

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Ana Cristina Moura Gualberto**

**SILENCIAMENTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 9 E 13 POR  
RNA DE INTERFERÊNCIA EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO**

Juiz de Fora, 2019

**Ana Cristina Moura Gualberto**

**SILENCIAMENTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 9 E 13 POR  
RNA DE INTERFERÊNCIA EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas:  
Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Prof. D<sup>a</sup> Jacy Gameiro**  
**Coorientador: Prof Dr. Frederico Pittella**

Juiz de Fora, 2019

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

Gualberto, Ana Cristina Moura.

SILENCIAMENTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 9 E 13 POR RNA DE INTERFERÊNCIA EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO / Ana Cristina Moura Gualberto. -- 2019. 80 f.

Orientadora: Jacy Gameiro

Coorientadora: Frederico Pittella

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Câncer de mama. 2. Metástase. 3. Metaloproteinase de matriz. 4. Nanopartículas. 5. siRNA. I. Gameiro, Jacy, orient. II. Pittella, Frederico, coorient. III. Título.

**Ana Cristina Moura Gualberto**

**SILENCIAMENTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 9 E 13 POR  
RNA DE INTERFERÊNCIA EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e  
área de concentração em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da UFJF

Tese aprovada em: 12/03/2019

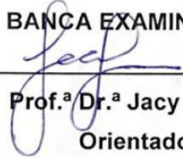
ANA CRISTINA MOURA GUALBERTO

SILENCIAMENTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ 9 E 13 POR RNA DE  
INTERFERÊNCIA EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO

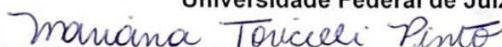
Tese de Doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 12/03/2019.

BANCA EXAMINADORA:

  
Prof.ª Dr.ª Jacy Gameiro  
Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr.ª Mariana Toricelli Pinto

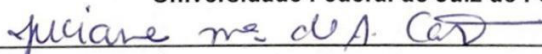
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

  
Dr.ª Danielle Cristina Zimmermann Franco

UNIPAG

  
Prof.ª Dr.ª Michele Munk Pereira

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esse trabalho aos meus amados pais,  
Rosângela e José Gualberto!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pessoas mais especiais desse mundo! À minha mãe Rosângela, por toda generosidade, sensibilidade e carinho e ao meu pai José Gualberto, pelo incentivo e por acreditar em tudo isso. Amo vocês!

Às minhas queridas irmãs Daniela, Fabiana e Flávia pela compreensão, incentivo e amor. Vocês são as melhores que eu poderia ter! Ao Arthur, por trazer luz pra minha vida.

Aos amigos que a vida em Juiz de Fora me deu Alyssa, Anelise, Diego, Gabriel, Jéssica, Luan, Rapha e Sara, por estarem perto a cada momento em que eu precisava de uma palavra amiga – e foram muitos – com muito amor.

Ao querido Ulisses, por me auxiliar na busca por autoconhecimento ao longo dos seis intensos anos de pós-graduação. Sou muito grata a toda transformação vivida.

À Bia pela grande parceria e amizade.

À professora Jacy Gameiro, muito mais que uma orientadora com a qual convivo desde a iniciação científica, agradeço por me ensinar a ver a vida com um olhar humano muito além do científico, pela compreensão com os imprevistos da vida, pelo grande coração, pelas melhores palavras sempre e pela amizade. Sem dúvida, chegar até aqui tem muito de ter te encontrado como orientadora!

Ao professor Frederico Pittella, agradeço por me acolher em seu laboratório e em sua linha de pesquisa, por me ensinar a ser otimista com as adversidades da carreira científica e por mostrar outras maneiras de fazer ciência. Eu tive o privilégio de ter dois grandes orientadores nessa jornada!

Aos alunos de iniciação científica presentes ao longo desses quatro anos por todo auxílio.

Aos alunos, professores e funcionários do Laboratório de Imunologia por todo apoio.

Aos amigos companheiros de laboratório Sara, Diego e Luan, sem vocês seria infinitamente mais difícil!

Ao professor Marcelo pela generosidade e disponibilidade no momento delicado em que vivemos nesse país.

Ao laboratório LIP, especialmente à Prof<sup>a</sup> Miriam, pela generosidade e por todo auxílio no uso de equipamentos.

Ao professor Humberto, por permitir o uso do equipamento Zetasizer em seu laboratório e a aluna Camila por auxiliar nas análises.

À Gabi Haberbeck da UFSC por todo auxílio, ensinamentos e disponibilidade e à professora Tânia Pasa por permitir todo esse auxílio.

À banca pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Aos órgãos de fomento, Capes pela bolsa concedida, CNPq através do projeto 479154/2012-0 e Fapemig por meio do projeto APQ-00948-14.

À Pós-graduação em Ciências Biológicas e UFJF pela oportunidade.

À todos que indiretamente contribuíram para este momento, obrigada!!



**O mundo de cada um é feito com o que faz sentido e os move,  
Jacob von Uexk**

## RESUMO

O câncer engloba um conjunto de doenças caracterizadas por crescimento e invasão celular anormal em órgãos e tecidos podendo espalhar-se para outros locais do corpo. Atualmente é considerado um problema de saúde pública mundial com altos índices de mortalidade. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais prevalente em mulheres com altos índices de mortalidade devido a metástases. Proteínas envolvidas no processo de progressão tumoral tem sido alvos de abordagens terapêuticas. Nesse contexto, as metaloproteinases de matriz (MMPs) são genes que se encontram superexpressos em diversos tipos de cânceres e atuam na progressão tumoral por meio da proteólise de componentes da membrana basal e matriz extracelular, atuando na invasão e metástase de células tumorais. Terapias atuais como hormonal, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia não tem sido totalmente eficaz, tornando-se necessário a busca de novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, o silenciamento de genes superexpressos nos tumores é uma alternativa. O uso de RNAs de interferência (siRNA) tem sido descrito como potencial método para o silenciamento, porém as moléculas de siRNA livres oferecem algumas limitações, como dificuldade para entrar de forma passiva nas células e seu peso molecular, sendo necessária o uso de nanocarreadores que entreguem esta molécula à célula alvo. Diante disso, o objetivo principal foi utilizar nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio para a entrega de siRNA *in vitro* às células de câncer de mama metastático 4T1 para silenciar os genes de MMPs 9 e 13. Os resultados obtidos mostraram que as sequências de siRNA construídas a partir de critérios de funcionalidade foram adequadas para a utilização proposta. Além disso, as nanopartículas híbridas utilizadas apresentam tamanho adequado para a entrega de siRNA às células tumorais alvo e eficiência de incorporação de siRNA às nanopartículas de aproximadamente 80%. Foi avaliada a capacidade citotóxica (ensaios de MTT e Azul de Tripán) das nanopartículas e de siRNAs em células 4T1 e não houve diferença significativa na viabilidade celular. Em seguida, avaliamos se a complexo nanoestruturado foi eficaz reduzindo a expressão dos genes alvo. Obtivemos um silenciamento satisfatório que permitiu analisar se, ao silenciar MMP9 e MMP13, haveria interferência em etapas fundamentais de progressão tumoral como proliferação (ensaio clonogênico) e migração celulares (ensaio de wound healing e transwell). Os resultados obtidos corroboraram aos dados da literatura que mostram MMP9 e MMP13 envolvidas com o processo de migração de células tumorais em câncer de mama. Portanto, não obtivemos diferenças em termos de proliferação celular com o silenciamento das MMPs 9 e 13, mas houve redução significativa nos processos de migração de células tumorais com o silenciamento. Em conclusão, as MMPs 9 e 13 estão envolvidas com a migração de células de câncer de mama e o silenciamento por RNAi se mostrou promissor para novas abordagens terapêuticas e para a melhor compreensão sobre as metástases em câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama; Metástase; Metaloproteinase de matriz; Nanopartículas; siRNA.

## ABSTRACT

Cancer encompasses a set of diseases characterized by abnormal cell growth and invasion in organs and tissues that can spread to other parts of the body. It is currently considered a worldwide public health problem with high mortality rates. Breast cancer is the second most prevalent type of cancer in women with high mortality rates due to metastases. Proteins involved in the process of tumor progression have been targeted by therapeutic approaches. In this context, matrix metalloproteinases (MMPs) are genes that are overexpressed in several types of cancers and act on tumor progression through the proteolysis of components of the basement membrane and extracellular matrix, acting on the invasion and metastasis of tumor cells. Current therapies such as hormonal, chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy have not been fully effective, making it necessary to seek new therapeutic approaches. In this context, the silencing of superexpressed genes in tumors is an alternative. The use of interfering RNAs (siRNA) has been described as a potential method for silencing, but the free siRNA molecules offer some limitations, such as the difficulty to enter passively into the cells and their molecular weight, being necessary the use of nanocarreadores that this molecule to the target cell. In view of this, the main objective was to use hybrid calcium phosphate nanoparticles for delivery of siRNA in vitro to 4T1 metastatic breast cancer cells to silence the MMPs genes 9 and 13. The results obtained showed that the siRNA sequences constructed at functional criteria were adequate for the proposed use. In addition, the hybrid nanoparticles used are suitable size for delivery of siRNA to target tumor cells and efficiency of incorporation of siRNA into nanoparticles of approximately 80%. The cytotoxic capacity (MTT and Tripan Blue assays) of the nanoparticles and siRNAs in 4T1 cells was evaluated and there was no significant difference in cell viability. Next, we evaluated whether the nanostructured complex was effective by reducing the expression of the target genes. We obtained a satisfactory silencing that allowed us to analyze whether silencing MMP9 and MMP13 would interfere with fundamental stages of tumor progression, such as cell proliferation (clonogenic assay) and cell migration (wound healing and transwell assay). The results obtained corroborated the literature data showing MMP9 and MMP13 involved in the migration process of tumor cells in breast cancer. Therefore, we did not obtain differences in terms of cell proliferation with the silencing of MMPs 9 and 13 but there was a significant reduction in the migration processes of tumor cells with silencing. In conclusion, MMPs 9 and 13 are involved in the migration of breast cancer cells and the silencing by RNAi has shown promise for new therapeutic approaches and for the better understanding on the metastases in breast cancer.

Keywords: Breast cancer; Metastasis; Matrix Metalloproteinase; Nanoparticles; siRNA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático mostrando o carcinoma mamário ductal invasivo e lobular invasivo .....	21
Figura 2: Figura 2: Desenvolvimento de metástases em tumores.....	25
Figura 3: Estrutura das metaloproteinases de matriz (MMPs).....	30
Figura 4: Atividade de metaloproteinases na invasão tecidual, angiogênese e metástase tumoral.....	31
Figura 5: Atividade de metaloproteinases na invasão tecidual, angiogênese e metástase tumoral .....	32
Figura 6: A progressão tumoral e a atuação de metaloproteinases de matriz .	33
Figura 7: Mecanismo de interferência de RNA (RNAi) por short interfering RNA (siRNA).....	37
Figura 8: Ilustração de nanopartícula de fosfato de cálcio/PEG/siRNA.....	40
Figura 9: Localização do pareamento de siRNA ao RNA mensageiro do gene MMP9 .....	54
Figura 10: Localização do pareamento de siRNA ao RNA mensageiro do gene MMP13.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 11: Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 12: Análise da expressão do gene MMP9.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 13: Viabilidade celular por MTT em 24h.....	60
Figura 14: Viabilidade celular por MTT em 48h.....	61
Figura 15: Viabilidade celular por Azul de Tripán em 24h ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 16: Viabilidade celular por Azul de Tripán em 48h ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 17: Análise da formação de clones celulares .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 18: Avaliação do potencial migratório de células de câncer de mama ..	66
Figura 19: Capacidade de migração em células tumorais ..	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 20: Avaliação da migração individual de células 4T1.....	68

Figura 21: Capacidade de migração em células tumorais .. **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de siRNA utilizadas.....	53
Tabela 2:Eficiência de incorporação de siRNA à nanopartículas .....	57
Tabela 3: Características dos primers utilizados na reação de PCR.....	59

