mesma, e por isso, não haverá perda de eficiência de transfecção. Ademais, como explícito nos tópicos abaixo, a concentração de nanopartículas e de siRNA promoveu efeitos antitumorais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que demonstra concentração minimamente ideal para o estudo pretendido.

5.1.2 Morfologia das nanopartículas híbridas

No intuito de confirmar e complementar os resultados obtidos pela técnica de DLS, a morfologia das nanopartículas híbridas foi observada a partir de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens (Figura 17) a seguir são relacionadas a NP-siRNA (A e B) e *NP-mock* (C e D) e, assim como em resultados anteriores (Valle, 2019), as nanopartículas apresentaram morfologia esférica. Essa forma geométrica é considerada vantajosa para algumas aplicações biomédicas, como por exemplo o deslocamento em fluxo sanguíneo e a captação celular. Como não possui dependência orientacional, o deslocamento em meio aquoso nos vasos sanguíneos e a sua incorporação pela célula são facilitadas (Nangia; Sureshkumar, 2012).

Conforme demonstrado nas Figuras 17B e 17D, as NP apresentaram tamanho aproximado de 50 nm, no entanto, as cadeias de PEG não são visíveis devido a diferença de densidade eletrônica. Desta forma, é esperado um tamanho relativamente menor que aquelas observadas pela técnica de DLS. Resultados similares foram observados por Souza (2016), Mello Jr e colegas (2017) e Gao e colaboradores (2015) que enfrentaram as mesmas limitações.

Figura 17 - Imagens representativas das formulações (A e B) NP-siRNA e (C e D) NP branca obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.



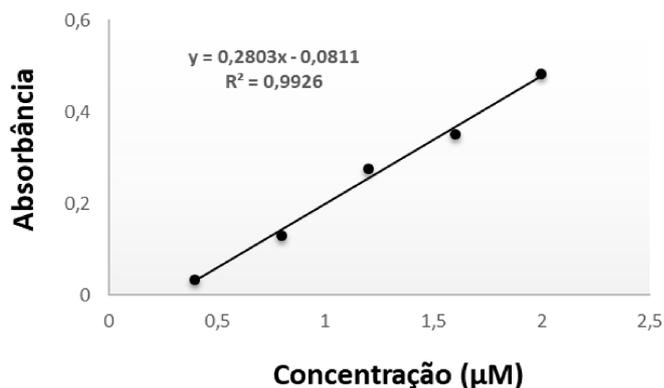
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

5.1.3 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) é uma característica importante para a caracterização de nanoformulações, pois permite conhecer a real quantidade encapsulada da substância estudada. A EE foi analisada através de espectrofotometria pelo método indireto conforme descrito por Pittella *et al.* (2011) com modificações. Para isso, uma curva de calibração foi desenvolvida e analisada em espectrofotômetro no comprimento de onda 260 nm. A curva de calibração

resultou na equação $y = 0,2803x - 0,0811$ e coeficiente de correlação (R^2) de 0,9926 (Figura 18).

Figura 18 - Curva de calibração para quantificação da eficiência de encapsulação de siRNA *HOXB7* nas NP.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

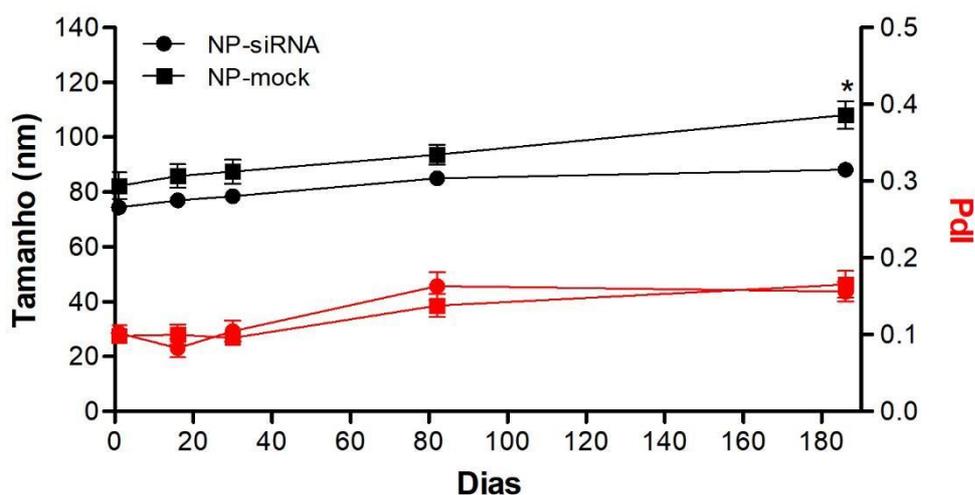
Dessa forma, levando em consideração a curva de calibração, foi possível determinar a quantidade de siRNA presente no filtrado, resultando em uma eficiência de encapsulação de $52,5 \pm 2,9\%$ de siRNA pelas nanopartículas híbridas com concentração de polímero de $1000 \mu\text{g/mL}$. Como já mencionado, concentrações menores de polímero permitem uma EE maior, em detrimento de uma menor estabilidade coloidal. Por isso, com o objetivo de utilizar essa NP em modelo *in vivo*, a concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ foi escolhida. Ademais, como demonstrado por Souza (2016) uma EE de pelo menos 50% já é suficiente para promover um silenciamento expressivo em animais (Souza, 2016).

5.1.4 Pré-ensaio de estabilidade coloidal

O pré-ensaio de estabilidade coloidal foi realizado a partir da produção das nanopartículas com e sem siRNA que foram estocadas na temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Elas

foram submetidas a medições de diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl em intervalos de tempo determinados: um dia, 15 dias, 30 dias, 80 dias e 180 dias (Figura 19).

Figura 19 - Pré-ensaio de estabilidade coloidal de nanopartículas híbridas encapsulando (NP-siRNA) ou não (NP-mock) siRNA por 180 dias em relação ao tamanho (preto) e Pdl (vermelho).



Fonte: Elaborado pela autora (2024).
ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

No intervalo de 180 dias (Tabela 9), não foi observado diferenças significativas ($p > 0,05$) nos valores de tamanho e Pdl das NP-siRNA e NP-mock, exceto na última medição, aonde a NP-mock apresentou alteração em relação apenas ao diâmetro hidrodinâmico ($p < 0,05$). Essa pequena diferença pode ser devido à ausência de cargas negativas do siRNA na NP-mock que deve permitir maior estabilidade ao sistema. Em contrapartida, as amostras de NP-siRNA permaneceram estáveis durante todo o período, o que sugere potencial para armazenamento a 4 °C por longos períodos. No entanto, outros parâmetros necessitam ser avaliados para um ensaio de estabilidade completo, como o potencial Zeta, a eficiência de encapsulação e concentração das nanopartículas.

Tabela 9 - Diâmetro hidrodinâmico e Pdl de NP-siRNA e *NP-mock* no início e fim do estudo de estabilidade coloidal.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Pdl	
	<u>Dia 1</u>	<u>Dia 180</u>	<u>Dia 1</u>	<u>Dia 180</u>
NP-siRNA	74,4 ± 1,8	88,16 ± 1,9	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,01
<i>NP-mock</i>	82,2 ± 4,8	108 ± 1,9 *	0,1 ± 0	0,16 ± 0,01

Fonte: Elaborado pela autora (2024).
ANOVA seguido de Bonferroni (*p<0,05).

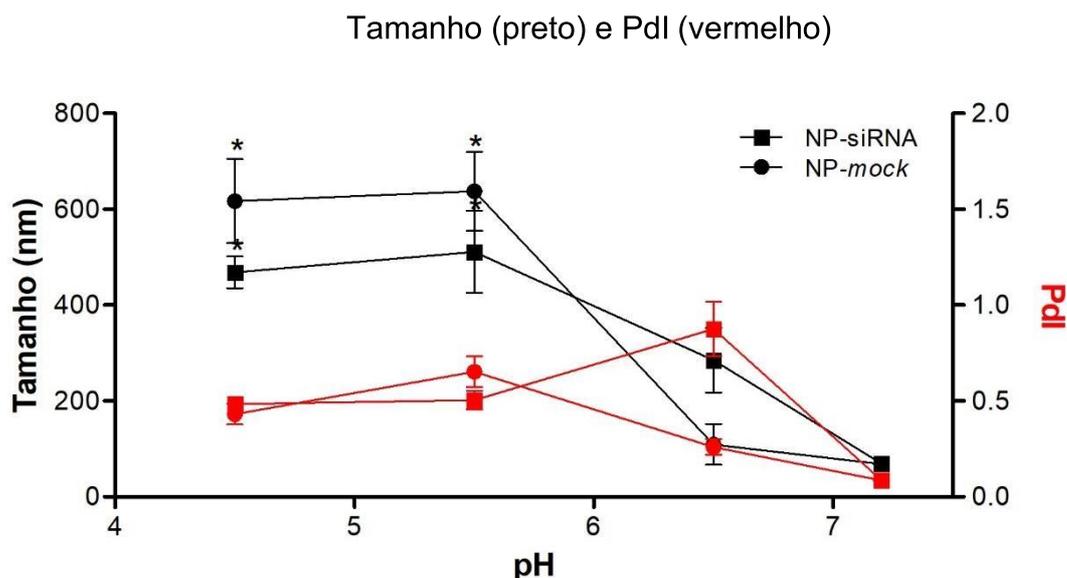
A estabilidade de suspensões contendo nanopartículas envolve aspectos físico-químicos e abrange fatores como alteração de tamanho, do Pdl, do potencial Zeta e degradação dos constituintes das nanopartículas. A estabilidade coloidal pode ser obtida a partir de basicamente duas estratégias: repulsão eletrostática ou pelo efeito estérico. A repulsão eletrostática é obtida a partir da utilização de moléculas eletricamente carregadas negativa- ou positivamente. Quanto maior essa carga, maior o potencial Zeta na superfície, e por consequência, maior a estabilidade das partículas em dispersão. Partículas com cargas superiores a 30mV em módulo promovem uma ótima estabilidade por repulsão eletrostática. Já o efeito estérico é obtido a partir da utilização de moléculas não iônicas, isto é, não carregadas eletricamente. Um exemplo dessas moléculas não iônicas é o polietileno glicol (PEG), polímero utilizado na formulação das NP aqui estudadas. Quanto maior a concentração destas moléculas, maior é a camada hidrofílica entre as partículas e, por consequência, maior a sua estabilidade (Moore *et al.*, 2015).

A estabilidade estérica promovida pelas moléculas de PEG é dependente da concentração delas. No entanto, a eficiência de encapsulação de moléculas de siRNA é inversamente proporcional a estabilidade promovida pelo polímero. Desta forma, a concentração de 1000 µg/mL de PEG foi definida visando a estabilidade da nanopartícula visto que ela foi utilizada para administração intravenosa. A avaliação da estabilidade coloidal por Souza (2016) ao utilizar a mesma concentração de polímero similar foi realizada por 28 dias e resultados positivos também foram observados.

A fim de avaliar e comprovar a desorganização das NP frente a condições

ácidas, foram realizadas medidas em condições de pH 4,5; 5,5; 6,5 e 7,2 (Figura 20). Este ensaio foi realizado com objetivo de mimetizar o ambiente endocítico, considerada a via de entrada das nanopartículas híbridas (Zhou *et al.*, 2018).