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA – Análise de variância  
ATM – Treonina quinase  
BLAST – Ferramenta de busca de alinhamento básico local  
CaP – Fosfato de Cálcio  
CCL2 – Quimiocina da família CC  
CD8 – Linfócito T citotóxico  
CDH1 – Caderina 1  
cDNA – DNA complementar  
CHEK2 – Checkpoint quinase 2  
CXCL8 – Quimiocina ou interleucina 8  
DLS – Dynamic light scattering  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Médium  
DMSO- Dimetil Sulfóxido  
EGF – Fator de crescimento epidérmico  
EMT – Transição epitélio mesenquimal  
EphA2 - Receptor 2 da efrina tipo A  
EPR – Efeito de permeabilidade e retenção  
FGF – Fator de crescimento de fibroblasto  
HER2 - Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano  
IHQ - Imunohistoquímica  
IL-1 – Interleucina tipo 1  
IL-6 – Interleucina tipo 6  
Ki67 – Proteína ki67  
KSP – Proteína de cinesina  
MEC – Matriz extracelular  
MMP – Metaloproteinase de matriz  
Mock – Nanopartícula vazia  
MT-MMP – Metaloproteinase de matriz do tipo membrana  
MTT - Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio  
Naked- siRNA livre  
NK – Natural killer  
NP- Nanopartícula  
PdI- Índice de Polidispersão  
PEG- Polietileno(glicol)  
PEG-GLU – Polietilenoglicol-ácido glutâmico  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PKL1 – Proteína quinase 1

PKN3 – Proteína quinase N3  
PRO-MMP – Metaloproteinase de matriz inativa  
PTEN – Fosfatase e homólogo da tensina  
RE – Receptor de estrogênio  
RECK – Inibidor de metaloproteinase  
RISC- Complexo de Indução de Silenciamento de RNA  
RNA – Ácido ribonucléico  
RNAi – RNA de interferência  
RP – Receptor de progesterona  
RRM2 - Subunidade reguladora de ribonucleotídeo redutase  
SFB – Soro fetal bovino  
siRNA – short interfering RNA  
STK11 – Treonina quinase 11  
TAM – Macrófagos associados ao tumor  
TGF- $\alpha$  – Fator transformador de crescimento  $\alpha$   
TGF- $\beta$ 1 – Fator transformador de crescimento  $\beta$ 1  
TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase  
TNBC – Câncer de mama triplo negativo  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TP53 – Proteína tumoral p53  
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular  
VEGFR-1 – Receptor 1 de fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
1.1. Câncer de mama	18
1.1.1. Prevenção e tratamento	19
1.1.2. Classificação histológica	20
1.2. Metástase	22
1.3. Metaloproteinases de matriz	27
1.4. RNA de interferência	35
1.5. Nanopartículas híbridas	39
<b>2. OBJETIVOS</b>	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	43
3.1. Materiais	43
3.2. Cultura Celular	43
3.3. Construção das sequências de siRNA	44
3.4. Nanopartículas	44
3.4.1. Preparação de nanopartículas híbridas	44
3.4.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	45
3.4.3. Eficiência de encapsulação de siRNA em nanopartículas	45
3.5. Extração de RNA	46
3.6. PCR em tempo real	47
3.7. Análise de viabilidade celular	48



3.7.1.	Teste de avaliação do metabolismo celular com MTT .....	48
3.7.2.	Teste de viabilidade com Azul de Trypan .....	49
3.8.	Ensaio de migração celular .....	49
3.8.1.	Wound Healing (migração coletiva) .....	50
3.8.2.	Ensaio de migração - Transwell.....	50
3.9.	Ensaio de clonogenicidade .....	51
3.10.	Análise estatística .....	52
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
4.1.	Sequências de siRNAs e genes alvo .....	53
4.2.	Caracterização de nanopartículas híbridas .....	55
4.3.	Eficiência de encapsulação de siRNA.....	56
4.4.	Avaliação do silenciamento gênico .....	58
4.5.	Análise da viabilidade celular .....	59
4.7.	Avaliação da capacidade de migração celular .....	65
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>706.</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de mama

O câncer engloba um conjunto de doenças caracterizadas por crescimento e invasão celular anormal em órgãos e tecidos podendo espalhar-se para outros locais do corpo. Atualmente é um problema de saúde pública mundial com um aumento em sua incidência em aproximadamente 30% anualmente. Espera-se para 2030, 27 milhões de novos casos de câncer com 17 milhões de mortes em todo o mundo (OMS, 2018). Somente no Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 1,2 milhão de novos casos (Brasil, 2018).

O câncer de mama recebe destaque por ser o segundo tipo de câncer mais frequente em mulheres, respondendo por 29,5% dos novos casos a cada ano no Brasil (Brasil, 2018). Pode ocorrer em homens apesar de ser raro (Fentiman, 2009). Em termos de prevalência, a situação assemelha-se bastante ao cenário internacional, com esta neoplasia figurando como a mais frequente (Bray, Ferlay and Soerjomataram, 2018). Depois dos índices de tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil) (Brasil,2018).

A história do câncer de mama remonta a cerca de 1.500 anos A.C com relatos egípcios. Em 460 A.C. Hipócrates, o pai da medicina ocidente, foi o primeiro a definir a terminologia *karkinos*, palavra grega para câncer. Posteriormente, em 200 D.C., Galen fez uma caracterização detalhada sobre crescimentos celulares anormais acreditando que câncer pudesse aparecer em qualquer parte do corpo mas, com mais frequência, em seios de mulheres cuja menstruação era anormal (Papavramidou, Papavramidis, & Demetriou, 2010; Akram & Siddiqui, 2012).

Na população mundial, a média de sobrevida após cinco anos de surgimento do câncer de mama primário, é de 61%. No Brasil, as taxas de

mortalidade continuam elevadas muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária, a incidência cresce rápida e progressivamente (Brasil, 2018). Além disso, o câncer de mama possui alto potencial metastático, se espalhando para outras partes do corpo a partir de em média três anos do diagnóstico inicial, e tumores secundários reaparecem, dez anos ou mais após o surgimento do tumor primário (ALI, 2003).

Múltiplos fatores estão envolvidos na etiologia do câncer de mama como idade da primeira menstruação menor do que 12 anos, menopausa após os 55 anos, mulheres que nunca engravidaram ou nunca tiveram filhos (nuliparidade), primeira gravidez após os 30 anos, uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, especialmente se por tempo prolongado e predisposição genética (pelas mutações em determinados genes transmitidos na herança genética familiar. Alterações genéticas hereditárias decorrentes de mutações na linhagem germinativa correspondem a 5-10% dos chamados cânceres de mama hereditários. Por volta de 70% dos tumores da mama decorrem de alterações genéticas somáticas que surgem de forma esporádica e aleatória como consequência da interação do genoma com o meio através da exposição à radiação solar, tabagismo, álcool, medicamentos, hábitos alimentares, hábitos sexuais ou por uma multicasualidade culminando na transformação de uma célula normal em uma célula tumoral (Sun et al., 2017; Cedolini et al., 2014; American Cancer Society, 2017; Brasil 2017,2018).

### **1.1.1. Prevenção e tratamento**

A prevenção do câncer de mama está relacionada com controle dos fatores de risco. Estima-se que por meio da alimentação, nutrição e atividade física é possível reduzir em até 28% o risco de a mulher desenvolver câncer de mama. Controlar o peso corporal e evitar a obesidade, por meio da alimentação saudável e da prática regular de exercícios físicos, e evitar o consumo de bebidas alcoólicas são recomendações básicas para prevenir o câncer de mama. A amamentação também é considerada um fator protetor (Klemp, 2015).

Os principais desafios em torno da administração dos atuais tratamentos anticâncer são a toxicidade sistêmica associada a sérios efeitos colaterais

devido à falta de especificidade, a resistência terapêutica que células tumorais adquirem pelo uso de quimioterápicos em estágios iniciais da doença que reduzem as opções de tratamento para a doença metastática tardia e a presença de células tumorais com diferentes fenótipos e habilidades proliferativas coexistindo no tumor gerando heterogeneidade e seleção de clones resistentes (Arnedos *et al.*, 2012).

Os tratamentos disponíveis para o câncer de mama levam em consideração o tipo molecular e morfológico, tamanho e grau de diferenciação do tumor, além de idade do paciente. São eles: cirurgia, hormonioterapia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia. Entretanto, os tratamentos convencionais não são seletivos e exclusivos às células tumorais atingindo também células saudáveis o que, além de gerar efeitos colaterais desconfortáveis ao paciente, culminam em tratamentos que não são totalmente eficazes (Nounou *et al.*, 2015).

### **1.1.2. Classificação histológica**

Trata-se de uma doença complexa devido ao grau de heterogeneidade. Isso se deve ao fato de existirem diferentes subtipos moleculares e morfológicos de carcinoma de mama além da individualidade de cada paciente quanto à bagagem genética e hábitos diários exigindo uma terapêutica específica. Com o avanço das pesquisas, perfis moleculares associados ao prognóstico da doença tornaram-se viáveis. Essa subdivisão do câncer de mama em subtipos moleculares foi incorporada à prática sendo, atualmente, recomendada pela ASCO (American Society of Clinical Oncology) e CAP (College of American Pathologists). Os subtipos moleculares dos tumores de mama são luminais A e B, HER2 e triplo negativos (Perou *et al.*, 2000; Eliyatkin, Yalçın, Zengel, Aktaş, & Vardar, 2015). Os métodos utilizados para essa caracterização molecular das neoplasias mamárias incluem a avaliação por imunohistoquímica do status dos receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e do receptor HER2 (Rutgers *et al.*, 2013).

Dentre os subtipos morfológicos do câncer de mama, o carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum perfazendo um total de 80% de todos os casos de câncer de mama. Neste subtipo, um câncer que se inicia nos ductos de leite é

capaz de invadir e se espalhar pelos tecidos mamários circundantes. Inicialmente, é assintomático, sendo na maioria das vezes detectado por alterações na mamografia ou pelo aparecimento de um nódulo palpável no tecido mamário. O segundo subtipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma lobular invasivo, que se origina nos lóbulos produtores de leite, podendo invadir e se espalhar pelos tecidos adjacentes, conforme demonstrado na figura. Perfaz um total de 10% dos casos de câncer de mama e tende a ocorrer em mulheres mais velhas do que aquelas acometidas pelo carcinoma ductal invasivo (Merdad *et al.*, 2014) como mostra a figura 1.

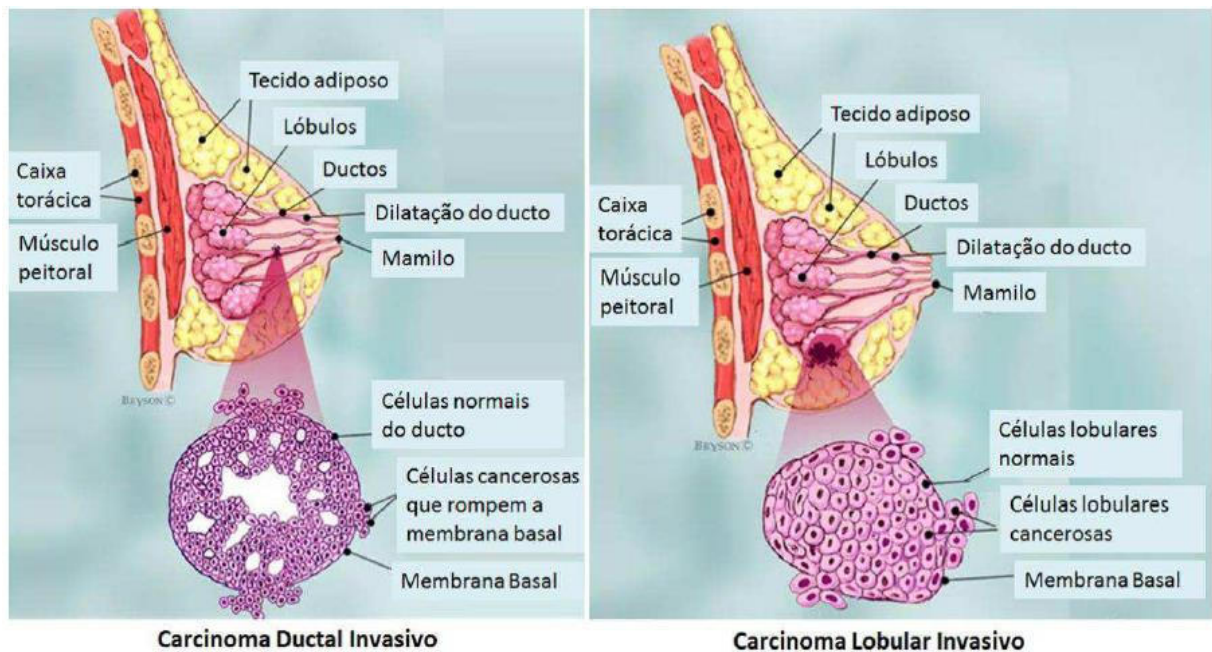


Figura 1: Desenho esquemático mostrando o carcinoma mamário ductal invasivo e lobular invasivo (breastcancer.org).

O câncer de mama utilizado neste estudo é do tipo triplo negativo (TNBC) caracterizado pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e fator de crescimento epidérmico 2 (HER2). Isso significa que esse subtipo de tumor não é sustentado pelos hormônios supracitados. Trata-se de do subgrupo mais grave já que as terapias hormonais disponíveis como Tamoxifeno, inibidores de aromatase, ou terapias direcionadas aos receptores HER2 como o Trastuzumab não conseguem retardar sua progressão.

Além disso, podem apresentar maior risco de recaída e taxa de mortalidade mais elevada quando comparados aos outros subtipos de câncer de mama (Beech, 2014; Anders, Abramson, Tan, & Dent, 2016) e possuem uma propensão à metástase pulmonar, cerebral mais que ossos e linfonodos, dificultando ainda mais o tratamento em relação aos outros subtipos (Beasley and Toms, 2011).

O TNBC é caracterizado pela recorrência da doença entre o primeiro e terceiro ano depois do diagnóstico, recaídas até 8-10 anos depois e metástases mais agressivas que os outros subtipos de câncer de mama (Criscitiello *et al.*, 2012; Niikura *et al.*, 2014).

Terapias usadas para o TNBCs são a cirurgia para retirada do tumor primário, radioterapia e quimioterapia. O uso de anticorpos monoclonais são uma tentativa de tornar o tratamento mais específico como os inibidores de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) chamado Bevacizumab que impedem sua interação com receptores nos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, a angiogênese e o Cetuximab que se liga ao EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) superexpresso em TNBC bloqueando o estímulo para o crescimento tumoral (Corkery, Crown, Clynes, & O'Donovan, 2009; Nakai, Hung, & Yamaguchi, 2016).

Aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama são do subtipo triplo negativo, em que, a maioria é classificada como carcinoma ductal invasivo. Seu diagnóstico não é eficaz pelo exame de mamografia devido a ausência de calcificação (Schmadeka, Harmon and Singh, 2014). Diante disso, se faz necessária a identificação de novos alvos moleculares para melhorar o tratamento e sobrevivência de pacientes com esse subtipo de câncer de mama (Schmadeka, Harmon and Singh, 2014).

## **1.2. Metástase**

A maior causa de morte por câncer de mama não é devido ao tumor primário em si, mas sim pela formação de sítios secundários devido ao processo metastático em 90% dos casos (Perret and Cre, 2008; Scully *et al.*, 2012).

A metástase é um processo complexo resultante de interações entre as células tumorais e células do microambiente tecidual como células endoteliais,

fibroblastos e macrófagos. Durante a disseminação de um tumor, as células tumorais são capazes de evadir à resposta imune de células TCD8 e Natural Killer (NK) se desprendendo do tumor primário e escapando do tecido de origem. Para isso, elas sofrem mudanças na sua expressão gênica tornando-se capazes de aderir a matriz extracelular (MEC), degradá-la e migrar localmente. Como durante esse processo as células devem perder suas adesões célula-célula e célula-MEC, proteínas de adesão celular são de extrema importância tais como caderinas, integrinas e selectinas (Wolf and Friedl, 2006; Alizadeh, Shiri and Farsinejad, 2014).

Em seguida, as células sofrem mudanças em seu citoesqueleto para que seja possível ocorrer a migração. Se a migração ocorrer de forma individual, as células perdem o contato com as células do tumor primário e se ocorrer de forma coletiva, migram em conjunto sem perder as adesões célula-célula. Durante a migração individual, as células perdem suas características epiteliais e adquirem características mesenquimais, este processo é denominado transição epitelial-mesenquimal (EMT) (Alizadeh, Shiri and Farsinejad, 2014).

Na migração coletiva, as células requerem força para migrar e uma célula será responsável por liderar esta migração. Além dessas duas formas de migração, ainda existe a migração ameboide que não requer a degradação da MEC por meio de proteases como as metaloproteinases de matriz (MMPs). Neste tipo de migração, as células perdem sua polaridade e migram rapidamente. As outras formas de migração requerem a atividade de MMPs (Yilmaz, Christofori, & Lehenbre, 2007; Alizadeh et al., 2014).

A partir daí, ocorrerá o intravasamento de células tumorais para vasos linfáticos ou sanguíneos para atingir seus sítios secundários após a travessia da membrana basal. Este é um passo limitante da metástase, pois é nele que ocorre a regulação de quantas células tumorais irão circular na corrente sanguínea e conseqüentemente popular os tumores secundários. O intravasamento nos vasos, sejam linfáticos ou sanguíneos, é conhecido como transmigração endotelial. Para que isso ocorra, as células devem sofrer mudanças drásticas no seu citoesqueleto, morfologia celular e quebrar as ligações com a matriz e/ou células tumorais (Alizadeh, Shiri, Farsinejad, 2014; Geiger, Peeper, 2009). Esse passo também é limitante, pois uma vez que as células entram na circulação sanguínea, estas sofrem um grande estresse podendo acarretar sua morte,

porém as plaquetas presentes na circulação possuem um papel protetor em conjunto com o fibrinogênio, atuando como um escudo ao impedir que essas células sejam atacadas pelo sistema imune (Coupland, Parish, 2014).

Para que as células tumorais cheguem ao sítio secundário onde irão formar as metástases, é preciso que extravasem a corrente sanguínea ou linfática. Para isso, as células devem atravessar o endotélio da vasculatura, invadir o tecido adjacente e se estabelecer neste novo ambiente. Uma das hipóteses que tentam explicar como se dará a nova localização das células tumorais no sítio secundário é a teoria do “seed and soil” proposta por Stephen Paget em 1889, a qual pressupõe que as células tumorais (seed) só se desenvolverão em locais propícios para seu estabelecimento (soil) (Mendonza, Khanna, 2009).

Atualmente, sabe-se que as células tumorais realmente possuem uma propensão a metastatizar para órgãos específicos, e isso ocorre devido a formação do nicho pré-metastático que se inicia com a chegada de células hematopoiéticas da medula óssea que expressam receptores de fatores de crescimento endoteliais como o VEGFR-1 e precedem a chegada das células tumorais a sítios distantes do tumor primário. Há um aumento de expressão de fatores de crescimento no local e esses eventos em conjunto resultam na formação do nicho pré-metastático, em que células não neoplásicas marcam o futuro sítio metastático das células tumorais (Peinado, Lavotshkin, Lyden, 2011).



Por fim, quando as células tumorais atingem seu sítio secundário, estas podem entrar num estágio de dormência quando há inibidores de angiogênese e permanecer dessa forma por longos períodos de tempo. O final da fase de dormência está altamente relacionado a formação de novos vasos conhecido como “angiogenic switch”. Ainda, esta fase pode não ocorrer e as células entram num processo de colonização deste novo ambiente e estabelecimento da metástase. Portanto, para estas células escaparem da dormência deve haver um balanço angiogênico positivo nos tumores (Alizadeh, Shiri, Farsinejad, 2014; Geiger, Peeper, 2009; Pollard et al., 2009). As etapas do processo metastático estão representadas na figura 2.

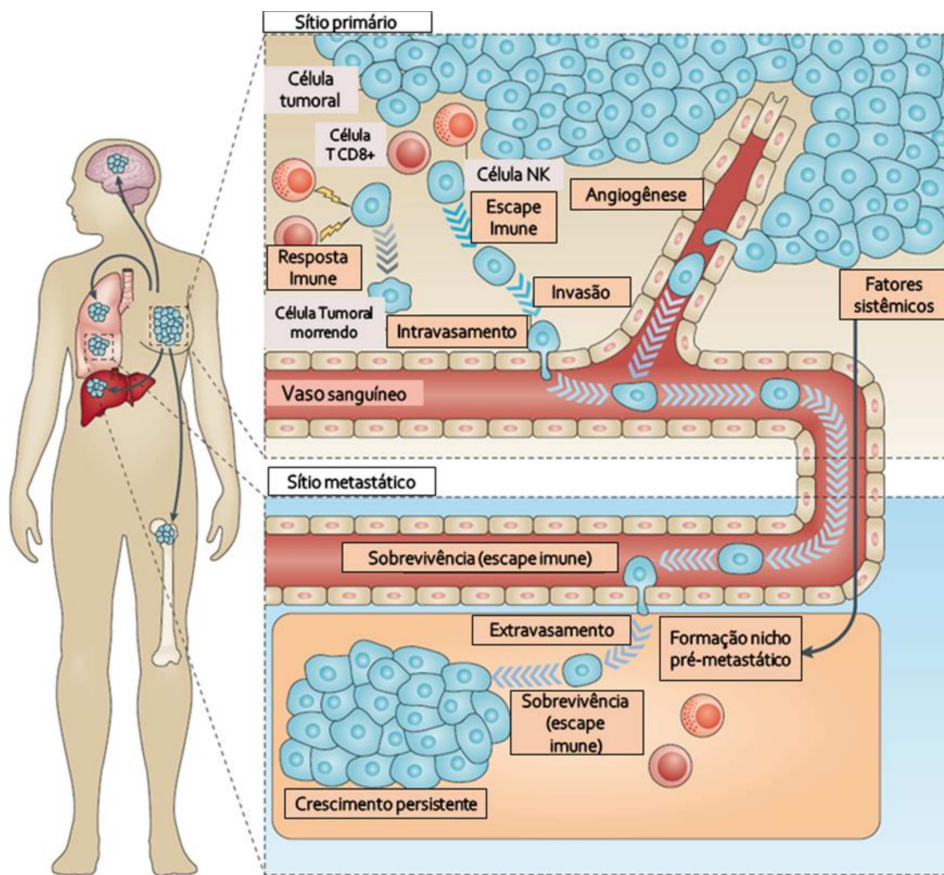


Figura 2: Desenvolvimento de metástases em tumores (Adaptado de Kitamura, Qian, & Pollard, 2015).

Além dos fatores descritos para o processo metastático, o microambiente tumoral e o sistema imunológico são de grande importância atuando com células que participam da carcinogênese e metástase (Mendonza, Khanna, 2009). Células do sistema imune como os macrófagos associados ao tumor (TAMs)

auxiliam as células tumorais na invasão e no comportamento migratório secretando MMPs que corroboram para este processo (Eckhardt et al., 2005, 2012).

Para resumir a complexidade presente na formação de neoplasias e, por conseguinte, na formação de metástases, Hanahan e Weinberg definiram algumas características do câncer que permitem e contribuem para que todo esse processo ocorra e as denominaram de *Hallmarks* do câncer. Os *hallmarks* são: auto-suficiência quanto a fatores de crescimento, não resposta a fatores inibitórios de proliferação, evasão a apoptose, alto potencial de replicação, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase como mostra a figura 3. (Hanahan, Weinberg, 2000; 2011).