Figura 20 - Estabilidade (tamanho e Pdl) de NP encapsulando (NP-siRNA, quadrado) ou não (NP-mock, círculo) siRNA em diferentes condições de pH.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2024). ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

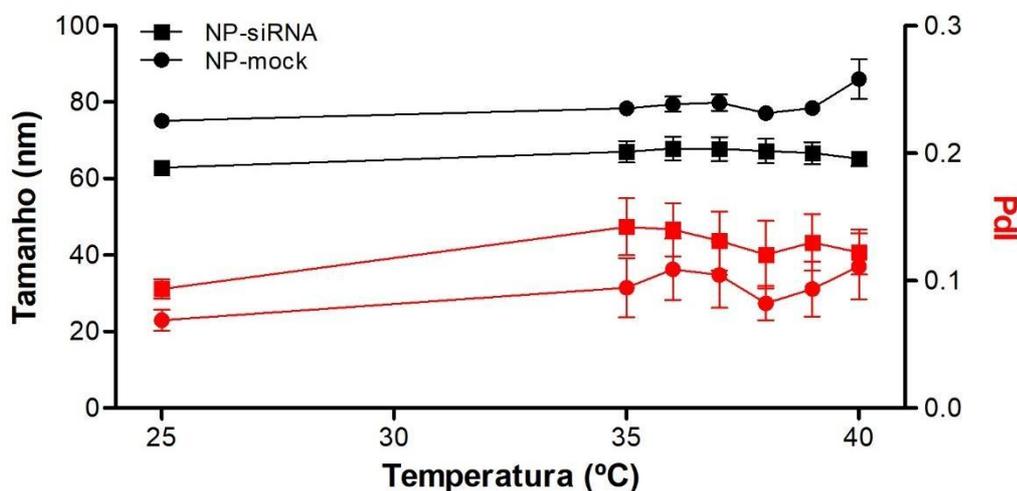
A dispersão de nanopartículas possui pH fisiológico (7,2) e apresentou tamanho e Pdl compatíveis aos já mostrados nas seções anteriores. A partir de um pH levemente ácido (pH 6,5) as NP começam a se tornar instáveis e seu tamanho aumenta significativamente ($p < 0,05$). Isto indica uma desorganização das mesmas e provável liberação de siRNA quando submetidas ao pH ácido dos compartimentos endocíticos. Resultados semelhantes foram observados por Zhou e colaboradores (2018) ao submeter NP com composição similar ao pH 5 e 6,5. Os autores observaram uma mudança expressiva no tamanho das NP de ~140 nm para 1.700 e 921 nm, respectivamente.

No entanto, alterações na formulação podem ser empregadas a fim de permitir maior estabilidade em ambientes levemente ácidos (pH 6,5), já que o próprio microambiente tumoral possui essa característica, o que poderia influenciar em uma liberação precoce do conteúdo encapsulado (Hosonuma; Yoshimura, 2023). Uma

alteração possível é a utilização de polímeros com maior grau de polimerização, a fim de manter uma maior estabilidade coloidal frente a esta condição.

Ainda, a estabilidade das NP foi avaliada frente a alteração imediata na alteração de temperatura (25 a 40 °C) (Figura 21). Nota-se que o tamanho e Pdl das NP permanece estável e sem diferenças significativas mesmo ao atingir 40 °C ($p > 0,05$). Este dado está relacionado a capacidade do nanossistema suportar temperaturas mais extremas que acometem regiões específicas do país ou do mundo.

Figura 21 - Estabilidade coloidal (tamanho e Pdl) de nanopartículas híbridas encapsulando (NP-siRNA, quadrado) ou não (NP-mock, círculo) siRNA em diferentes temperaturas. Tamanho (preto) e Pdl (vermelho).



Fonte: Elaborado pela autora (2024). ANOVA seguido de Bonferroni ($*p < 0,05$).

Outro pré-estudo foi realizado a fim de analisar a estabilidade dessa nanoformulação quanto a alteração física de secagem a partir do processo de liofilização. Esse procedimento também é conhecido como *freeze-drying* e tem como objetivo a retirada de água da amostra a partir da sublimação em baixa pressão. Essa estratégia já se mostrou eficaz no aumento da estabilidade das nanopartículas a longo prazo, e por isso, a avaliação desse processo é importante na caracterização de NP. No entanto, a liofilização pode gerar agregação das nanopartículas, o que causa um distúrbio irreparável na estabilidade do sistema e perda das propriedades originais. Assim, o uso de crio e/ou lioprotetores como os açúcares dextrose, trealose e

sacarose podem diminuir os efeitos indesejados desse processo (Gatto; Najahimissaoui, 2023). Dessa forma, *NP-mock* com e sem sacarose (5 e 10%) foram submetidas ao processo de liofilização após congelamento com nitrogênio líquido, ressuspensas em água Milli-Q estéril e caracterizadas de acordo com tamanho e Pdl (Tabela 10).

Tabela 10 - Diâmetro hidrodinâmico e Pdl de *NP-mock* antes e após o processo de liofilização utilizando ou não o lioprotetor sacarose.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Pdl	
	<u>Antes</u>	<u>Ressuspensão</u>	<u>Antes</u>	<u>Ressuspensão</u>
Sem sacarose	68,51 ± 0,24	74,33 ± 1,2	0,03 ± 0,00	0,15 ± 0,04
Sacarose 5%	73,08 ± 0,31	77,52 ± 0,31 *	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,01
Sacarose 10%	81,21 ± 0,11	79,4 ± 0,4	0,18 ± 0,00	0,19 ± 0,01

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Dado sem replicata biológica.

Conforme observado na Tabela 9, as NP liofilizadas sem e com a presença de lioprotetor se mantiveram estável e não foi encontrado diferença significativa relacionado ao tamanho e Pdl ($p > 0,05$), exceto na amostra contendo sacarose 5%. Em seguida, as demais formulações foram reavaliadas após 10 dias e já foi possível observar alteração significativa na amostra contendo crioproteção (Tabela 11).

Tabela 11 - Diâmetro hidrodinâmico e Pdl de *NP-mock* após o processo de liofilização utilizando ou não o lioprotetor sacarose e após 10 dias de ressuspensão.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Pdl	
	<u>Ressuspensão</u>	<u>Após 10 dias</u>	<u>Ressuspensão</u>	<u>Após 10 dias</u>
Sem sacarose	74,3 ± 1,2	80,09 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,17 ± 0,02
Sacarose 10%	79,4 ± 0,4	151,6 ± 6,9 *	0,2 ± 0,01	0,66 ± 0,07 *

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Dado sem replicata biológica.

Assim, observa-se que o processo de liofilização não alterou o tamanho e Pdl das NP sem crioprotetor ($p>0,05$) e que, o uso de sacarose não foi eficaz na manutenção das propriedades originais das nanopartículas ($p<0,05$). Esses resultados indicam então que não é necessária a adição de crioprotetores adicionais neste processo, uma vez que a camada externa de PEG foi capaz de proteger a nanopartícula dos estresses do processo de liofilização.

Outros crioprotetores como a trealose e a dextrose também foram testados nas concentrações de 5% e 10% e após ressuspensão já foi observado diferenças significativas ($p<0,05$), principalmente relacionado ao Pdl (dados não mostrados). No entanto, estudos complementares são necessários para a avaliação de outras características físico-químicas, como potencial Zeta e eficiência de encapsulação. Um outro cuidado necessário é o total isolamento do produto em relação ao ambiente após a liofilização, uma vez que o PEG é altamente higroscópico.

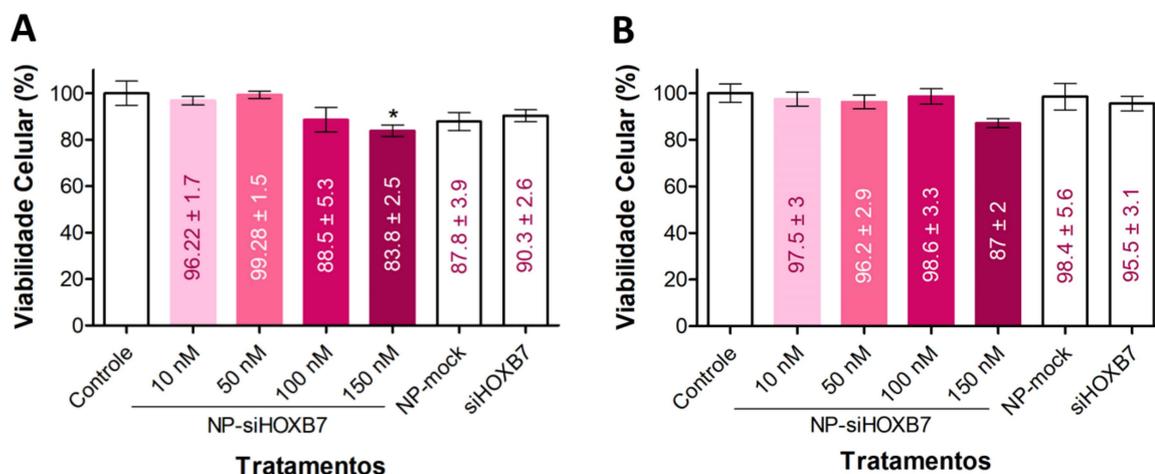
5.2 ENSAIOS *IN VITRO*

5.2.1 Viabilidade Celular

Após a caracterização físico-química das nanopartículas, a viabilidade celular foi analisada a partir do ensaio de MTT com diferentes tratamentos de NP e siRNA livre para confirmação de funcionamento do siRNA em células MCF7, do subtipo Luminal A receptor de hormônio positivo.

Conforme mostrado na Figura 22 é possível observar uma leve redução na viabilidade celular já em 24 h na concentração de 150 nM ($p<0,05$), o que sugere a internalização do siRNA e conseqüente ação do efeito de interferência por RNA. Esse resultado faz sentido, já que o gene *HOXB7* está relacionado a diversas vias metabólicas, incluindo proliferação e morte celular (Caré *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2007). No entanto, resultados mais expressivos foram observados em trabalho anterior (Valle, 2019), no qual os efeitos citotóxicos reduziram cerca de 30% da viabilidade em 48 h na mesma concentração.

Figura 22 - Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em (A) 24h e (B) 48h em células de câncer de mama MCF7.