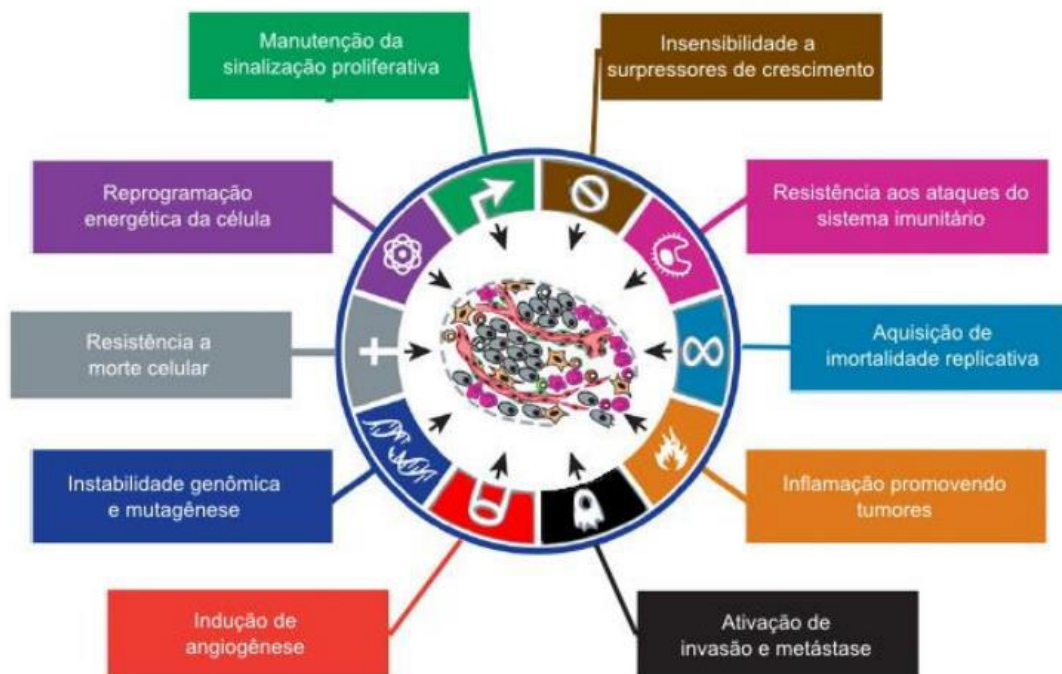


Figura 3: Características fenotípicas adquiridas por uma célula durante os processos de transformação celular e progressão tumoral (adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).

Câncer de mama metastático é aquele em que as células tumorais saem do sítio primário e se espalham para outras partes do corpo como pulmão, fígado, cérebro e ossos. (Kitamura, Qian & Pollard, 2005). Os sintomas das metástases variam de acordo com sua localização. Nos ossos, o sintoma mais comum é uma dor repentina e perceptível que pode ocorrer em qualquer osso, mas, ocorre frequentemente nas costelas, coluna vertebral, pélvis, ou os ossos longos nos

braços e pernas. A metástase pulmonar costuma não causar sintomas, quando estes ocorrem, causam dor ou desconforto na região pulmonar, falta de ar ou tosse persistente. No cérebro, os sintomas são dores de cabeça, mudanças na fala ou visão ou problemas de memória. A metástase no fígado frequentemente é assintomática, mas pode causar dor ou desconforto na região, fadiga e fraqueza, perda de peso, falta de apetite ou febre (breastcancer.org).

A metástase óssea é a mais frequente no câncer de mama e, embora acarrete considerável morbidade e redução da qualidade de vida, oferece em geral, sobrevida longa ao paciente (Solomayer, 2000). Estudos mostraram que o uso de bifosfonados (Mundy, 2002; Hillner, 2003) e, mais recentemente, de anticorpos monoclonais (Martin, 2012) reduz as complicações esqueléticas associadas à metástase óssea, apresentando melhores resultados se iniciados precocemente e mantidos por tempo prolongado.

Por outro lado, as mulheres com metástase extraóssea, como em pulmão, fígado e sistema nervoso central (SNC), apresentam prognóstico menos favorável em relação às pacientes com metástase óssea isolada (Solomayer, 2000; Insa, 1999; Chang, 2003; Largillier, 2008). Além disso, a sobrevida dos pacientes com metástase óssea e que também desenvolvem metástase extraóssea, é em geral, determinada por este último evento (Coleman, 1998).

Ao contrário do que sugeriam os primeiros modelos de câncer metastático, segundo os quais a disseminação do tumor ocorria em estágios tardios da carcinogênese, os estudos mais recentes mostram que a metástase se dá de forma mais precoce durante a progressão do tumor mesmo nos pacientes diagnosticadas em estágios iniciais, justificando a necessidade de mais estudos da doença metastática nesses pacientes (Freudenberg, 2009; Chaffer, 2011).

### **1.3. Metaloproteínas de matriz**

A migração de células tumorais configura-se como a etapa mais importante para a progressão e disseminação tumoral. Para que ocorram migração de células tumorais, barreiras físicas precisam ser rompidas tais como membrana basal endotelial que permitem a disseminação de células tumorais via sangue ou linfa e proteínas da matriz extracelular precisam ser degradadas.

Neste sentido, diversas enzimas proteolíticas como as plasminas, catepsinas e as metaloproteinases de matriz (MMPs) tem função de degradação da matriz extracelular (Hsiao, 2013). Portanto, a superexpressão de MMPs está associada com o fenótipo tumoral maligno já que estas contribuem para a degradação de proteínas da matriz extracelular e da membrana basal que favorecem a migração de células tumorais (Davies, 2014; Kessenbrock, Plaks, & Werb, 2010; Merdad, 2014).

A matriz extracelular (MEC) se caracteriza por um agrupamento de elementos intercelulares como glicosaminoglicanas (polissacarídeos), proteoglicanas (complexos glicoproteicos), proteínas estruturais (fibras colágenas), proteínas adesivas (fibronectina), etc. Nos tecidos conjuntivos, as células se encontram dispersas na MEC que possui diversas funções tais como proteção física, interação entre diversos tipos celulares e liberação de sinais de sobrevivência e de diferenciação celular. (Kessenbrock, Plaks and Werb, 2010; Oskarsson, 2013). No microambiente tumoral, o papel da matriz extracelular não está limitado somente a atuar como barreira física à neoplasia, mas funciona como um reservatório para proteínas ligantes e fatores de crescimento que influenciam o comportamento do mesmo. (DeClerck *et al.*, 2004).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependentes de zinco para sua atividade que é composta por 24 genes em humanos, sintetizadas como zimogênios inativos (PRO-MMP). Entre esses genes, há diferentes tipos de metaloproteinases de matriz (MMP): proteinases secretadas e proteinases do tipo membrana (MT-MMP). (Sternlicht and Werb, 2001).

Com base em seu substrato de degradação, as MMPs são divididas em collagenases (MMP-1, -8 e -13) que degradam colágeno intersticial tipos I, II, III, além de digerirem outras moléculas da MEC; gelatinases (MMP-2 e -9) degradam principalmente colágeno desnaturado – gelatinas – colágeno tipo IV e lamininas; estromelisinases (MMP-3, -10 e -11) degradam fibronectinas e proteoglicanas; matrilisinas (MMP-7 e -26) digerem diversos componentes da matriz extracelular como fibronectina e colágeno tipo IV; enamelisinas (MMP-20) e metaloproteinases do tipo membrana (MMP-14 a 17, MMP-24 e -25) degradam

diferentes componentes da MEC como mostra a tabela 1 e outras (MMP-19,-21, -23, -27 e -28) (Egeblad & Werb, 2002; Merdad, 2014).

As colagenases, incluindo MMPs 1, 5 e 13 catalisam a degradação de formas fibrilares de colágeno I, II e III. As gelatinases como MMP 2 e 9, são colagenases do tipo IV, abundante em membranas basais, que degradam gelatina (colágeno desnaturado) e os tipos V, VII, IX e X. As estromelinas, exemplificadas por MMP 3, 7, 10 e 11 catalisam a reação de diversas substâncias diferentes como os proteoglicanos, lamininas e fibronectinas. (Lebeau *et al.*, 1999). Por fim, as metaloproteinases do tipo membrana, como MMPs 14, 15 e 16 possuem atividade proteolítica relacionada com a migração de maneira em que a expressão de MT-MMP está associada com células malignas invasivas (Remacle *et al.*, 2013).

A estrutura de todas as MMPs é semelhante com a presença de pelo menos 2 domínios conservados: o pró-domínio que contém três regiões: uma localização amino-terminal (Pre), um pró-domínio (Pro) contendo um grupo tiol (SH) e o domínio catalítico, sendo este o segmento ativo que apresenta o íon Zinco em sua estrutura, necessário para a conversão da forma latente/ pró-enzima para a forma ativa/catalítica, mediante interação com resíduos de cisteína do pró- domínio e sua consequente ruptura (Parks, 2004). A maioria das MMPs possuem uma região semelhante a hemopexina, um domínio constituído por quatro repetições que contêm uma ponte de dissulfeto (SS) entre o primeiro e o último subdomínio, que está ligada ao domínio catalítico (Kessenbrock, Plaks and Werb, 2010) como mostra a figura 4. Portanto, as MMPs são excretadas como uma pró-enzima inativa que sofrem ativação após clivagem por diferentes tipos de proteases extracelulares (Klein & Bischoff, 2011).

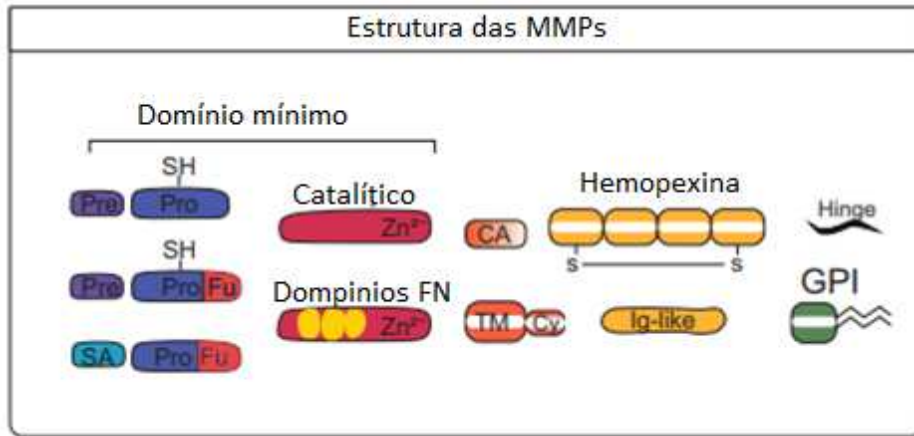


Figura 4: Estrutura das metaloproteinases de matriz (MMPs). (Adaptado de KESSENBROCK, 2010).

As metaloproteinases de matriz do tipo membrana (MT-MMP) são ligadas de forma covalente à membrana extracelular e as proteases secretadas (MMP) podem, também, estar localizadas na superfície celular por meio da ligação por integrinas ou por meio de interações da superfície celular associados com colágeno tipo IV, proteoglicanos, laminina e fibronectina (Yu and Stamenkovic, 1999; Yu *et al.*, 2002).

Diversos sinais regulatórios, como fatores solúveis, interações da matriz extracelular com células (MEC) ou contatos célula-célula (células) interagem com receptores específicos na superfície celular e iniciam uma cascata de eventos que levam à geração de MMPs funcionais, localizadas na superfície celular (MT-MMPs) ou secretada para o meio extracelular (pro-MMP) como na figura 5. Além disso, esses mecanismos atuam de forma coordenada para que a atividade das enzimas proteolíticas ocorra apenas quando necessário. Há um controle transcricional na expressão de MMPs por meio de citocinas como IL-4 e IL-10, fatores de crescimento como EGF, FGF e TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ 1. No entanto, diante de sinais regulatórios desregulados, os tumores malignos são capazes

também de gerar atividade proteolítica descontrolada (Overall & López-Otín, 2002).

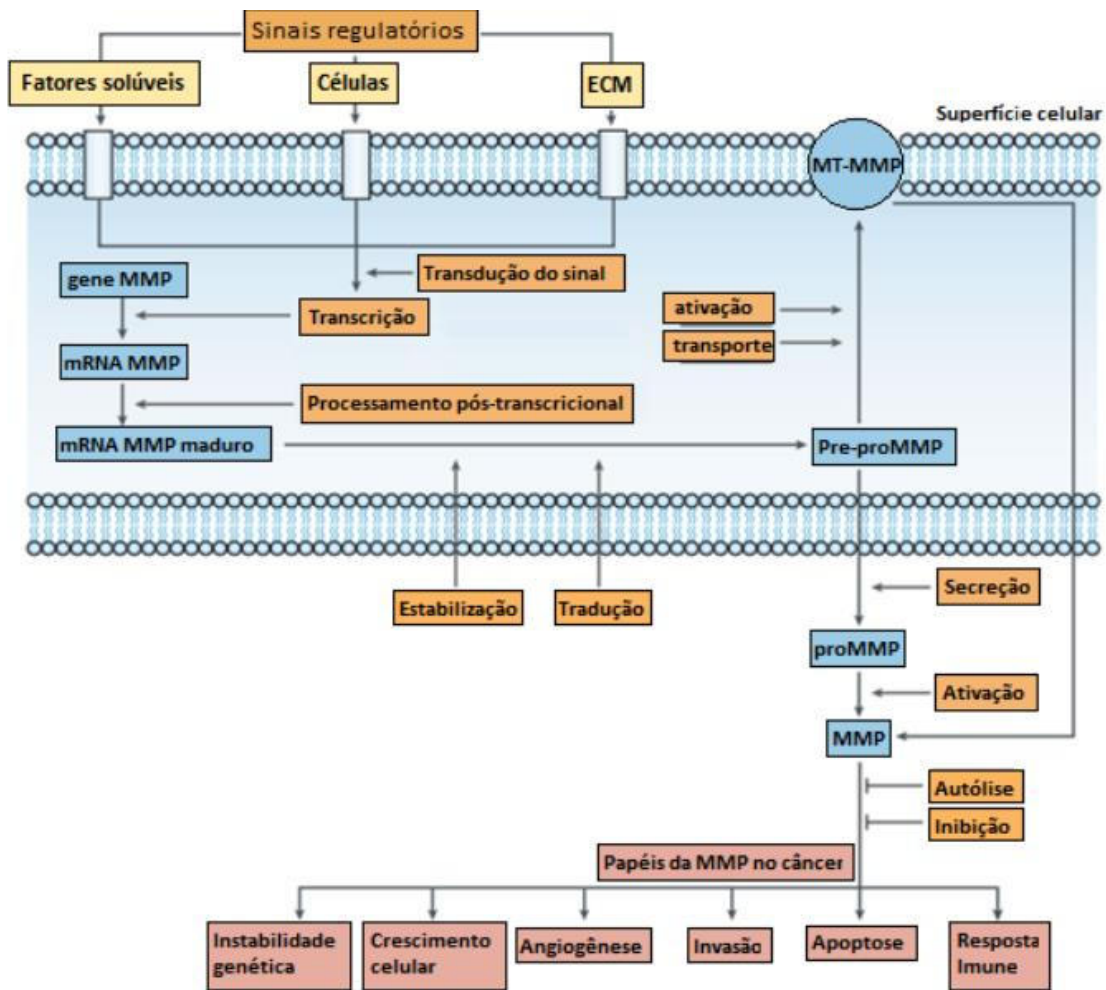


Figura 5: Atividade de metaloproteinases na invasão tecidual, angiogênese e metástase tumoral (Adaptado de KESSENBROCK, 2010).

Os níveis de MMPs em tecidos saudáveis são baixos participando de eventos importantes como: embriogênese, reparo ósseo normal, ovulação e cicatrização. São secretadas por neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células dendríticas e células progenitoras hematopoiéticas como pró-enzimas, zimogênios, que posteriormente serão ativadas. Para que ocorra regulação de metaloproteinases no estroma não tumoral, é imprescindível que haja inibidores das MMPs como os inibidores teciduais específicos como o TIMP 1, 2, 3 e 4 sendo capazes de inibir a atividade de proteases por meio da ligação não covalente de alta afinidade com MMPs

ativas (Davies, 2014), e RECK cuja forma de ação ainda não está totalmente esclarecida (Figueira *et al.*, 2009).

Os inibidores são produzidos pelos mesmos tipos celulares que produzem as MMPs e estão normalmente no estroma não tumoral para regular a expressão de MMPs. Especificamente, no microambiente tumoral, sabe-se que a atividade aumentada de MMPs está associada às fases de crescimento do tumor, invasão, metástases e angiogênese, tendo uma superexpressão em diferentes cânceres. As metaloproteínas de matriz regulam também uma variedade de processos de sinalização do microambiente tumoral e o estroma de acordo com a figura 6 (Vizoso *et al.*, 2007; Kessenbrock *et al.*, 2010).

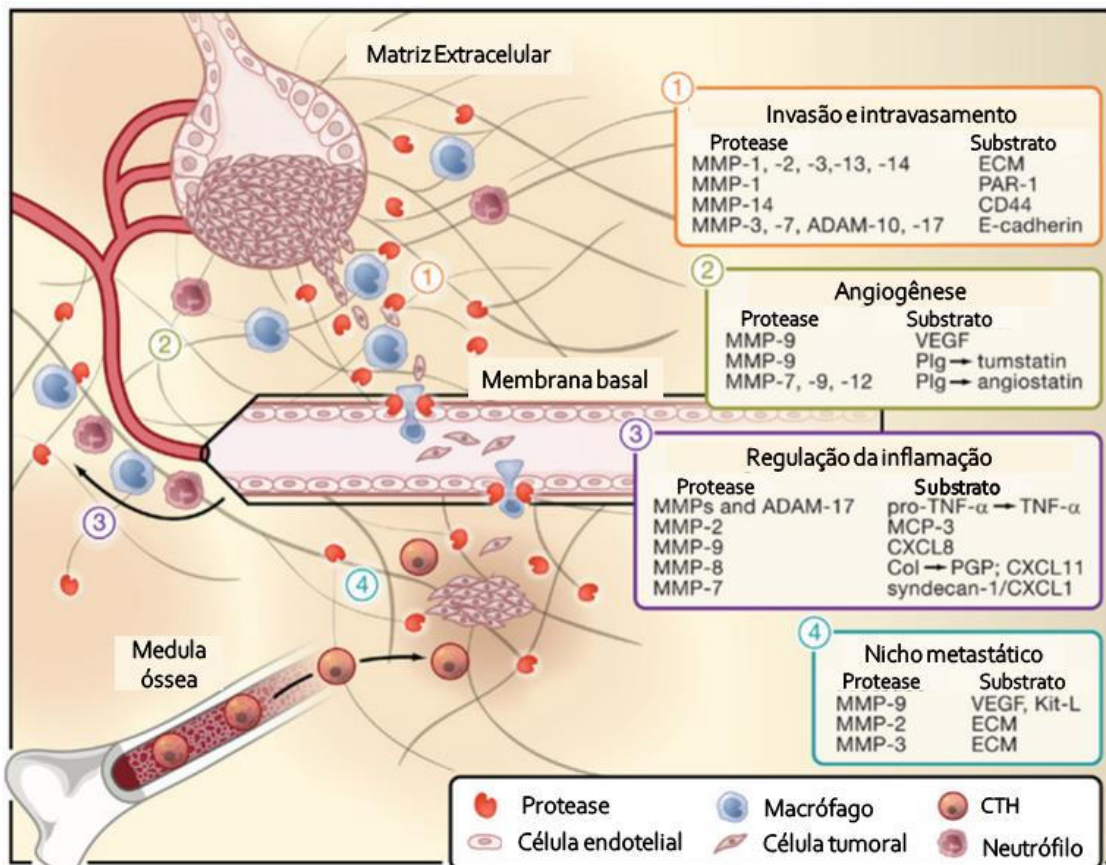


Figura 6: Atividade de metaloproteínas na invasão tecidual, angiogênese e metástase tumoral (Adaptado de KESSENBROCK, 2010). Proteases e substratos envolvidos em etapas de progressão tumoral: 1- Invasão e Intravasamento; 2- Angiogênese; 3- Regulação e Inflamação; 4- Nicho metastático.



O desenvolvimento de uma massa tumoral está, portanto, fortemente relacionada com fatores como as MMPs, que possibilitam não somente sua progressão, mas fornecem os sinais necessários para sua manutenção. Sabe-se que MMPs são superexpressas em diversos tipos de cânceres e sua expressão está associada com variados aspectos vitais da doença como progressão, proliferação, invasão, transformação celular epitelial para mesenquimal, metástases e angiogênese como mostrado na figura 7 (Kessenbrock, Plaks and Werb, 2010).

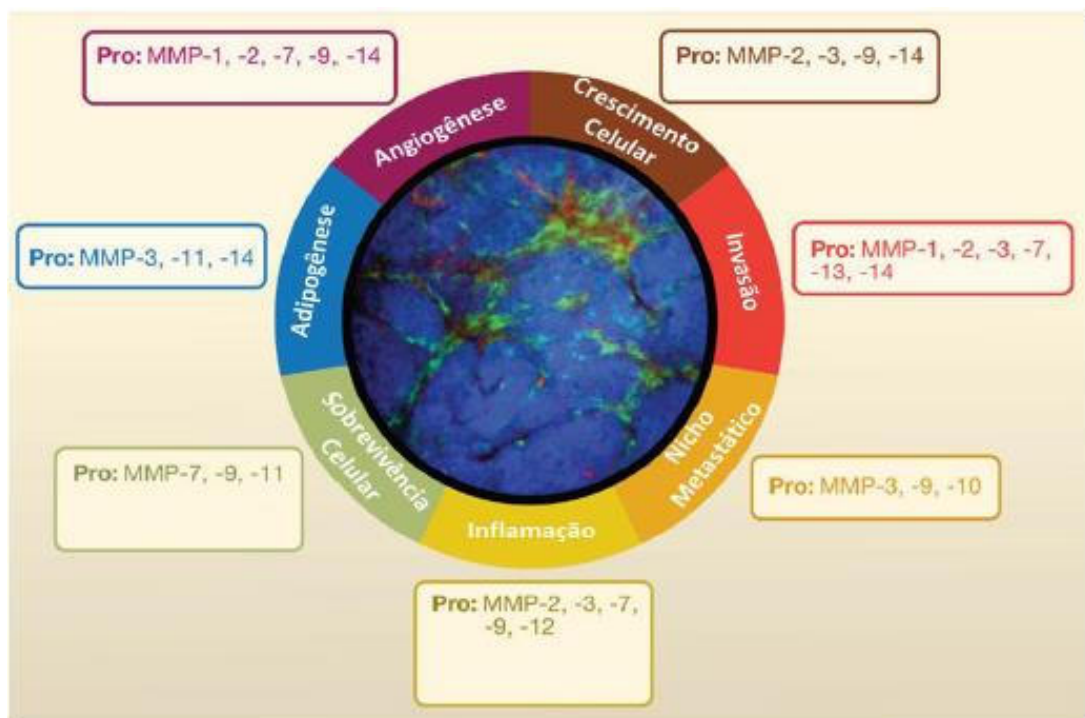


Figura 7: A progressão tumoral e a atuação de metaloproteinases de matriz (Adaptado de KESSENBROCK, 2010).

No câncer de mama, diversos trabalhos mostraram a atuação das MMPs (2, 7, 9, 10, 11, 13, 14 e 15) nos processos de invasão, progressão e metástase (Bensona, 2013; Kohrmann, 2009; Eiseler, 2009; Mark & Sternlicht, 2000; Pivetta, 2011; Chabottaux, 2006; Surowiak, 2001).

Resultados preliminares de nosso grupo de pesquisa analisando a expressão de metaloproteinases de matriz e seus inibidores em modelo murino de câncer de mama e obesidade indicam que houve superexpressão das MMPs 9 e 13 no tecido tumoral por meio de análise imunohistoquímica.

A metaloproteinase de matriz 9 (gelatinase B, collagenase do tipo IV de 92-kDa) foi inicialmente descoberta em 1974 em neutrófilos (Sopata & Dancewicz, 1974). A ativação de MMP9 pode ser mediada por modificações no domínio serina ou por resposta direta ao estresse oxidativo que altera o domínio cisteína (Klein & Bischoff, 2011). Sua atividade é regulada por diferentes estímulos bioquímicos como fatores de crescimento e citocinas cuja expressão parece modular vias de sinalização intracelulares (Stuelten, 2005).