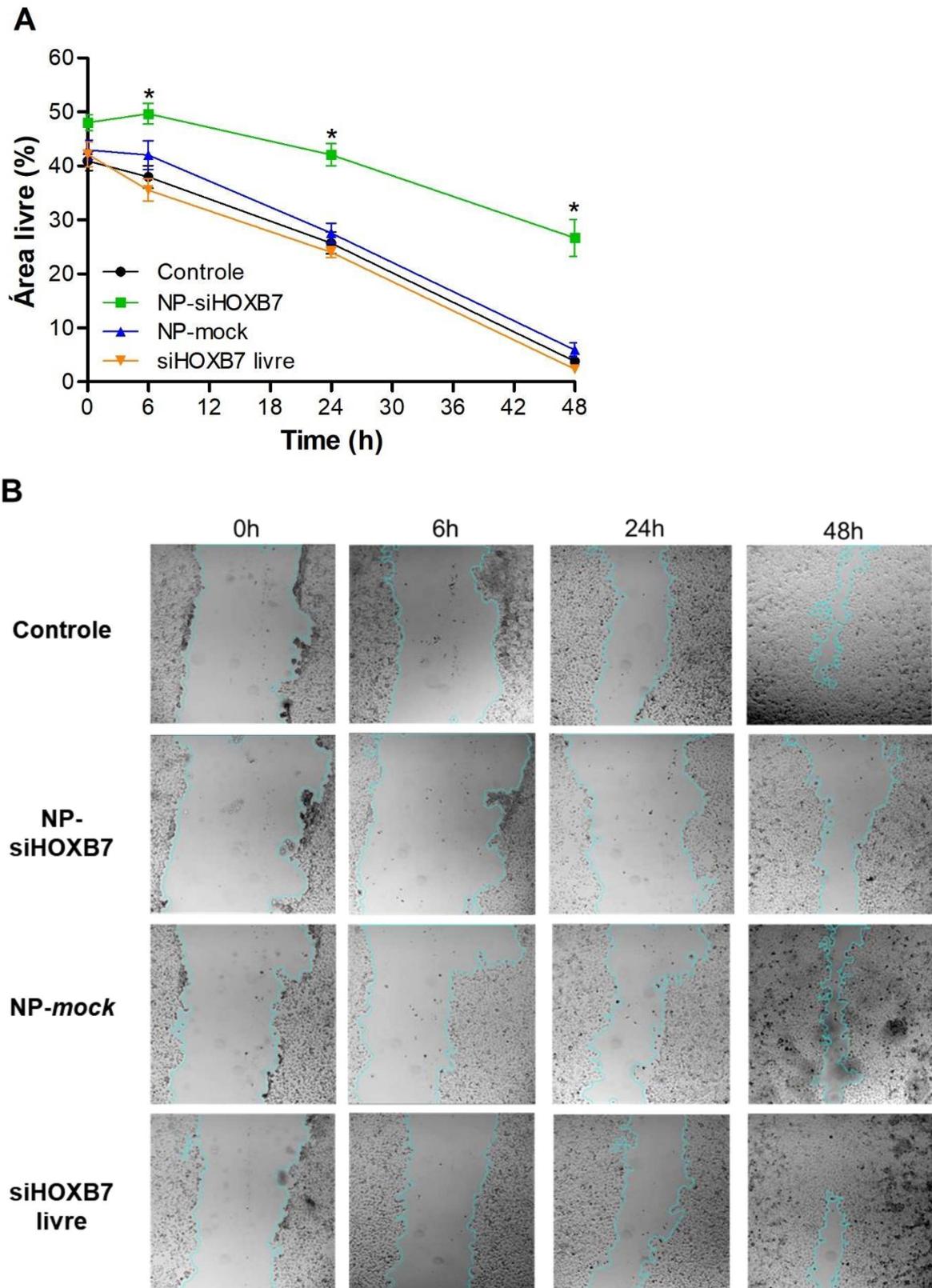
Fonte: Elaborado pela autora (2024).
ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

Importante destacar que os controles *NP-mock* e *siHOXB7* livre não promoveram diminuição da viabilidade celular, o que permite concluir que o sistema nanoestruturado *per se* é seguro e que o siRNA livre é incapaz de adentrar o ambiente celular. Inferência semelhante também foi observada por Gao e colaboradores (2015), Souza (2016), Mello Jr e colaboradores (2017) e Zhou e colegas (2018) ao utilizarem NP similares.

5.2.2 Ensaio de Cicatrização (*Wound Healing*)

A fim de observar os efeitos do silenciamento do gene *HOXB7* no potencial migratório das células MCF7, o ensaio de cicatrização foi realizado (Figura 23). Após 24 h já foi possível observar uma diferença significativa na área livre entre NP-siHOXB7 e os demais tratamentos ($p < 0,05$). No entanto, em 48 h a diferença foi expressiva ($p < 0,05$). O tratamento com NP-siHOXB7 resultou em uma área livre de aproximadamente 27%, enquanto os controles oscilaram entre 2 a 6%.

Figura 23 - Ensaio de cicatrização após tratamento com NP-siHOXB7, *NP-mock* e *siHOXB7* após 6h, 24h e 48h. (A) Gráfico da área livre e (B) Fotos representativas.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$, comparando ao respectivo controle; # $p < 0,05$, comparando todos 48h).

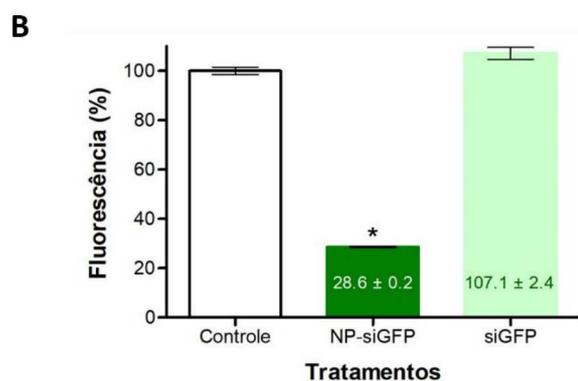
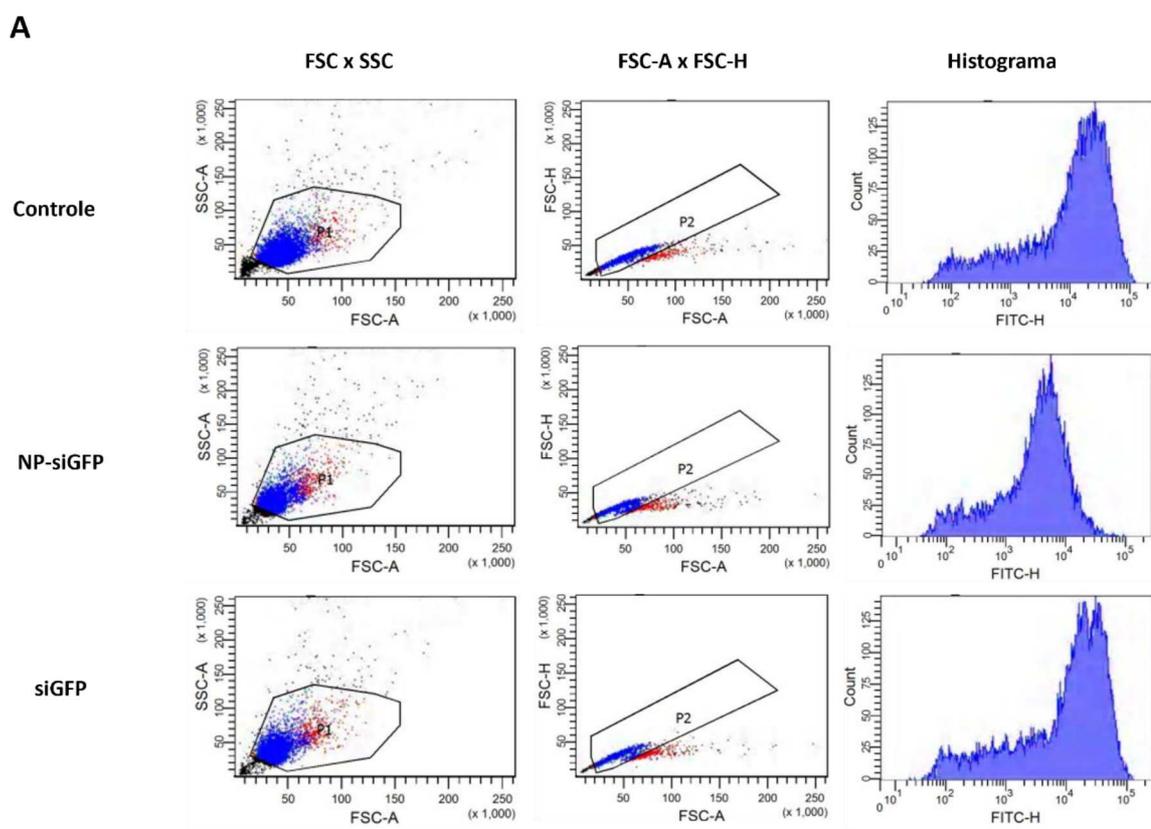
É sabido que o gene *HOXB7* atua em diversas vias metabólicas da progressão

do câncer Luminal A, inclusive relacionado a migração (WU *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2012). Assim, esses resultados suportam que o silenciamento do gene *HOXB7* promove uma desaceleração do caráter migratório das células MCF7, indicando que a nanoformulação possui potencial anti-metastático, diferentemente de quando o *siHOXB7* é administrado livremente. O mesmo foi observado por Paço e colaboradores ao silenciar esse gene em linhagem triplo negativa basal MDA-MB-648 (Paço *et al.*, 2021).

5.2.3 Eficiência do Efeito de RNAi: ensaio *GFP*

Também a fim de confirmar a eficiência de entrega da nanopartícula híbrida e avaliar a eficiência de liberação e ação das moléculas de siRNA, células de câncer de pulmão transformadas (A549-*GFP*) foram tratadas com NP-*siGFP* e *siGFP* livre correspondente ao gene *GFP* na concentração de 150 nM por 24 h (Figura 24).

Figura 24 - Expressão gênica do gene *GFP* em célula A549-*GFP* após tratamento com NP-siRNA e siRNA livre complementar ao gene *GFP*. (A) Dot-plot e histograma de citometria de fluxo e (B) Gráfico com análise estatística



Fonte: Elaborado pela autora (2024).
ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

Em concordância com os resultados obtidos na seção anterior, a redução expressiva da intensidade de fluorescência das células mostra que a NP é eficiente na entrega da molécula de siRNA. Nesse sentido, a redução da expressão do gene *GFP* foi de $71.42\% \pm 0.22$ quando tratado com as nanopartículas híbridas ($p < 0,05$). Em contrapartida, o tratamento com siRNA livre teve intensidade ($100\% \pm 2.43$) semelhante ao controle negativo, indicando que o siRNA livre, caso internalizado, sofre rápida degradação antes de ser liberado ao citoplasma para agir na interferência do RNAm.

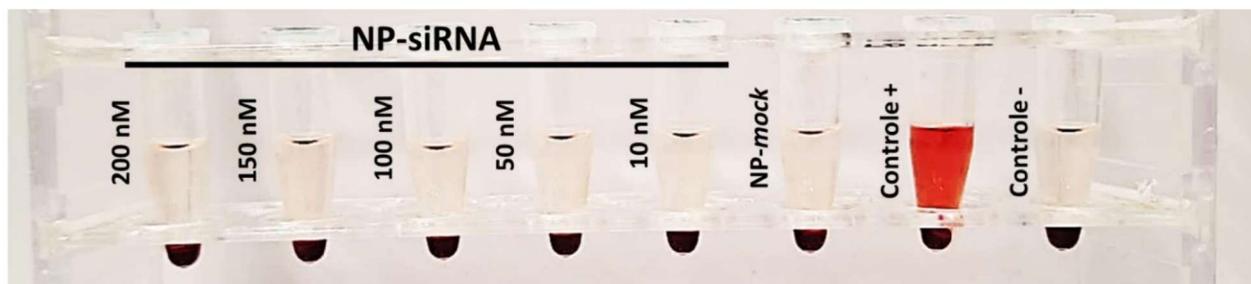
Resultados semelhantes foram observados por Maeda e colegas (2014) utilizando micelas híbridas de fosfato de cálcio e bloco de copolímero pH-sensível em células de câncer ovariano transformadas expressando o gene luciferase. Ainda, Zhou e colaboradores (2018) observaram silenciamento do gene *GFP* em células de câncer de mama transformadas de aproximadamente 93% utilizando NP semelhante. Ademais, os autores reportaram que esse silenciamento foi melhor que aquele utilizando agente de transfecção comercial (Lipofectamina), que apresentou redução da fluorescência das células de 80% (Zhou *et al.*, 2018). Essa mesma redução foi observada pelo atual estudo (dado não mostrado), o que permite inferir uma redução da expressão do gene *GFP* similar ao daquela observada pelas nanopartículas híbridas (Figura 24).