A MMP9 tem sido descrita como participante dos processos carcinogênicos incluindo os de mama com papel crucial nos processos de progressão tumoral atuando sobre os componentes da membrana basal que representa a primeira estrutura a ser degradada por enzimas proteolíticas durante o processo de migração celular.

Hanemaaijer, 2000, demonstraram que em amostras humanas a atividade total de MMP9 estava significativamente aumentada em tumores de mama malignos em relação a amostras de tumores de mama benignos. Somiari, 2006 e Wu, 2008, constataram aumento nos níveis séricos de MMP9 em pacientes com câncer de mama metastático quando comparados a pacientes com a doença benigna. Sabe-se que gelatinases estão envolvidas no processo de neovascularização permitindo a degradação proteolítica da membrana basal vascular, abrindo o caminho para migração de células endoteliais (Klein & Bischoff, 2011). Comparando cânceres metastáticos e não-metastáticos, Bernhard, 1996 verificou que a transfecção de MMP9 conferiu capacidade de metástase às células não-metastáticas. Em adição, em modelo de sarcoma em ratos, Hua & Umschel, 1994 verificaram que a inibição da expressão da MMP-9 reduziu a capacidade de metástase. Desta maneira, os estudos relacionaram o aumento dos níveis de MMP-9 com a elevação do potencial de metástase.

A metaloproteinase de matriz 13 (colagenase 3; 48kDa), é a mais recente collagenase descrita. Sua expressão pode ser influenciada por hormônios, citocinas, fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II, fator de crescimento derivado de plaquetas, crescimento básico de fibroblastos, fator de crescimento transformador  $\beta$ 1, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  (Leeman, 2002; Balbin, 1999). Portanto, a expressão de MMPs é beneficiada pelo microambiente inflamatório gerado pelo tumor.

A MMP13 pode ser ativada por auto-proteólise ou pela remoção de peptídeos por outras MMPs como a MMP4 e MMP2. Quando ativa, a MMP13 faz parte da via de ativação de outras MMPs (Barmina, 1999). Na MEC, MMP13 degrada preferencialmente colágeno tipo II, mas também é capaz de degradar outros tipos de proteínas da matriz como colágeno tipo IV, X e XIV e fibrilinas (Ashworth, 1999).

A participação de MMP13 tem sido descrita em vários tipos de câncer metastáticos incluindo o câncer de mama sugerindo que, em todos esses casos, a alta expressão de MMP13 está associada com tumores mais agressivos (Klein & Bischoff, 2011; Pendas, 2000; Balbin, 1999; Corte, 2005; Luukkaa, 2006). Zhang, 2008, demonstraram superexpressão de MMP13 em amostras de pacientes com câncer de mama metastático. Em um estudo *in vitro* de câncer de mama, Pivetta, et al., 2011 demonstraram que a MMP-13 é capaz de ativar metástases ósseas em câncer de mama.

Além do potencial biomarcador tumoral, as metaloproteinases em destaque podem estimular novas abordagens terapêuticas para o câncer de mama.

#### **1.4. RNA de interferência**

A interferência por RNA é um processo conservado na evolução das espécies que ocorre naturalmente em células de eucariontes para que a expressão de genes seja controlada em nível pós-transcricional. O RNA de interferência (RNAi) é uma molécula de RNA de fita dupla capaz de bloquear a síntese de proteínas ao se ligar ao RNAm alvo e degradá-lo. O RNAi possui sequências específicas, que se ligam apenas a um RNAm específico, impedindo a produção de uma proteína determinada. A compreensão desse mecanismo se deu em 1998 pelos pesquisadores norte-americanos Andrew Z. Fire e Craig C. Mello ao observarem a interferência de um RNA de dupla fita exógeno em nematódeos do gênero *Caenorhabditis elegans* (Agrawal, et al., 2003; Fire, Mello et al., 1998).

O mecanismo que ocorre naturalmente nas células inicia-se com a expressão de RNA de interferência em fita dupla, que é clivado no citoplasma em fragmentos de 21-23 nucleotídeos pela enzima Dicer. Tais fragmentos são

conhecidos como short interfering RNA (siRNA), também constituídos de duas fitas. Estes siRNAs associam-se a proteínas citoplasmáticas, formando um complexo denominado RISC. Uma enzima presente no complexo protéico RISC abre a fita dupla do siRNA, libera a fita sense e acopla-se apenas à fita antisense, cujo o papel é guiar todo o complexo até o RNAm. A fita antisense anela-se à sequência alvo complementar no RNAm e o mecanismo de degradação é ativado, ocorrendo assim, o silenciamento pós-transcricional da expressão gênica (Singh, Trivedi and Jain, 2018).

Experimentalmente, pode-se mimetizar o processo biológico de RNAi mediante o uso de moléculas curtas de RNA fita dupla, conhecidas como siRNAs sintéticos. Nestas estruturas sintéticas, a fita antisense possui sequência nucleotídica totalmente complementar à sequência alvo do RNAm (Conde, 2015). A indução do mecanismo de RNAi mediado por siRNAs sintéticos é ilustrado na Figura 8. Assim, o uso de siRNAs sintéticos - que agem como silenciadores gênicos - tem se destacado em estudos científicos sobre papéis de genes na biologia celular e no processo saúde-doença, bem como na busca de potenciais alvos terapêuticos (Whitehead, Langer and Anderson, 2009).

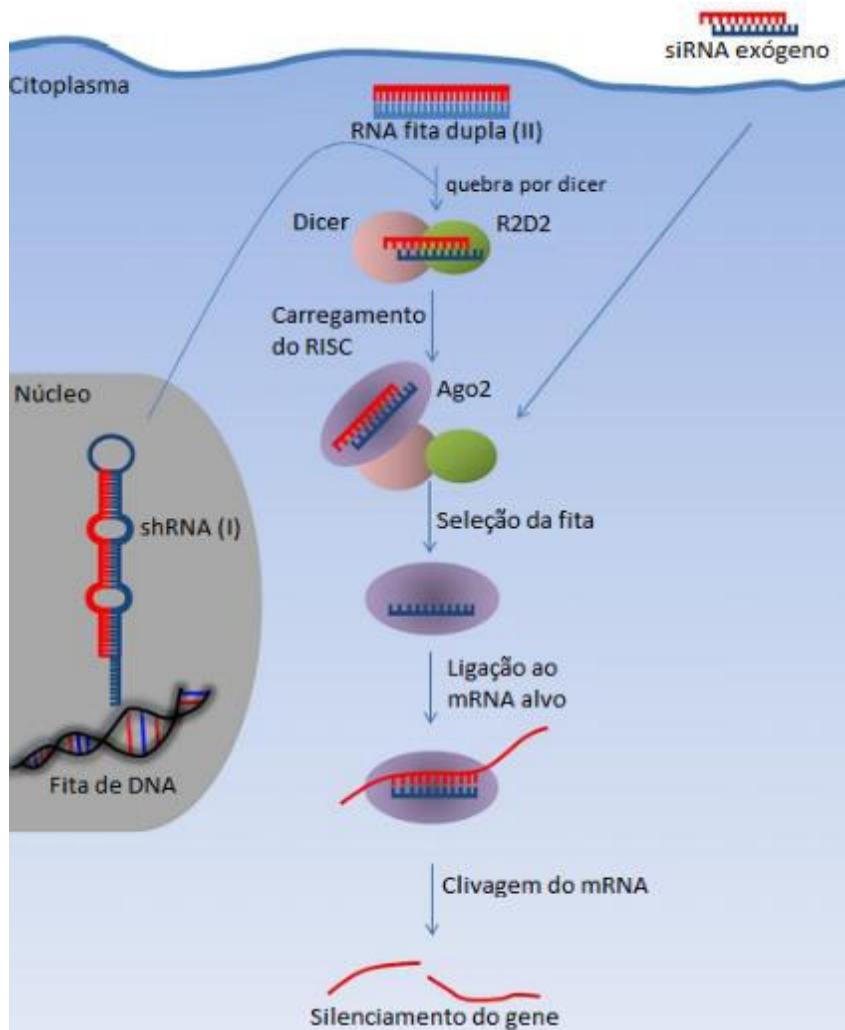


Figura 8: Mecanismo de interferência de RNA (RNAi) por short interfering RNA (siRNA). (Adaptado de Conde, 2015).

O emprego do RNAi como abordagem terapêutica tem sido considerado uma estratégia promissora no combate a doenças em que a expressão anormal de certos genes pode ser identificada como a causa ou fator contribuinte. Entre essas doenças podemos citar, além do câncer, doenças metabólicas, cardiovasculares, doenças autoimunes e infecções virais (Kim & Rossi, 2008). No campo da oncologia, trata-se de uma abordagem interessante dado a possibilidade de silenciamento de oncogenes envolvidos na proliferação, sobrevivência, angiogênese, metástase, supressão de apoptose ou resistência a drogas (Verma *et al.*, 2015).

Tendo como base o uso de RNAi para terapias, ao menos 22 medicamentos baseados em RNAi para várias doenças estão em diferentes etapas de ensaios clínicos e outros diversos em desenvolvimento. Para câncer,

há testes para os seguintes alvos: VEGF, KSP, EphA2, PKN3, RRM2 e PKL1. Outras doenças como infecção por Ebola, infecções de vírus sinciciais respiratórios, hipercolesterolemia, insuficiência renal entre outras estão também em diferentes estágios de testes clínicos.(Kanasty *et al.*, 2013).

Em meados de 2018, a Food and Drug Administration dos EUA aprovou o primeiro medicamento baseado em RNAi, chamado Patisiran (Onpattro). Trata-se de um medicamento para a doença Amiloidose transtirretina hereditária (amiloidose ATTRh), uma polineuropatia que produz uma forma alterada de transtirretina.

Devido ao potencial de MMPs em contribuir para aos processos de progressão tumoral, algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de silenciá-las por RNA de interferência. Alguns estudos com RNAi vem demonstrando que algumas MMPs como 2, 3, 9 e 13 diminuem significativamente a migração e invasão tumoral quando silenciadas (Cho, Xie, Hegedu, & Eliceiri, 2008; Tang, Yamamoto, Lin, Fong, & Tan, 2010; Gencer, Cebeci, & Irmak-yazicioglu, 2011; Yanan Sun, Liu, Yang, Li, & Lu, 2008; Webb *et al.*, 2017; Law *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2008).

Assim, apesar do potencial terapêutico de RNAi, existe um grande desafio relacionado a entrega eficiente de siRNA às células/tecido alvo. O uso de nanopartículas atuando como nanocarreadores de siRNA é necessário já que a molécula de siRNA livre oferece algumas desvantagens como o alto peso molecular (13 kDa), possibilidade de degradação por nucleases séricas, absorção reduzida para o interior das células e eliminação por excreção renal. Por isso, o direcionamento do siRNA por sistemas de tamanho nanométrico precisam ser utilizados de forma que seja possível evitar o sequestro pelo sistema fagocítico, ter prolongado tempo de circulação evitando depuração renal rápida e ser alvo de apenas tecidos e células específicos (Polo, 2011; Pittella, 2012).

## 1.5. Nanopartículas híbridas

O interesse pela terapia com RNAi tem se expandido e pesquisas básicas ou com objetivos terapêuticos tem se tornado mais frequentes. Com isso, em 2010, Davis et al., relataram a primeira entrega de nanopartículas de siRNA em humanos via injeção sistêmica em estágio de ensaio clínico.

Os sistemas de nanocarreadores para liberação de siRNAs na terapia de câncer incluem os principais tipos: i) modificações químicas de siRNA, ii) sistema de entrega de siRNA baseado em lipídios, iii) sistema de entrega de siRNA baseado em polímeros, iv) sistemas de siRNAs conjugados, v) co-entrega de siRNA e drogas anticâncer, e vi) nanopartículas inorgânicas (Singh, Trivedi and Jain, 2018).

As nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio (CaP) destacam-se por características que favorecem a sua utilização. O CaP é encontrado no corpo humano como o principal componente de ossos e dentes fornecendo alta biocompatibilidade (Zhang, 2009) e, além disso, esse sistema é capaz de adsorver moléculas carregadas negativamente como os ácidos nucleicos. As nanopartículas de CaP formadas por autoassociação, são sensíveis ao pH e esta característica é importante para a entrega do ativo no tumor. No pH ácido endossomal, o CaP aumenta o escape endossomal, permitindo a liberação para o citosol do siRNA (Ma, 2014; Polo, 2011). Devido a esta capacidade de liberação de ativos em pHs diferentes, nanocarreadores baseados em CaP permitem uma entrega controlada. Quando as células internalizam as nanopartículas via endossomal, o pH ácido do meio tumoral favorece a dissolução do fosfato de cálcio. A alta concentração de íons cálcio promove a entrada de íons e água para o interior do endossomo que aumentará a pressão osmótica, ocorrendo a rompimento da membrana endossomal com liberação do ácido nucleico (Pittella, et al., 2011).

Apesar das propriedades benéficas de CaP destacadas, nanopartículas precisam ser estáveis em meio aquoso para uso clínico. Para que isso ocorra, uma molécula não-iônica e hidrofílica bastante utilizada em carreadores é o polietilenoglicol (PEG) conferindo estabilização estérica e evitando o

crescimento rápido de cristais de CaP por meio do controle de seu tamanho. (Kakizawa, Furukawa and Kataoka, 2004). Esta característica é importante em tratamentos contra o câncer já que nanocarreadores inferiores a 100nm oferecem a vantagem de acumular-se no tumor pelo efeito EPR (aumento da permeabilidade e retenção) que ocorre devido à rápida multiplicação das células do câncer que requerem nutrientes. Para isso, fatores de crescimento secretados por essas células induzirão neovascularização rápida e desorganizada que permite a passagem de nanocarreadores (Peer, 2007; Zhang, 2009; Pittella, 2011; Allen, 2004; Maeda, 2000).

Devido as características benéficas do uso de nanopartículas de CaP com PEG, muitos estudos tem sido realizados com o intuito de utilizá-las como nanocarreadores (Kakizawa et al., 2004; Pittella et al., 2011, 2012; Mello Junior, 2017).

Neste estudo foi utilizado nanopartículas híbridas de CaP envoltas por polietilenoglicol ácido glutâmico (PEG-GLU) polianiónico com siRNA adsorvido no núcleo. Assim, a porção poliônica se liga internamente aos íons cálcio de carga positiva e PEG reveste a nanopartícula externamente como a figura 9 (Pittella et al., 2011).

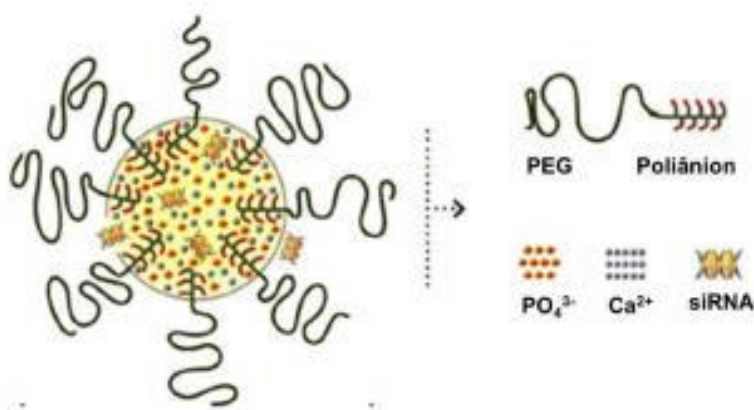


Figura 9: Ilustração de nanopartícula de fosfato de cálcio/PEG/siRNA (Adaptado de PITTELLA, 2011).

Tendo em vista o potencial terapêutico das metaloproteinases de matriz 9 e 13 silenciadas por siRNA e a necessidade de tratamentos para o câncer de mama metastático que atuem nos processos de migração de células tumorais e,



portanto, na progressão do tumor e que também sejam específicos às células alvo, a hipótese desse trabalho foi de que o silenciamento de MMP9 e MMP13 em células de câncer de mama murinas 4T1 reduz a migração e invasão celular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o impacto do silenciamento por siRNA em MMP9 e MMP13 na progressão tumoral *in vitro* por meio de RNA de interferência nanoestruturado.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Construir sequências específicas de siRNAs contra as metaloproteinases de matriz 9 e 13;
- Elaborar nanopartículas com entrega alvo-específica;
- Analisar a eficiência de incorporação de siRNAs em nanopartículas;
- Silenciar os genes de metaloproteinases 9 e 13 por meio de siRNA;
- Avaliar a citotoxicidade de nanopartículas e siRNAs;
- Avaliar a capacidade proliferativa de células tumorais *in vitro*
- Avaliar os processos de metástase por meio de ensaios de migração celular.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais**

As sequências de siRNA utilizadas neste estudo e os oligonucleotídeos iniciadores foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil e o MTT [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] e o Azul de Tripán da Invitrogen. Os reagentes utilizados em cultura celular foram adquiridos da Gibco. A aquisição de dimetil sulfóxido (DMSO), e dos sais: Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> e NaCl, TRIS (2-Amino-2-hydroximetilpropano-1,3-diol) e HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico] foram adquiridos da Synth. O Trizol foi adquirido da Invitrogen; A enzima DNase foi adquirida da Roche e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e o kit high capacity-cDNA Reverse Transcription foram adquiridos da Applied Biosystems; O kit Power SYBR-Green PCR Master Mix foi adquirido da Thermo Scientific Inc; O polímero polietileno-glicol ácido glutâmico foi adquirido através da empresa Alamanda Polymers Inc.

#### **3.2. Cultura Celular**

A linhagem celular de carcinoma mamário murino metastática 4T1 (ER -, PR -, HER2)(ATCC®CRL-2539) foi gentilmente cedida pela Professora Dra. Adriana Bonomo pesquisadora na Fiocruz, Rio de Janeiro. Os ensaios foram realizados nos Laboratórios de Imunologia e de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados da Universidade Federal de Juiz de Fora, em local equipado para a manipulação e armazenamento de culturas celulares. Todo o trabalho foi desenvolvido empregando material estéril e técnicas assépticas.

As células foram cultivadas em DMEM (Gibco®) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina e mantidas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **3.3. Construção das sequências de siRNA**

As sequências de siRNA foram desenhadas baseadas nos genes MMP9 e MMP13 murinos. A forma final, que representa o RNAm maturado foi o alvo do siRNA. A sequência complementar ao RNAm foi escolhida de acordo com Reynolds et al., 2004. As sequências obtidas não apresentaram homologias com outros genes, evitando-se assim efeitos de RNAi indesejáveis com pareamentos inespecíficos. Desta maneira, foi realizado uma pesquisa de homologia das sequências desenhadas para cada gene, com as sequências de outros genes que não tem interesse. Para isso, foi utilizada a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de nucleotídeos, disponível em (National Center for Biotechnology Information - NCBI) <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)>. Para a construção de siRNAs utilizou-se o programa Whitehead siRNA disponível em <http://sirna.wi.mit.edu/home.php> que permite escolher a melhor sequência pela homologia BLAST. As sequências com alto grau de homologia com outros genes foram descartadas. Como controle negativo de silenciamento, utilizou-se uma sequência não pareável - *scramble*.

### **3.4. Nanopartículas**

#### **3.4.1. Preparação de nanopartículas híbridas**

As nanopartículas foram preparadas a partir de uma mistura simples de duas soluções aquosas. A solução 1 possui CaCl<sub>2</sub> na concentração de 2,5M diluída em TRIS-hidroximetil-aminometano na concentração de 25mM (pH 10). A solução 2 contém polímero polietileno-glicol-ácido glutâmico (PEG-GLU) na concentração de 400µg/mL diluído em TRIS/HCL na concentração de 10mM (pH 7,2-7,4), HEPES PO<sub>4</sub><sup>-</sup> a 50mM, NaCl a 140mM (pH 7,2-7,4) e siRNA a 15µM. A solução 1 foi misturada, manualmente, a solução 2 vigorosamente por aproximadamente 20 segundos. As nanopartículas são formadas a partir de interações eletrostáticas por auto-associação.

### **3.4.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)**

A técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada para obtenção da distribuição de tamanho, do diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersividade (Pdl). Essas medidas foram realizadas com cubetas de quartzo (ZEN2112) no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C em um ângulo de detecção de 173° com um laser He-Ne (633nm) como feixe incidente. Os diâmetros específicos e os índices de polidispersão (Pdl) foram obtidos a partir da taxa de decaimento na função de correlação de fótons e analisados com um método cumulativo. Histogramas foram montados para apresentar a distribuição populacional baseada no tamanho médio das nanopartículas.

### **3.4.3. Eficiência de encapsulação de siRNA em nanopartículas**

A eficiência de encapsulação foi determinada utilizando o Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) em comprimento de onda 260nm. Primeiramente, a amostra de nanopartícula foi centrifugada a 15.000 rpm por 20 minutos utilizando centrífuga Heraeus Megafure 16R (Thermo Scientific). O sobrenadante filtrado foi coletado e medido em espectrofotômetro. O percentual foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Concentração inicial} - \text{Concentração filtrado}}{\text{Concentração inicial}} \times 100$$

### 3.5. Extração de RNA

As células da linhagem 4T1 foram semeadas em placas de 6 poços em triplicatas para os grupos: nanopartículas com siRNAs de MMP9 (NP siMMP9) e MMP13 (NP siMMP13) na concentração de 200nM, como controles negativos foram utilizados nanopartículas sem siRNA (Mock), siRNA sem a nanopartícula (Naked) para cada gene e siRNA de um gene não homólogo à sequência de gene conhecida (Scramble) além de células somente com meio de cultura. As células em cada poço foram lavadas duas vezes com PBS e em seguida, adicionou-se 1mL de Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA) por poço. Posteriormente, o conteúdo de cada poço foi transferido para um microtubo de 1,5mL. Adicionou-se 200µL de clorofórmio (Merck, Hesse, Alemanha) que foi homogeneizado por inversão e incubado por 3 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4°C por 15 minutos para separação das amostras em três fases distintas. A fase superior aquosa, contendo o RNA, foi transferida para um novo microtubo, no qual foram acrescentados 500 µL de isopropanol (Merck, Hesse, Alemanha). Os microtubos foram incubados por dez minutos a temperatura ambiente e depois foram centrifugados a 12.000 rpm a 4°C, por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante, sendo o pellet lavado duas vezes com etanol 75% (Merck, Hesse, Alemanha). Após as lavagens, os microtubos foram deixados invertidos sobre papel toalha com a tampa aberta, para evaporação do etanol remanescente. Em seguida, acrescentou-se 30µL de água RNase free nos microtubos e estes foram armazenados a -80°C.

Para minimizar a contaminação dos RNAs com DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase; 10µg de RNA foram tratados com 5µL de DNase I recombinant, RNase-free (Roche) na presença de 5µL de incubation buffer e incubadas por 15 minutos a 37°C. Em seguida, o RNA tratado foi incubado com 2µL de EDTA 8 mM por 10 minutos a 75°C para inibir a reação. Este RNA foi utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA).

A absorbância das amostras de RNA foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Carolina do Norte EUA), com intuito

de analisar a qualidade e também para quantificação das mesmas. As dosagens foram feitas a partir de 2µL da amostra e a quantidade de RNA foi padronizada.

### 3.6. PCR em tempo real

A síntese de cDNA foi realizada pela técnica de transcrição reversa (RT), a partir das fitas de mRNA. A enzima usada para essa reação foi Transcriptase Reversa (Applied Biosystems) e, além disso, foram adicionados os seguintes reagentes a tubos nuclease-free: dNTP, random primers, RT buffer e H<sub>2</sub>O RNase free. Os tubos foram incubados a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos. Os tubos contendo cDNA foram armazenados a -20°C.