5.2.4 Hemólise

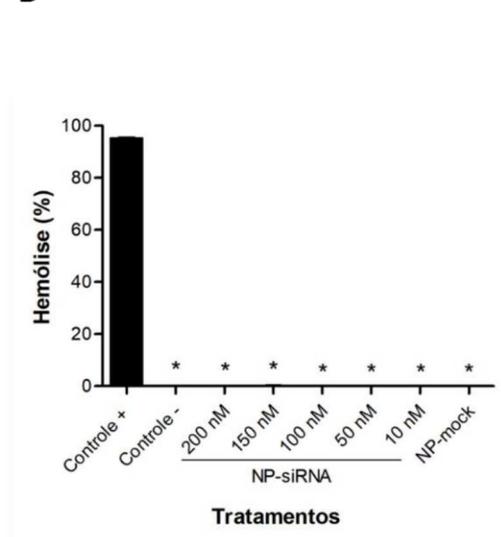
Anteriormente ao ensaio em modelo animal, o teste de hemólise foi realizado no intuito de confirmar que os constituintes das NP não causam a ruptura das membranas das hemácias. Assim, as formulações de NP contendo ou não siRNA em diferentes concentrações foram incubadas com eritrócitos para a avaliação deste fenômeno visualmente (Figura 25A), por espectrofotometria (Figura 25B) e por microscopia óptica (Figura 25C).

Figura 25 - Ensaio de hemólise após incubação com diferentes concentrações de NP-siRNA e *NP-mock*. (A) Imagem visual, (B) porcentagem de hemólise por UV/Vis e (C) imagem microscópica.

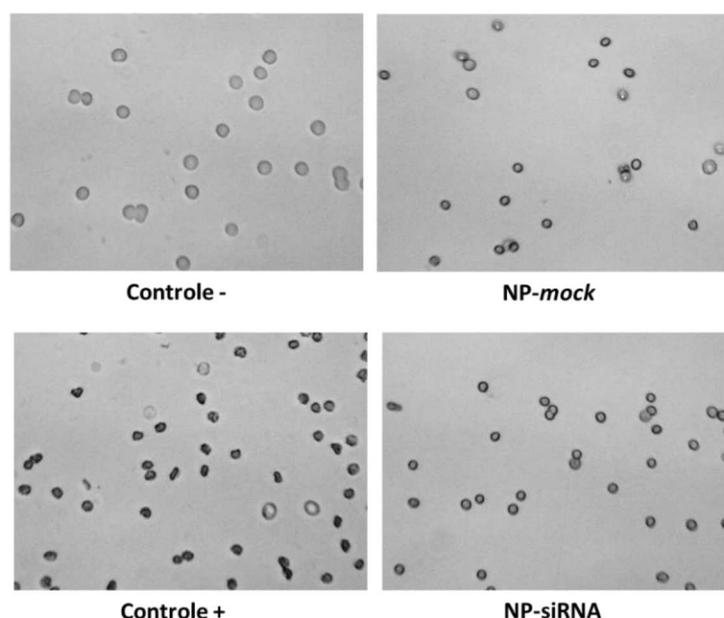
A



B



C



Fonte: Elaborado pela autora (2024).
ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

Conforme observado pela Figura 25B, a porcentagem de hemólise promovida pelas NP foi inexistente e significativamente diferente daquela observada no controle positivo ($p < 0,05$), o que indica que as NP não promovem hemólise das hemácias em nenhuma das concentrações testadas. Esse mesmo resultado foi observado por Mello Jr (2017) e Gao e colaboradores (2015) que utilizaram NP semelhantes.

Adicionalmente, imagens foram capturadas por microscopia óptica (Figura 25C) para observação da morfologia das células após os respectivos tratamentos. Uma diferença morfológica nítida entre o controle negativo e tratamentos em relação ao controle positivo foi observada. As células do controle positivo possuíam um formato menor, com membranas irregulares e aparência não-bicôncava. Os eritrócitos que apresentam esta deformação morfológica são chamados de equinócitos e são resultantes de mudanças na fluidez da membrana e na distribuição lipídica, levando a reorganização da mesma, o que resulta em extravasamento do conteúdo intracelular

e diminuição do tamanho das hemácias, como observado na Figura 25C (Manaargadoo-Catin; Ali-Cherif; Pognas; Perrin, 2015).

5.3 ENSAIO *IN VIVO*

5.3.1 Purificação das Nanopartículas Híbridas

Apesar de possuir um importante papel estrutural e enzimático em diversos processos celulares, o excesso do íon Ca^{2+} pode promover efeitos tóxicos às células, que vão de indução a apoptose até o desenvolvimento de doenças, como câncer e diabetes (Kass, Orrenius, 1999; Levingstone *et al.*, 2020). Por isso, a injeção de nanopartículas híbridas (NP) em animais requer a purificação delas. Este procedimento é realizado a fim de diminuir a concentração de íons de cálcio livres na dispersão, isto é, íons não associados às nanopartículas. A combinação entre ultra filtração e centrifugação foi utilizada para purificação e o diâmetro hidrodinâmico médio e Pdl foram medidos antes e após o procedimento, de acordo com Tabela 12.

Tabela 12 - Diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão (Pdl) das nanopartículas híbridas após purificação.

	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Pdl	
	Antes	Após	Antes	Após
NP-mock	84,75 ± 1,5	83,9 ± 3,2	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,02

Fonte: Elaborado pela autora (2024).
Teste t pareado (* $p < 0,05$).

Após a purificação, as NP mantiveram suas características físicas e os parâmetros analisados não resultaram em diferença significativa em comparação com as suspensões iniciais ($p > 0,05$). Além disso, um ensaio independente foi realizado e as nanoformulações foram avaliadas logo após a purificação e 6 e 17 dias depois (Tabela 13). Esses dados sugerem que as NP-siRNA purificadas permanecem

estáveis por até 6 dias, quando comparados com o tamanho inicial, no entanto, estudos complementares com maior número de replicatas são necessários para confirmação dessa inferência.

Tabela 13 - Estabilidade a curto prazo das nanopartículas híbridas após purificação.

Diâmetro hidrodinâmico (nm)				
	Antes	Após	Após 6 dias	Após 17 dias
NP-mock	79,83 ± 0,03	78,38 ± 0,2	82,57 ± 0,33 *	88,44 ± 0,46 *
NP-siRNA	70,78 ± 0,03	68,08 ± 0,44	71,4 ± 0,25	73,66 ± 0,27 *
Pdl				
	Antes	Após	Após 6 dias	Após 17 dias
NP-mock	0,08 ± 0	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0	0,07 ± 0
NP-siRNA	0,07 ± 0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0	0,06 ± 0

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$). Dado sem replicata biológica.

5.3.2 Atividade Antitumoral

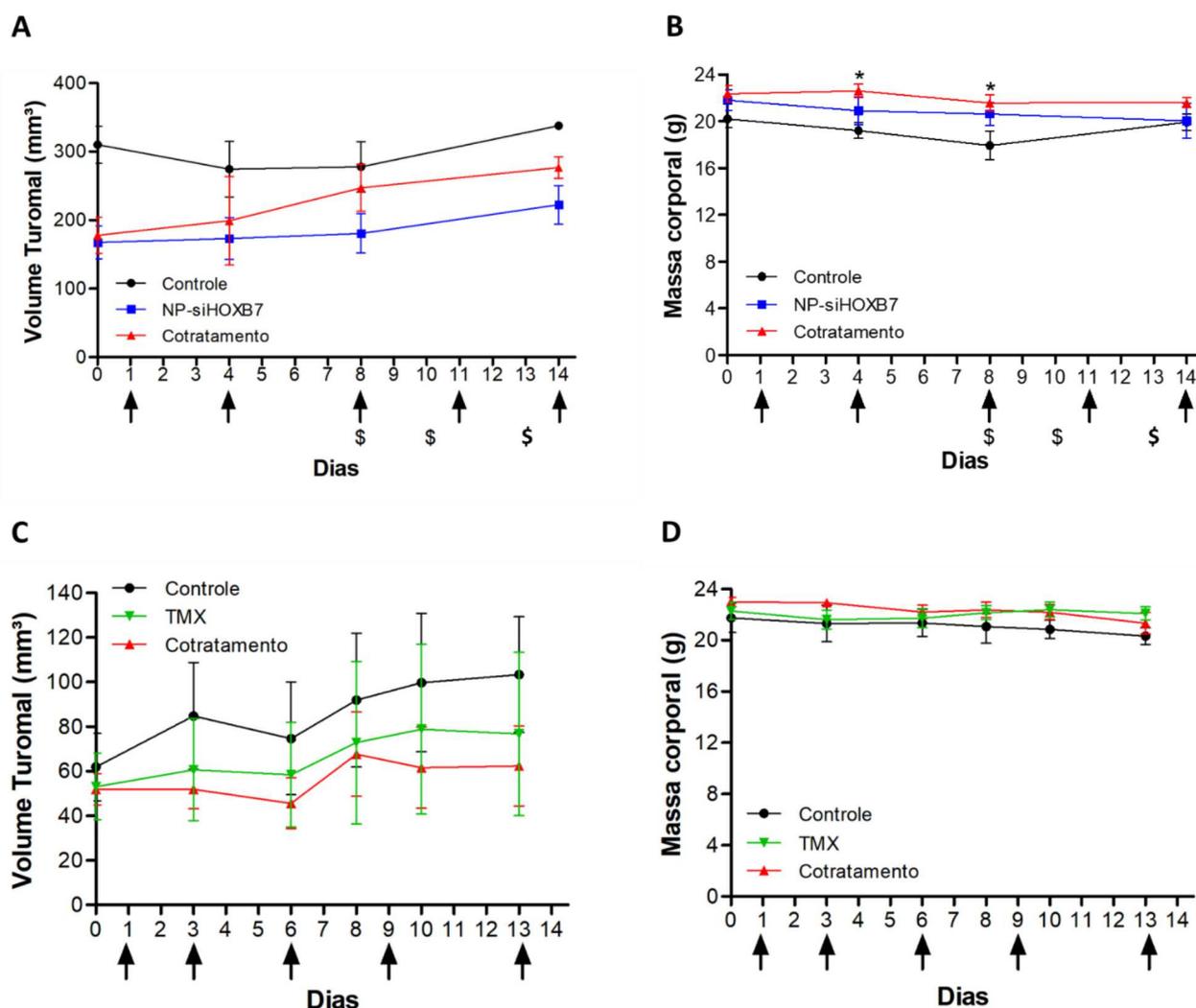
A seleção adequada do modelo animal é imprescindível para o sucesso de um ensaio *in vivo*. A fim de realizar experimentos em animais com linhagens celulares humanas, é necessária a escolha de animais imunossuprimidos, os quais permitirão o desenvolvimento tumoral. Assim, camundongos NUDE e NOD podem ser considerados para experimentos deste tipo, por exemplo. Além disso, a depender do subtipo molecular da linhagem celular de câncer de mama, outros parâmetros devem ser considerados. A linhagem celular MCF7 é do subtipo molecular luminal A, isto é, expressor de receptores de hormônio e, por isso, sua progressão possui relação direta com a presença de estradiol (Comsa *et al.*, 2015).

Por isso, camundongos NUDE fêmeas foram escolhidos para este estudo e um pré-tratamento com estradiol foi realizado por uma semana antes da inoculação de células MCF7 e continuado durante todo o tratamento até a eutanásia dos animais.

Após 30 dias da inoculação das células MCF7 deu-se início a avaliação da atividade antitumoral em 26 animais divididos em dois ensaios independentes. O Ensaio 1 (n=14) foi realizado em animais com tumores mais avançados (240 mm³) e o tratamento com NP-siHOXB7 e cotratamento foram comparados ao grupo controle. Já o Ensaio 2 (n=12) foi realizado em animais com tumores iniciais (56,8 mm³) e foram administrados os tratamentos com TMX livre e o cotratamento com NP-siHOXB7. Esta divisão foi realizada a fim de observar a existência de diferenças no tratamento de tumores em diferentes estágios.

Após 14 dias de tratamento, não foram observadas diferenças significativas relacionadas ao volume tumoral nos grupos estudados (Figura 26A e 26C) em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) em ambos os ensaios. No entanto, é notável que os tratamentos promoveram maior controle do crescimento tumoral, devido à diferença no volume do tumor nos dias 13 e 14.

Figura 26 - Avaliação da atividade antitumoral em camundongos NUDE tratados com NP-siHOXB7, cotratamento e TMX livre. Variação do volume tumoral no (A) Ensaio 1 e (C) Ensaio 2. Variação da massa corporal no (B) Ensaio 1 e (D) Ensaio 2. As setas representam os dias de tratamento. O símbolo \$ representa morte.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).
Two-way ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

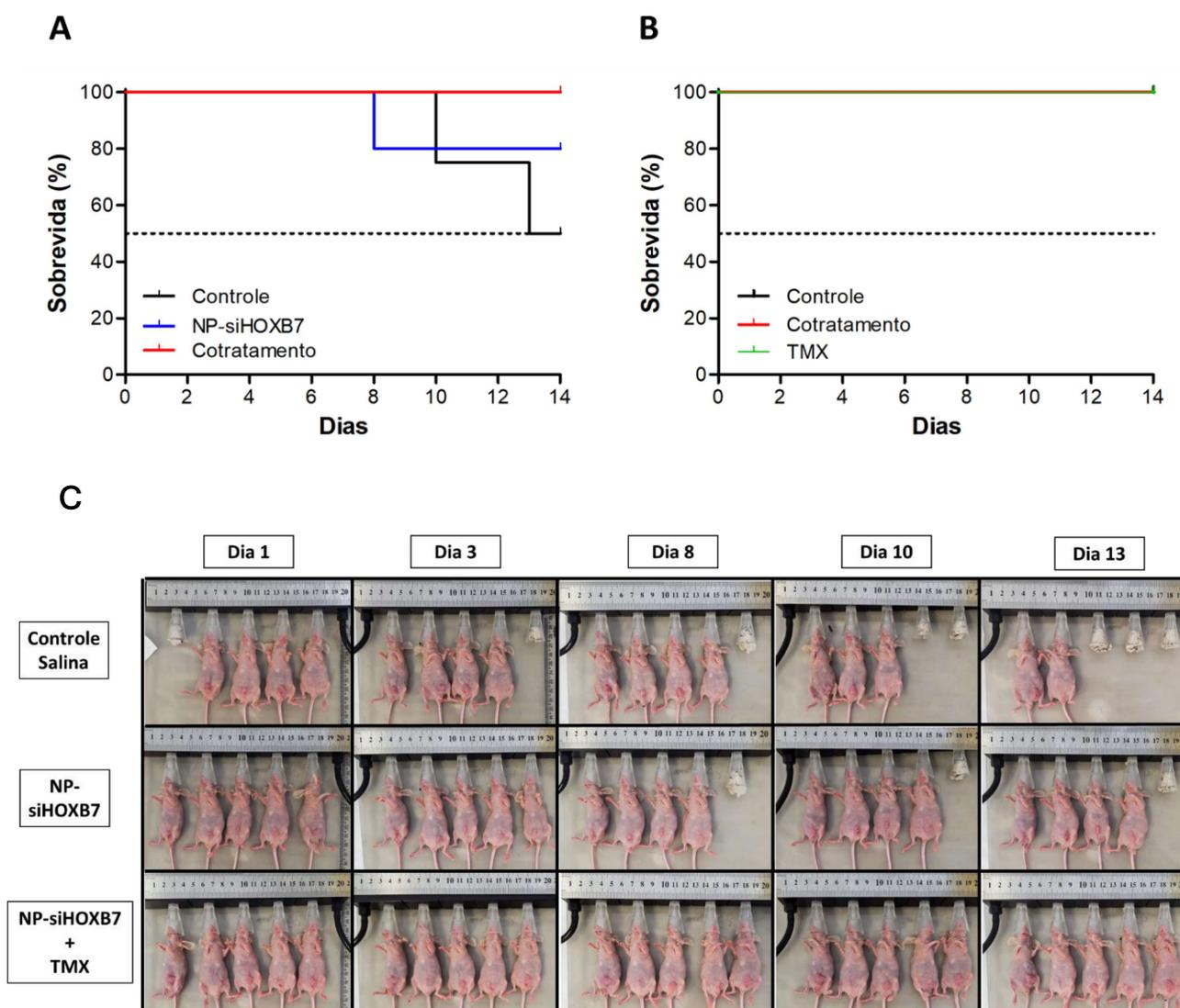
Ainda, nenhum dos grupos tratados mostraram perda de massa corporal ao final dos 14 dias de tratamento (Figuras 28B e 28D, $p > 0,05$). As leves oscilações de peso observadas nos grupos muito provavelmente se devem a rápida evolução da doença que levou ao óbito dois indivíduos no grupo controle e um do grupo NP-siHOXB7 no ensaio com tumores em estágio mais avançado (Ensaio 1, Figura 27A), indicando que os tratamentos aplicados permitiram maior sobrevivência que o grupo controle.

Assim, estes óbitos resultaram em uma taxa de sobrevivência de 50%, 80% e 100% nos grupos controle, NP-siHOXB7 e cotratamento, respectivamente ($p > 0,05$, Figura 27A). Embora o gráfico de atividade antitumoral (Figura 26A) sugira diferenças entre os grupos controle e tratados (14º dia), a perda de indivíduos influenciou na

avaliação da atividade antitumoral após 14 dias de tratamento (Ensaio 1), pela retirada da estatística dos valores do volume tumoral dos indivíduos que vieram a óbito.

Por isso, a incorporação de maior número amostral seria importante para reduzir as perdas individuais (Ensaio 1), assim como diminuir o erro padrão da média (Ensaio 2). Ainda, a avaliação de pontos metastáticos deve ser investigada como uma possível causa dos óbitos, já que o silenciamento do gene *HOXB7* reduz o potencial migratório das células MCF7 (Figura 23). Mesmo assim, de acordo com estes resultados é possível inferir que os tratamentos permitiram maior sobrevida e manutenção do volume tumoral mesmo em estágios mais avançados.

Figura 27 – Taxa de sobrevivência do ensaio antitumoral. (A) Ensaio 1, (B) Ensaio 2 e (C) Imagem dos animais no Ensaio 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Curva de Kaplan-Meier e análise Log-rank (* $p < 0,05$).

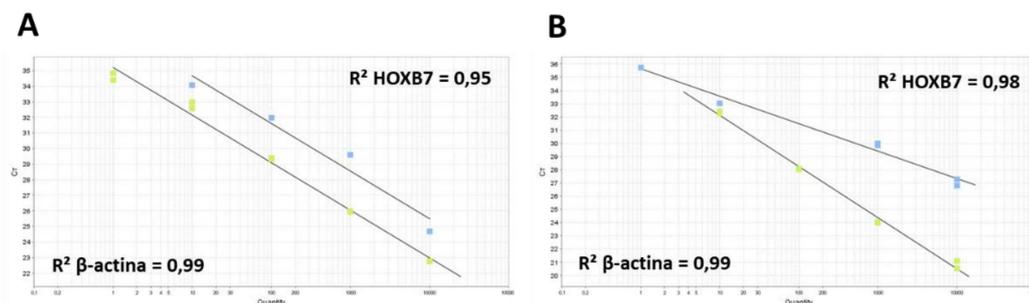
Em relação ao experimento com tumores em estágios iniciais (Figura 26C), foi possível observar que o cotratamento foi mais eficaz que o TMX livre na manutenção do volume tumoral. Isto indica um possível efeito sinérgico ou sensibilização de células tumorais, conforme observado em ensaio *in vitro* em trabalho anterior. Este ensaio mostrou diferença de significativa na redução da viabilidade celular em linhagem MCF7 quando estas foram expostas ao cotratamento com NP-siHOXB7 e ao TMX livre. Assim, o cotratamento promoveu uma redução de 40% na viabilidade celular quando comparado às células tratadas apenas com TMX (VALLE, 2019).

Embora o silenciamento apenas do gene *HOXB7* possa não ser suficiente para resultar em uma redução do volume tumoral mais expressiva na concentração avaliada, a sua associação ao TMX parece ter potencializado o controle tumoral. Além disso, a concentração aplicada de siRNA e/ou o número de doses também pode ter sido insuficiente para a observação de um efeito mais potente, e por isso, outras concentrações podem ser investigadas a fim de obter um efeito terapêutico ótimo.

5.3.3 Avaliação da Expressão Gênica

Em seguida, foi realizada a avaliação da expressão gênica para confirmação do silenciamento do gene *HOXB7* resultante da entrega de siRNA pela via intravenosa, utilizando as nanopartículas híbridas. A verificação da expressão do gene *HOXB7* foi avaliada apenas no ensaio com tumores avançados (Ensaio 1) e 24 h após a última injeção de tratamento no 13° dia. A extração do RNA do tecido tumoral foi realizada seguida da síntese do cDNA e a quantificação foi avaliada a partir da técnica de qPCR. A curva de eficiência dos primers pode ser verificada na Figura 28.

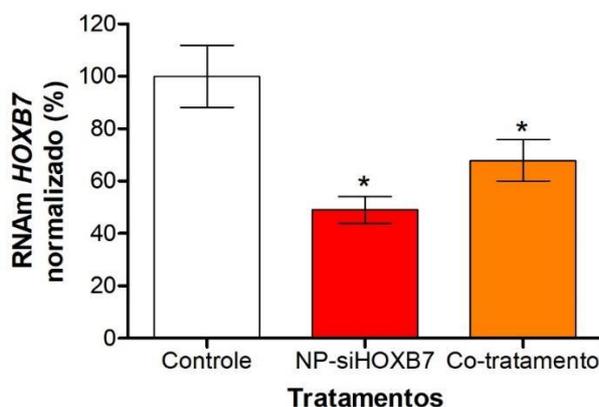
Figura 28 - Curva de eficiência dos primers para os genes da β -Actina humana (verde) e do *HOXB7* (azul). (A) qPCR 1 (B) qPCR 2.



Fonte: Software 7500.

A análise da expressão gênica mostrou que, em comparação ao controle, a formulação NP-*HOXB7* reduziu a expressão do gene *HOXB7* em $50 \pm 5,1\%$ (Figura 29, $p > 0,05$). Em concordância, o grupo que recebeu o cotratamento teve a expressão desse gene reduzida em aproximadamente $32,2 \pm 7,9\%$ ($p < 0,05$). Estes resultados estão alinhados com aqueles vistos no gráfico de volume tumoral do Ensaio 1 (Figura 27A) onde foi possível observar que o grupo NP-si*HOXB7* possuiu maior redução do volume tumoral que o grupo com cotratamento. Com isso, infere-se que as NP são eficientes e capazes de entregar material genético ao citoplasma celular das células tumorais também em modelo animal. Outros autores encontraram silenciamento dos seus respectivos genes de aproximadamente 40% utilizando NP semelhantes (Mello Jr *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021).

Figura 29 - Expressão do gene *HOXB7* em carcinoma mamário humano em modelo animal murino NUDE.



Fonte: Elaborador pela autora.
ANOVA seguido de Bonferroni (* $p < 0,05$).

Apesar do silenciamento do gene *HOXB7* estar conectado a redução da proliferação e da migração *in vitro*, como evidenciado pelos ensaios de viabilidade celular (Figura 22) e de cicatrização (Figura 23), a ausência de redução do volume tumoral significativa indica que o *knockdown* apenas deste gene sozinho não foi suficiente para promover uma atividade antitumoral *in vivo* mais expressiva. Por isso, o aumento na concentração de siRNA entregue pelas NP deve ser considerado em estudo futuro, no intuito de potencializar o efeito de RNAi. No entanto, é notável que existiu um efeito terapêutico proporcionado pelos tratamentos tanto na manutenção do volume tumoral e na maior taxa de sobrevida,

É importante destacar que o efeito do mecanismo de RNAi é incompleto e transitório, isto é, não reduz totalmente os níveis de proteínas disponíveis e dura de algumas horas a alguns dias. Por isso, é importante que o gene escolhido exerça a maior função da via metabólica que se pretende atingir para um maior efeito terapêutico (Pittella *et al.*, 2011; Mello Jr *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2021).

5.3.4 Avaliação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Ao final do experimento *in vivo*, o sangue foi retirado para análise do perfil hematológico e bioquímico dos grupos com tumores em estágio inicial (Ensaio 2), que se encontram na Tabela 14. Essa análise foi realizada 24 h após a última administração dos tratamentos indicados.

Diferenças significativas no perfil hematológico foram observadas na redução de proteínas totais e células nucleadas no grupo TMX ($p < 0,05$). A hipoproteïnemia está relacionada a alterações renais e hepáticas e indica toxicidade devido a quimioterápicos (Tesarova, 2013; Abbasi *et al.*, 2022). No entanto, a alteração observada, muito provavelmente não indica importância clínica significativa e já é prevista após administração do TMX.

Outro efeito adverso resultante do tratamento com quimioterápicos é a diminuição do número de leucócitos. No grupo TMX metade das amostras foram impossibilitadas de serem analisadas devido a intensa leucopenia observada, ao contrário dos demais grupos. Este resultado está em conformidade com os achados

de Aynalem e colaboradores (2022) que estudaram o perfil hematológico antes, durante e após o início do tratamento quimioterápico em pacientes com câncer de mama e observaram redução no número de leucócitos durante o tratamento (Aynalem *et al.*, 2022). Inferências semelhantes foram observadas por Wondimneh e colaboradores (2021) em pacientes com diversos tipos de câncer. A redução do número de células brancas é um efeito colateral bem conhecido durante a administração de quimioterápicos e poder estar associado a supressão das células-tronco hematopoiéticas (Wondimneh *et al.*, 2021).

Assim, os baixos níveis de células brancas no sangue muito provavelmente se devem ao tratamento com TMX que atinge não só células saudáveis de tecidos, mas também células do sistema imune (Aynalem *et al.*, 2022). No entanto, observa-se que o grupo com cotratamento teve este efeito minimizado, promovendo menor toxicidade e prolongando a vida útil das células imunes dos animais. Assim, é possível inferir que o silenciamento do gene *HOXB7* permitiu, a partir de algum mecanismo molecular não identificado no presente estudo, o melhor aproveitamento deste fármaco nas células cancerígenas e menor imunotoxicidade.

Tabela 14 - Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos de cotratamento e TMX

	Referência	Controle	NP ^{-si} <i>HOXB7</i> + TMX	TMX
<u>Perfil Hematológico</u>				
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	8,7 - 12,5	7,9 ± 0,2	7,82 ± 0,2	7,5 ± 0,1
Hemoglobina (g/dL)	10,2 - 16,2	12,05 ± 0,2	12,23 ± 0,4	11,53 ± 0,1
Hematocrito (%)	42 - 44	46 ± 1	46,25 ± 0,9	43 ± 0,4
VCM (fL)	56 - 60	57,75 ± 0,3	59,13 ± 0,4	57,26 ± 1,1
HCM (pg)	17,4 - 15,5	15,13 ± 0,1	15,61 ± 0,1	15,34 ± 0,2
CHCM (g/dL)	24,7 - 27,1	26,2 ± 0,2	26,41 ± 0,3	26,81 ± 0,4
Eritroblasto		0	0	0
Proteínas totais		6,1 ± 0,1	5,65 ± 0,1 *	5,3 ± 0,1*
Células nucleadas (mm ³)	5000 - 12000	3100 ± 601,4	2300 ± 288,7	1175 ± 265,8 *

Leucócitos totais (mm³)	5000 - 12000	3100 ± 601,4	2300 ± 288,7	1175 ± 265,8 *
Leucócitos diferenciais				
Metamielocito (mm³)	0	0	0	0
Bastonete (mm³)	0 - 170	0	0	0
Segmentado (mm³)	35 - 4800	2582 ± 101,4	1343 ± 182,3 *	1184 ± 274 *
Eosinofilo (mm³)	0 - 480	16 ± 10,8	8,5 ± 5,5	9 ± 9
Linfocito (mm³)	275 - 11400	284,3 ± 178,2,6	224,3 ± 101,8	246 ± 5
Monocito (mm³)	0 - 480	284,5 ± 93,5	144 ± 38,2	161 ± 3
Basofilo (mm³)	0 - 180	0	0	0
Plaquetas (mil/mm³)	100 - 1000	472,3 ± 23,2	558,3 ± 57,2	612,5 ± 51,1
<u>Perfil Bioquímico</u>				
Ureia (mg/dL)	18 - 31	47,51 ± 7,6	41,3 ± 3,5	46,78 ± 2,9
Creatinina (mg/dL)	0,48 - 1,1	0,4 ± 0,02	0,57 ± 0,04 *	0,42 ± 0,03
ALT (U/L)	44 - 87	60,4 ± 2,8	55,65 ± 8,6	40,35 ± 0,6
AST (U/L)	55 - 251	218 ± 28,6	175,5 ± 13,3	170,5 ± 4,2

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

ANOVA seguido de Bonferroni (*p<0,05).

VCM: Volume Corpuscular Médio. CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Médica.

A contagem de hemácias abaixo dos níveis de referência já no grupo controle indica uma leve anemia em todos os grupos do estudo, que não foi causada por hemólise, como indicado na Figura 26. Ademais, o número de plaquetas aumentado no grupo TMX (#p<0,05) pode ser um preditor de metástase, como discutido por Sylman e colaboradores (SYLMAN et al., 2017) e está conectado a um prognóstico ruim. Em conjunto com as taxas de sobrevida, este parâmetro reafirma a necessidade do estudo de pontos metastáticos como possível causador de óbitos.

De fato, a única diferença relevante e que foi significativa em relação ao grupo com o cotratamento foi o aumento da creatinina (p<0,05). A concentração sanguínea de creatinina é um importante indicador de função renal e este aumento provavelmente

está relacionado à rota de excreção da molécula de siRNA (Khaled *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2011). No entanto, esse aumento se encontra nos limites dos valores de referência e não traduz alteração clínica relevante.

Mais importante que os níveis de creatinina, os valores das enzimas ALT e AST, importantes marcadores de atividade hepática, se mantiveram estáveis, dentro dos valores de referência e até abaixo dos níveis observados no grupo controle (Tabela 14). Este resultado indica a ausência de toxicidade hepatocelular e é altamente desejável em estudos que utilizam nanopartículas como sistemas de entrega. De fato, a hepatotoxicidade é um dos principais desafios encontrados nos testes clínicos e um dos principais motivos que impedem a progressão para fases posteriores (Thapa; Kim, 2022).

Diante do exposto, é possível inferir que o tratamento com TMX foi levemente tóxico e que o cotratamento teve resultados mais positivos quanto a toxicidade em modelo animal. Isso nos leva a crer que o silenciamento do gene *HOXB7* permite aumento dos efeitos de TMX e reduz a toxicidade dele ao organismo, além de controlar o crescimento do volume tumoral.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar da grande contribuição dos tratamentos convencionais na terapia antitumoral, o câncer ainda é uma das principais causas de óbito no mundo e sua incidência e mortalidade aumentam a cada ano. Por isso, este estudo visou avaliar a combinação de estratégias terapêuticas em câncer de mama receptor de hormônio positivo, subtipo molecular com maior incidência, a fim de elucidar os seus efeitos e contribuir com a medicina antitumoral. Para isso, nanopartículas híbridas foram utilizadas para a entrega de moléculas de siRNA na terapia de RNA interferente e os efeitos do silenciamento do gene HOXB7 e o cotratamento com TMX foram avaliados em modelo animal.

Desta forma, o nanocarreador foi considerado eficiente na entrega da molécula de siRNA *in vitro* e *in vivo* e é um candidato promissor para futuras aplicações na entrega intravenosa de material genético em câncer. Ademais, nossos achados sugerem que a redução da expressão do gene HOXB7 associado à administração de TMX promove um maior controle do crescimento tumoral, assim como redução na imuno- e hepatotoxicidade. Neste sentido, acreditamos que o gene HOXB7 é um importante alvo molecular e a combinação de estratégias terapêuticas é uma estratégia que deve ser mais bem explorada a fim de mitigar efeitos adversos e aumentar a eficiência terapêutica, como observado neste trabalho.

No entanto, ensaios complementares devem ser realizados a fim de avaliar outros parâmetros relacionados a caracterização da nanoformulação e até a funcionalização das nanopartículas, visando uma maior especificidade tecidual. Ainda, ensaios *in vitro* complementares são de grande valia no entendimento dos efeitos do silenciamento do gene HOXB7 e da sua associação ao TMX. Ademais, a otimização das concentrações de siRNA e TMX nos ensaios *in vivo* e o aumento do número amostral de animais para uma real estimativa do efeito RNAi e sua relação quando utilizado em conjunto com o TMX deve ser considerada. Por fim, ensaios de acumulação tumoral e biodistribuição das nanopartículas em modelo animal se faz necessária.

REFERÊNCIAS

ABBASI, B.; HAYAT, A.; LYONS, M.; GUPTA, A.; GUPTA, S. Serum protein and electrolyte imbalances are associated with chemotherapy induced neutropenia. **Heliyon**. 8(7):e09949. 2022.

ACS. American Cancer Society. Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org>. 2024. Acesso em: 05 de fevereiro de 2024.

AFZAL, Z.; KRUMLAUF, R. Transcriptional Regulation and Implications for Controlling *HOX* Gene Expression. **J Dev Biol**. 10 (1): 4. 2022.

AIGNER, A. Perspectives, issues and solutions in RNAi therapy: the expected and the less expected. **Nanomedicine**. (21): 2777-2782. 2019.

AL-BAIRMANY, Y. Leucopenia induced by tamoxifen in a breast cancer patient: a case report. **Annals of Cancer Research and Therapy**. 30(1): 8-10. 2022.

ALLEN, T; CULLIS, P. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. 303: 1818-1822. 2004.

ALMEIDA, R; ALLSHIRE, R. RNA silencing and genome regulation. **Trends inCell Biology**. 15 (5): 251-258. 2005.

Alnylam Pharmaceuticals. Disponível em: <https://www.alnylam.com> . 2023. Acesso em: 05 de fevereiro de 2023.

AMARZGUIOUI, M.; PRYDZ, H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. **Biochem Biophys Res Commun**. 316 (4): 1050-8. 2004.

ANGART, P. VOCELLE, D.; CHAN, C.; WALTON, S.P. Design of siRNA Therapeutics from the Molecular Scale. **Pharmaceuticals**. 6(4):440-68. 2013.

AYNALEM, M.; ADEM, N.; WENDESSON, F.; MISGANAW, B.; MINTESNOT, S.; GODO, N.; GETAWA, S.; ADANE, T.; WOLDU, B.; SHIFERAW, E. Hematological abnormalities before and after initiation of cancer treatment among breast cancer patients attending at the University of Gondar comprehensive specialized hospital cancer treatment center. **PLoS One**. 17(8):e0271895. 2022.

AZUMA, K.; SAKAMOTO, M.; KATAYAMA, S.; MATSUI, A.; NAKAMICHI, K.; GOSHIMA, N.; WATANABE, S.; NAKAYAMA, J.; SEMBA, K. *HOXB7* induces STAT3-mediated transformation and lung metastasis in immortalized mammary gland NMuMG cells. **Genes Cells**. 2023.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J Mol Biol**. 13: 238-252. 1965.

BARROS A.; LEITE K. Classificação molecular dos carcinomas de mama: umavisão contemporânea. **Rev Bras Mastologia**. 25 (4): 146-155. 2015.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, 235, 337–351. 2016.

BLAESE *et al.* lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years *Science* (New York, N.Y.). **Science**. 270: 475-48. 1995.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. 2019. Acesso em: 15 de fevereiro de 2023.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Atlas On-Line de Mortalidade. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml#panelResultado>. 2021. Acesso em: de janeiro de 2024.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Como surge o câncer? Disponível em: [https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer#:~:text=O%20processo%20de%20formação%20do,origem%20a%20um%20tumor%20visível](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer#:~:text=O%20processo%20de%20formação%20do,origem%20a%20um%20tumor%20visível.). 2022c. Acesso em 10 de janeiro de 2024.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Detecção precoce. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/acoes/deteccao-precoce>. 2023. Acesso em: 14 de janeiro de 2024.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>. 2022. Acesso em: 15 de fevereiro de 2023.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**. 74(3):229-263. 2024.

CANTILE, M. *et al.* *In vivo* expression of the whole *HOX* gene network in human breast cancer. **European Journal of Cancer**. 39: 257-264. 2003.

CAO, G. Physical Chemistry of Solid Surfaces. In: **Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties, and Applications**. 2. ed. [s.l.]World Scientific Series in Nanoscience and Nanotechnology, 2011. 2p. 19–60.

CARE, A. *et al.* *HOXB7* constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. **Molecular and Cellular Biology**. 16 (9): 4842-4851. 1996.

CARE, A. *et al.* *HOXB7*: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. **Cancer Research**. 61: 6532-6539. 2001.

CARE, A. *et al.* Transduction of the SkBr3 breast cancer carcinoma cell line with the *HOXB7* gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces

growth factor dependence. **Oncogene**. 16: 3285-3289. 1998.

CHEN, H.; SUKUMAR, S. *HOX* genes: emerging stars in cancer. **Cancerbiology & Therapy**. 2 (5): 524-525. 2003.

CHILE *et al.* *HOXB7* RNA is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinomas and its knockdown induces cell cycle arrest and apoptosis. **Biomedical Central Cancer**. 13: 451 – 463. 2013.

CHOI, H. *et al.* Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**. 25 (10):1165-1170. 2007.

CITRATO DE TAMOXIFENO. Paraná: Sandoz do Brasil Industria Farmacêutica Ltda,, 2014. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7986232014&pIdAnexo=2216291. Bula de remédio.

CLEMONS, M.; DANSON, S.; HOWELL, A. Tamoxifen (‘Nolvadex’): a review. **Cancer Treatment Reviews**. 28: 165-180. 2002.

COMŞA, Ş.; CÎMPEAN, A.M.; RAICA, M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Res**. 35(6):3147-54. 2015.

DESTRO *et al.* Overexpression of *HOXB7* homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. **International Journal of Oncology**. 36: 141-149. 2009.

DU, Y. *et al.* COX-2 silencing enhances tamoxifen antitumor activity in breast cancer *in vivo* and *in vitro*. **International Journal of Oncology**. 44: 1385-1393. 2014.

ELBASHIR, S.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes & Development**. 15: 188-200. 2001.

EROLE, P. *et al.* Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**. 38: 698-707. 2012.

EVANS, R.; NAPPER, D. Steric Stabilization I. **Kolloid-Z U. Z-Polymere**. 251:409-414. 1973.

FAVIER, B.; DOLLE, P. Developmental functions of mammalian *HOX* genes. **Molecular Human Reproduction**. 3 (2): 115-131. 1997.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 391: 806–811, 1998.

FLOREADA.IO. Flow Cytometry Analysis. Disponível em: <https://floreada.io>. Acesso em: 17 de outubro de 2022.

GADEKAR, V.; BORADE, Y.; KANNAUJIA, S.; RAJPOOT, K.; ANUP, N.; TAMBE, V.; KALIA, K.; TEKADE, R. Nanomedicines accessible in the market for clinical

interventions. **Journal of Controlled Release**. 330: 372-397. 2021.

GAO, P.; ZHANG, X.; WANG, H.; ZHANG, Q.; LI, H.; LI, Y.; DUAN, Y. Biocompatible and colloidally stabilized mPEG-PE/calcium phosphate hybrid nanoparticles loaded with siRNAs targeting tumors. **Oncotarget**. 7(3):2855-66. 2016.

GATTO, M.S.; NAJAH-MISSAOUI, W. Lyophilization of Nanoparticles, Does It Really Work? Overview of the Current Status and Challenges. **Int J Mol Sci**. 24(18):14041. 2023.

GHOSH, P.; DULLEA, R.; FISCHER, J.E.; TURI, T.G.; SARVER, R.W.; ZHANG, C.; BASU, K.; DAS, S.K.; POLAND, B.W. Comparing 2-nt 3' overhangs against blunt-ended siRNAs: a systems biology based study. **BMC Genomics**. 2009.

GIGER, E.V.; CASTAGNER, B.; RÄIKKÖNEN, J.; MÖNKKÖNEN, J.; LEROUX, J.C. siRNA transfection with calcium phosphate nanoparticles stabilized with PEGylated chelators. **Adv Healthc Mater**. 2(1):134-44. 2013.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**. 22: 1736-1747. 2011.

GRAHAM, F.L.; VAN DER EB, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**. 52, 456–467. 1973.

GREEN *et al.* Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Ann Oncol**. 17: 1263-1268. 2006.

GUO, J. *et al.* Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**. 29: 402-417. 2011.

HALWANI, A. A. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. **Pharmaceutics**. 14 (1):106. 2022.

HANAHAN D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discov**. 12(1): 31-46. 2022.

HARBECK, N., & GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**. 389(10074): 1134–1150. 2017.

HE, X. *et al.* *HOXB7* overexpression promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in gastric cancer patients by inducing expression of both AKT and MARKs. **Oncotarget**. 8 (1): 1247-1261. 2017.

HOEFNAGEL, L. *et al.* Prognostic value of estrogen receptor α and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. **Cancer**. 2012.

HOSPITAL HÉLIO ANGOTTI. Sobre o câncer. Disponível em:

<https://www.helioangotti.com.br/paciente/sobre-o-cancer/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2024.

HOSSEN *et al.* Smart nanocarrier-based drug delivery systems for câncer therapy and toxicity studies: A review . **Journal of Advanced Research**. 15. 2019.

HOSONUMA, M.; YOSHIMURA, K. Association between pH regulation of the tumor microenvironment and immunological state. **Front Oncol**. 10; 13:1175563. 2023.

HOWELL, A. *et al.* ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, pure antiestrogen. **Cancer**. 89 (4): 817-825. 2000.

HUAN *et al.* *HOXB7* accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 36: 86-100. 2017.

HUBBARD, S. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. **Curr Opin Struct Biol**. 12 (6): 735-741. 2002.

HUR *et al.* Analysis of *HOX* gene expression patterns in human breast câncer. **Mol Biotechnol**. 56: 64-71. 2014.

International Organization for Standardization. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:80004:-1:ed-1:v1:en:term:2.5>. 2010. Acesso em: 27 de fevereiro de 2023.

JAMES *et al.* Liposomal doxorubicin (Doxil): An effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 6: 294-296. 1994.

JHAVERI, A.; DESHPANDE, P.; TORCHILIN, V. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy . **Journal of Controlled Release**. 2014

JIA, Y.; JIANG, Y.; HE, Y.; ZHANG, W.; ZOU, J.; MAGAR, K.T.; BOUCETTA, H.; TENG, C.; HE, W. Approved Nanomedicine against Diseases. **Pharmaceutics**. 15(3):774. 2023.

JIN *et al.* *HOXB7* is an ER α cofactor in the activation of HER2 and multiple ER target genes leading to endocrine resistance. **Cancer Discov**. 5 (9): 944-959. 2015.

JIN *et al.* The *HOXB7* protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway. **PNAS**. 109 (8): 2736-2741. 2012.

JIN, K.; SUKUMAR, S. A pivotal role for *HOXB7* protein in endocrine resistant breast câncer. **Oncoscience**. 2 (11): 917-919. 2015.

JORDAN, V. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. **Eur J Cancer**. 44 (1): 30-38. 2007.

JOSELSON *et al.* ESR1 mutations as a mechanism for acquired endocrine resistance in breast câncer. **Nat Rev Clin Oncol**. 12 (10): 573-583. 2015.

JOUDEH, N.; LINKE, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. **J Nanobiotechnol.** 20, 262. 2022.

JUDGE *et al.* Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. **Nature Biotechnology.** 23 (4): 457-462. 2005.

JUNG J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. **Toxicol Res.** 30(1):1-5. 2014.

KAISER, 2018. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/news/2017/08/modified-t-cells-attack-leukemia-become-first-gene-therapy-approved-united-states>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2023.

KAKIZAWA *et al.* Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **Journal of Controlled Release.** 97: 345-356. 2004b.

KAKIZAWA *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.** 16 (8): 699-702. 2004a.

KAKIZAWA, Y. KATAOKA, K. Block copolymer self-assembly into monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calciumphosphate. **Langmuir.** 18 (12): 4539-4543. 2002.

KAMALY *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development, and clinical translation. **Chem Soc Rev.** 41: 2971-3010. 2012.

KANWAR, J.; MAHIDHARA, G.; KANWAR, R. Foundation review: antiangiogenic therapy using nanotechnological-based delivery system. **DrugDiscovery Today.** 16 (5/6). 2011.

KASS, G.E.; ORRENIUS, S. Calcium signalling and cytotoxicity. **Environ Health Perspect.** 107: 25-35. 1999.

KHALED *et al.* Controlable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology. **Nano Lett.** 5 (9): 1797-1808. 2005.

KIM *et al.* PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3pancreatic tumor. **Journal of Drug Targeting.** 20 (1): 33-42. 2011.

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

LEITE *et al.* Mulheres com diagnóstico de câncer de mama em tratamento com tamoxifeno: perfil sociodemográfico e clínico. **Revista Brasileira de Cancerologia.**

57 (1): 15-21. 2012.

LEIVINGSTONE, T. J.; HERBAJ, S.; REDMOND, J.; MCCARTHY, H. O.; DUNNE, N. J. Calcium phosphate nanoparticles-based systems for RNAi delivery: Applications in bone tissue regeneration. **Nanomaterials**, 10(1), 146. 2020.

LI *et al.* *HOXB7* Promotes Malignant Progression by Activating the TGF β Signaling Pathway . **Cancer Research**. **75 (4):: 709-719**. 2015.

LIAO *et al.* *HOXB7* as a Prognostic Factor and Mediator of Colorectal Cancer Progression. **Human Cancer Biology**. 17 (11): 3569-3578. 2011

LIU *et al.* *HOXB7* promotes malignant progression by activating the TGF β signaling pathway. **Cancer Research**. 75 (4): 709-719. 2015.

LOURENCO, C. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics**. 138(1), 1–12. 1996.

MAEDA *et al.* Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. **Macromolecular Rapid Communications**. 35: 1211-1215. 2014.

MALVERN. 2024. Particle Concentration. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/measurement-type/particle-concentration>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2024.

MANAARGADOO-CATIN, M.; ALI-CHERIF, A.; POUGNAS, J. L.; PERRIN C. Hemolysis by surfactants - A review, **Advances in Colloid and Interface Science**. 2015.

MATSUMARA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and he antitumor agent smancs. **Cancer Research**. 46:6387-6392. 1986.

MELLO JR, L. J. *et al.* Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. **Nanotechnology**. 2018.

MELLO JR. L.J. **Silenciamento dos genes antiapoptóticos BCL-2 e BCL-xL por RNA de interferência carregado por nanopartículas híbridas em câncer de mama**. Tese (Doutorado em Bioquímica) — Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2017.

MENCK, C. F. M. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. **Estudos avançados**. 24 (70):99-108. 2010.

MITRACH, F *et al.* Amphiphilic Anionic Oligomer-Stabilized Calcium Phosphate Nanoparticles with Prospects in siRNA Delivery via Convection-Enhanced Delivery. **Pharmaceutics**. 14(2):326. 2022.

MITTAL; BANERJEE. Current status and future prospects of nanobiomaterials in drug delivery. In: **Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials**. 618 p. 2016.

MOO TA, SANFORD R, DANG C, MORROW M. Overview of Breast Cancer Therapy. **PET Clin**. 13(3): 339-354. 2018.

MOORE, T.L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L.; HIRSCH, V.; BALOG, S.; URBAN, D.; JUD, C.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; LATTUADA, M.; PETRI-FINK, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society Reviews**. 17. 2015

MULLER, R.; HENEMANN, S. Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability. **Clinical Nutrition**. 11: 223-236. 1992.

MUSGROVE, E.; SUTHERLAND, R. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews**. 9: 631-643. 2009.

NAM *et al.* Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 65: 622-648. 2013.

NANGIA, S.; SURESHKUMAR, R. Effects of nanoparticle charge and shape anisotropy on translocation through cell membranes. **Langmuir**. 28:17666- 27671. 2012.

NAORA *et al.* A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells. **PNAS**. 98 (7): 4060-4065. 2001.

NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K, M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, 30: e20200024. 2020.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. 2023. Acesso em: 13 de fevereiro de 2023.

NEWBY *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. **Clinical Cancer Research**. 3:1643-1651. 1997.

NICHOLSON *et al.* Growth factor signaling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 93: 257-262. 2005.

NIETH *et al.* Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). **Febs Letters**. 545: 144-150. 2003.

NIH. Breast Cancer Treatment (PDQ®)—Patient Version. Disponível em: https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq#_148. 2023.

Acesso em 20 de Janeiro de 2024.

NORTHFELT *et al.* Doxorubicin Encapsulated in Liposomes Containing Surface-Bound Polyethylene Glycol: Pharmacokinetics, Tumor Localization, and Safety in Patients with AIDS-Related Kaposi's Sarcoma. **The Journal of Clinical Pharmacology**, 36(1), 55–63. 1996.

ONPATTRO. Disponível em: <https://www.onpattro.com/wp-content/uploads/2018/08/ONPATTRO-Patient-Brochure.pdf>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2023

PAÇO, A.; LEITÃO-CASTRO, J.; FREITAS, R. Epigenetic Regulation of CDH1 Is Altered after *HOXB7*-Silencing in MDA-MB-468 Triple-Negative Breast Cancer Cells. **Genes (Basel)**. 12(10):1575. 2021.

PELAZ *et al.* Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol: effects on protein adsorption and cellular uptake. **ACS Nano**. 9 (7): 6996-7008. 2015.

PERRAULT *et al.* Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. **Nano Letters**. 9 (5): 1909-1915. 2009.

PITTELLA *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**. 32: 3106-3114. 2011.

PITTELLA *et al.* Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. 161: 868-874. 2012.

PITTELLA *et al.* Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. **Journal of Controlled Release**. 178: 18-24. 2014.

POLYAK K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**. 117(11): 3155-63. 2007.

RAND, T. A. *et al.* Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 101 (40): 14385–14389. 2004.

RAND, T.A. *et al.* Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. **Cell**. 123: 621-629. 2005.

REYNOLDS *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**. 22 (3): 326-330. 2004.

RUBIN *et al.* A role for the *HOXB7* homeodomain protein in DNA repair. **Cancer Research**. 67 (4): 1527-1235. 2007.

SHAH, N.; SUKUMAR, S. The *HOX* genes and their roles in oncogenesis. **Nature Reviews**. 10: 361-371. 2010.

SIAFAKA *et al.* Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses. **International Journal of Molecular Sciences**. 17: 1440-1480. 2016.

SIERRA *et al.* The new classification of breast cancers: finding the luminal A. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 36 (12): 575-580. 2014.

SILVA, L.M. *et al.* Licochalcone A-loaded solid lipid nanoparticles improve antischistosomal activity *in vitro* and *in vivo*. **Nanomedicine**. 16(19):1641-1655. 2021.

SOENEN, S. J. H.; ILLYES, E.; VERCAUTEREN, D.; BRAECKMANS, K.; MAJER, Z.; DE SMEDT, S. C.; DE CUYPER, M. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. **Biomaterials**. 30(36): 6803–6813. 2009.

SOUSA FILHO, P.; SERRA, O. Metodologia de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. **Quim Nova**. 38(5): 679-696. 2015.

SOUTSCHEK *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. **Nature**. 432: 173-178. 2004.

SOUZA, G. **Desenvolvimento de nanopartículas híbridas para terapia por RNA interferência: silenciamento de genes-chave na sobrevivência celular em câncer de mama**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) — Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2016.

SOUZA, G.R.R.; DALMINA, M.; RESTREPO, J.A.S.; DE MELLO JUNIOR, L.J.; SILVA, A.H.; GUALBERTO, A.; GAMEIRO, J.; DITZ, D.; PASA, A.A.; PITTELLA, F.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Short interfering RNA delivered by a hybrid nanoparticle targeting VEGF: Biodistribution and anti-tumor effect. **Biochim Biophys Acta Gen Subj**. 1865 (9): 129938. 2021.

STATEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophys Ver**. 8:409-427. 2016.
STORTI *et al.* *HOXB7* expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. **Nature**. 25: 527-537. 2011.

SUN YS, ZHAO Z, YANG ZN, XU F, LU HJ, ZHU ZY, SHI W, JIANG J, YAO PP, ZHU HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **Int J Biol Sci**. 13(11): 1387-1397. 2017.

SVINGEN, T.; TONISSEN, K. Altered *HOX* gene expression in human skin and breast cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**. 2 (5): 518-523. 2003.
TESAROVA P. Breast cancer in the elderly—Should it be treated differently? **Rep Pract Oncol Radiother**. 18(1):26-33. 2012.

SYLMAN, J.L.; MITRUGNO, A.; TORMOEN, G.W.; WAGNER, T.H.; MALLICK, P.; MCCARTY, O.J.T. Platelet count as a predictor of metastasis and venous thromboembolism in patients with cancer. **Converg Sci Phys Oncol**. 3(2):023001. 2017.

SZE, A. et al. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, n. 2, p. 402–410, 15 maio 2003.

THAPA, R.K.; KIM, J.O. Nanomedicine-based commercial formulations: current developments and future prospects. **J Pharm Investig**. 53(1):19-33. 2023
TOMANIN, R.; SCARPA, M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations, and future perspectives of viral vectors transduction. **Current Gene Therapy**. 4: 357-372. 2004.

ThermoScientific. Cy5 dye. 2024. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/cy5-dye.html>. Acesso em 20 de fevereiro de 2024.

UI-TEI, K.; NAITO, Y.; TAKAHASHI, F.; HARAGUCHI, T.; OHKI-HAMAZAKI, H.; JUNI, A.; UEDA, R.; SAIGO, K. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. **Nucleic Acids Res**. 32 (3): 936-48. 2004.

USKOKOVI, V.; USKOKOVI, D. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphate: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **Journal of Biomedical Materials Research B: applied biomaterials**. 96B (1):153-191. 2010.

VALLE, A.; GUALBERTO, A.; PITTELLA, F. Short Interfering RNA (siRNA) based Medicines and the Future of RNAi Therapy: A Mini Review. **Curr Trends Biomedical Eng & Biosci**. 19 (5): 556022. 2019.

VALLE, A.B.C.S. **Silenciamento do gene *HOXB7* em linhagem de câncer de mama utilizando nanopartículas híbridas contendo siRNA e cotratamento com tamoxifeno** Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) — Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora. 2019.

VAN RIJT, S.; DE GROOT, K.; LEEUWENBURGH, S.C.G. Calcium Phosphate and Silicate-Based Nanoparticles: History and Emerging Trends. **Tissue Eng Part A**. 28 (11-12): 461-477. 2022.

VIEIRA, D.; GAMARRA, L. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein**. 14 (1): 99-103. 2016.

WESIERSKA-GADEK J, SCHREINER T, MAURER M, WARINGER A, RANFTLER C. Phenol red in the culture medium strongly affects the susceptibility of human MCF-7 cells to roscovitine. **Cell Mol Biol Lett**. 12(2): 280-93. 2007.

WHITEHEAD, K.; LANGER, R.; ANDERSON, D. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews**. 8: 129-138. 2009.

WIANNY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. **Cell Biology**. 2: 70-75. 2000.

WONDIMNEH, B.; ANEKERE, S.; GEBREGZABHER, G.; BELAY, E.; GEBREMESKEL, G.; BAYE, G. Comparison of Hematological and Biochemical Profile Changes in Pre- and Post-Chemotherapy Treatment of Cancer Patients Attended at Ayder Comprehensive Specialized Hospital, Mekelle, Northern Ethiopia 2019: A Retrospective Cohort Study. **Cancer Manag Res**. 13:625-632. 2021.

World Health Organization. Breast cancer. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. 2021. Acesso em: 16 de fevereiro de 2023.

World Health Organization. Cancer Tomorrow. Disponível em: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=0_1&sexes=2&mode=cancer&group_populations=0&multiple_populations=0&multiple_cancers=1&cancers=20&populations=900. 2022. Acesso em 17 de janeiro de 2024.

WU *et al.* *HOXB7*, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Research**. 66 (19): 9527-9534. 2006.

XIAO, W.; ZHENG, S.; YANG, A.; ZHANG, X.; ZOU, Y.; TANG, H, *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of distant metastasis at initial diagnosis: a population-based study. **Cancer Manag Res**. 10: 5329. 2018.

YUAN *et al.* Role of *HOXB7* in regulation of Progression and Metastasis of Human Lung Adenocarcinoma. **Molecular Carcinogenesis**. 53: 49-57. 2014.

ZHANG, M.; KATAOKA, K. Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **NanoToday**. 4: 508-517. 2009.

ZHOU, Q *et al.* Stabilized calcium phosphate hybrid nanocomposite using a benzoxaborole-containing polymer for pH-responsive siRNA delivery. **Biomaterials Science**. 2018.

ANEXO A



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Terapia por RNA de interferência (RNAi) em câncer de mama: avaliação da eficiência de entrega de nanopartículas híbridas *in vitro*, silenciamento do gene HOXB7 *in vivo* e cotratamento com tamoxifeno”, registrada com o nº 49/23, sob a responsabilidade de Emerson Soares Bernardes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela CEUA-IPEN - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em **01/06/2023**.

We certify that the proposal titled “RNA Interference (RNAi) therapy in breast cancer: evaluation of *in vitro* hybrid nanoparticle delivery efficiency and *in vivo* HOXB7 gene silencing and cotreatment with tamoxifen”, registration number 50/23, under the responsibility of Emerson Soares Bernardes, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the CEUA-IPEN - Ethic Committee on Animal Use of the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN-SP) in **06/01/2023**.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Junho/2023 a Agosto/2023
Espécie/linhagem/raça:	<i>Mus Musculus</i> – camundongo Balb/c nude
Nº de animais:	30
Peso/Idade:	6 a 8 semanas
Sexo:	Fêmeas
Origem:	Biotério do IPEN-CNEN/SP

São Paulo, 01 de junho de 2023.

Cibele Nunes Peroni
Coordenadora da CEUA/IPEN