Após a síntese do cDNA, realizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores (5'-3') utilizados para análise da expressão de mRNAs específicos foram CGAGGGACGCTCCTATTTCG (MMP9 – forward) e TTGCCGTGCTCCGTGTAG (MMP9 – reverse); TGCACGTTAACGGACAACCTTC (MMP13 – forward) e TCCCCTTTCTTAGTGACTTTGGT (MMP13 – reverse) com eficiência de 97% e 98% respectivamente. O gene de referência utilizado foi a beta-actina que possui os iniciadores (5'-3') nas seguintes sequências: CCACCATGTACCCAGGCATT (ACTIN - forward) e ACGCAGCTCAGTAACAGTCC (ACTIN – reverse). Utilizou-se 5µL do cDNA; 10 µL do reagente SyberGreen; 0,4 µL de cada iniciador (concentração de 10µM) e 4,2µL de água foram misturados para cada amostra. Foram feitas triplicatas de cada amostra com volume final de reação de 20 µL. As condições de temperatura utilizadas foram: um passo inicial de 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Por fim, na curva de dissociação usou-se 95°C por 15 segundos, seguidos de 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. A placa foi incubada em termociclador StepOnePlus Real-time RT-PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). O threshold foi definido automaticamente pelo programa, sendo ajustado para a fase exponencial da reação quando necessário.

### **3.7. Análise de viabilidade celular**

#### **3.7.1. Teste de avaliação do metabolismo celular com MTT**

A determinação da citotoxicidade de nanopartículas com siMMP9 e nanopartículas com siMMP13 sobre as células de câncer de mama metastáticas 4T1 foi avaliada através do método do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]} que constitui-se de um teste colorimétrico usado para avaliar o metabolismo mitocondrial conforme descrito por Mosmann (1983) e modificado por Pasetti (2009). Dessa forma, desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração roxa, chamado de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Após o crescimento celular, as células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de cultura de 96 poços em 100µl de DMEM e incubadas por 24h.

As nanopartículas com siMMP9 e siMMP13 nas concentrações de 10, 50, 100 e 150 e 200nM foram adicionadas e como controles negativos foram utilizados nanopartículas sem siRNA (Mock), siRNA livre (Naked) e siRNA de um gene não homólogo à sequência de gene conhecida (Scramble). Para cada condição foram utilizados seis poços.

Após adição dos tratamentos, as células foram novamente incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h e 48h. Após o tempo de exposição correspondente, foram então adicionados 20µl de solução de MTT (5mg/ml preparada com PBS). A placa de 96 poços foi novamente colocada na estufa e incubada por 4h. Em seguida, o meio contendo MTT foi aspirado de cada poço e foram adicionados 100µl DMSO para solubilizar os cristais formados. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, USA) em



comprimento de onda de 540nm. A avaliação do metabolismo celular por meio do percentual de sobrevivência celular foi calculado da seguinte forma:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\textit{Absorbância da amostra}}{\textit{Absorbância média do controle}} \times 100$$

### **3.7.2. Teste de viabilidade com Azul de Trypan**

O efeito do silenciamento de MMP9 e MMP13 na taxa de viabilidade da linhagem 4T1 também foram avaliados a partir da contagem do número de células ao longo do tempo. Para isso,  $5 \times 10^3$  células foram plaqueadas em placas de 24 poços e mantidas por 24h para aderência. Em seguida, os tratamentos foram adicionados em triplicatas da seguinte maneira: células somente com meio de cultura, NP siMMP9 (200nM), NP siMMP13 (200nM), Naked MMP9 (siRNA sem a nanopartícula), Naked MMP13 (siRNA sem a nanopartícula), Mock (nanopartículas sem siRNA) e NP siRNA Scramble. Nos tempos de 24 e 48 horas seguintes, as células foram tripsinizadas, ressuspendidas em meio de cultivo e contadas com o auxílio do Trypan Blue (15250-061, Life Technologies, Califórnia, EUA) em câmara de Neubauer. O Trypan Blue é um corante incapaz de ser internalizado por células viáveis, as quais possuem a membrana íntegra. Assim, apenas células danificadas ou mortas são coradas por este composto, de forma que a utilização do mesmo permite a distinção entre células vivas e células mortas.

### **3.8. Ensaio de migração celular**

A aquisição da capacidade de migração pelas células tumorais está diretamente relacionada com aumento de agressividade. Este fenômeno permite que células transformadas colonizem órgãos distantes em um evento complexo e finamente orquestrado que envolve desde a invasão de capilares, modificação da morfologia celular e a sobrevivência em ambiente com características distintas do ambiente de origem. Nesta perspectiva, avaliou-se o efeito de NP siMMP9 e NP siMMP13 na linhagem metastática 4T1 durante a capacidade de migração celular.

### 3.8.1. Wound Healing (migração coletiva)

A capacidade de migração coletiva da linhagem 4T1 previamente tratadas com NP siRNA de MMP9 e NP siMMP13 foi avaliada. Estas foram semeadas em placas de 24 poços em três poços distintos para caracterizar a triplicata técnica com os seguintes grupos: células somente com meio de cultura, NP siMMP9 (200nM), NP siMMP13 (200nM), Naked MMP9 (siRNA sem a nanopartícula), Naked MMP13 (siRNA sem a nanopartícula), Mock (nanopartículas sem siRNA) e NP siRNA Scramble. Após as linhagens atingirem confluência de 80%, foi realizado um risco em cada um dos poços da placa com o auxílio de ponteiros p200. Imediatamente após a realização do risco, as células foram lavadas com PBS para remoção daquelas que se desprenderam do substrato evitando que as mesmas pudessem novamente se aderir na placa. Em seguida, foram adicionados meio DMEM sem SFB e os poços foram avaliados. As regiões analisadas foram marcadas para nova observação em 0, 12, 24, 36 e 48 horas depois. Imagens foram adquiridas e avaliados em microscópio invertido acoplado à câmera fotográfica no aumento de 10x. A migração celular foi quantificada no programa Image Pro Plus.

### 3.8.2. Ensaio de migração - Transwell

O efeito da capacidade de migração individual da linhagem 4T1 silenciados por siRNA de MMP9 e MMP13 foi avaliado pelo ensaio de *Transwell*. A câmara superior contém membrana de polycarbonato de 8µm de diâmetro (*Transwell* - poros com 0,8 µm de diâmetro, Corning, *Arizona*, EUA) que foi coberta por Matrigel (Sigma-Aldrich) na concentração de 1mg/mL. As células foram semeadas no inserto na densidade de  $1 \times 10^4$  células/mL de meio de cultura sem soro obedecendo os seguintes grupos: controle, NP siScramble, NP siMMP9, NP siMMP13, Naked MMP9 e Naked MMP13. Meio de cultura com soro foi colocado na porção inferior. As placas de cultura foram incubadas por 24 horas. Para

analisar as células que atravessaram a barreira do Matrigel e a membrana porosa, os insertos foram removidos dos poços e incubados em Paraformaldeído 4% por 5 minutos à temperatura ambiente e lavados em solução de PBS. Posteriormente, estes foram incubados em Metanol 100% por 20 minutos e lavados com PBS. Em seguida, foram corados em Cristal Violeta 0,1% por 1 minuto e lavados em PBS para remoção do excesso de corante. As células que não migraram foram cuidadosamente removidas da membrana do *Transwell* com o auxílio de hastes flexíveis. Em seguida, os insertos foram analisados em microscópio invertido acoplado à câmera fotográfica. As imagens foram adquiridas no aumento de 4x e 10x. Cinco imagens de diferentes campos foram adquiridas. Assim, para quantificar a capacidade de migração, as células destes cinco campos foram contadas (ferramenta contagem, *Image Pro Plus*).

### **3.9. Ensaio de clonogenicidade**

Para determinar se os tratamentos com siMMP9 e siMMP13 (200nM) alteram a capacidade de formação de colônias da linhagem 4T1, as células foram cultivadas em placas de 60x15 mm (100 células por poço em volume final de 2 mL) e tratadas a cada três dias obedecendo os seguintes grupos: Controle – apenas células com DMEM, NP siMMP9 e NP siMMP13 (200nM), Naked MMP9, Naked MMP13, Mock e NP siScramble ao longo de sete dias. Cada grupo de tratamento foi plaqueado três vezes a fim de se obter a replicata técnica. No final deste período, as placas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e coradas com Cristal Violeta 0,5% por 1 minuto. Após lavagem abundante em água, os clones foram fotografados e contados com o auxílio do aplicativo CFU Scope. Em seguida, estes foram solubilizados em solução de SDS 1% sob agitação por uma hora a 37°. A absorbância dos clones solubilizados foi avaliada em espectrofotômetro (Spectramax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, USA) em comprimento de onda de 620 nm com posterior análise estatística.

### **3.10. Análise estatística**

Para a avaliação estatística utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para testar os efeitos dos tratamentos e como pós testes foram utilizados o Tukey ou Bonferroni pelo software GraphPad Prism em experimentos feitos em triplicatas. Os valores de p inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos e representados por um asterisco.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Sequências de siRNAs e genes alvo

Os critérios utilizados para a construção de sequências de siRNAs determinam a obtenção de sequências efetivas em promover o silenciamento. Reynolds et al. em 2004, ao analisarem 180 siRNAs, propuseram características para a escolha da sequência complementar ao RNAm mais adequada como: alvos localizados a 50-100 nucleotídeos após o códon de início (ATG); sequências padrões: AA(N<sub>19</sub>)TT, ou NA(N<sub>21</sub>), ou NAR(N<sub>17</sub>)YNN, em que N é qualquer nucleotídeo, R é uma purina (A,G) e Y é uma pirimidina (C,U); porcentagem de G,C entre 36-52% para apresentar estabilidade; evitar repetição de 4 ou mais nucleotídeos para não acontecer formação de estruturas secundárias; baixa estabilidade da fita senso; evitar homologias com outros genes para que não ocorram efeitos de RNAi fora do alvo.

As sequências de siRNAs construídas se mostraram eficazes ao silenciar parcialmente MMP9 e MMP13 conforme proposto por Reynolds et al., 2004 e estão descritas na tabela 1.

Gene	Sequências senso (5' - 3')
MMP9	CGAUAAGGACGGCAAUUUGG
MMP13	CUGCGAGCGUUCAGAUUUA
<i>Scramble</i>	GGAGUCGACGAGCAUAGGU

Tabela 1: Sequências de siRNA utilizadas.

As regiões específicas de pareamento dos alvos MMP9 e MMP13 estão demonstradas nas figuras 9 e 10 junto ao RNA mensageiro do respectivo gene analisado.

```

TGCAAGGCAGCGTTAGCCAGAAGCTGGGCTCTCACATGAGTCCCTGGCAGCCCTGCTCTGGCTCT
CTTGGCTTTCCGCTGCGAGCTCTGCTGCCCTTACACAGCCAGCCGACTTTTGGTCTTCCCAGAAC
CTGAAACCTCAACCTCACGGACACCCAGCTGGCAGAGGCACTACTGTACCGCTATGGTTACACCCGGG
CCGCCAGATGATGGAGAGAAAGAGTCTACGGCCGGCTTTGCTGATGCTTCAAGAGCAGCTCTCCCT
GCCCCAGATGGTGAAGTGGACAGCAGACATAAAGGCATTGCAACACACGCTGTGGTGTCCAGAC
GTGGTCTGATCCAAACCTTCAAAGGCTCAAAGTGGGACATCAATACATCAGATGATCCAAACCT
ACTCTGAAGACTTGGCCGAGACATGATGATGACGCTTCCGGGGGCTTCCGGGTGTGGGGCAGGT
GGCAGCCCTCACCTCACCCGCTGTACGGCCAGGAGGCAATGTCATCAGTTTGGTGTCCGGAG
CAGGAGAGGGTATCCCTTCCAGGGCAGGAGGCTTGGTGTGGCACACGCTTCCCTCCCTGGCCGGGG
TTCCAGGAGATGCCATTTCCAGCAGCAGGAGTTGGTGTGGTGGCAAGGCGCTGTGATCCCACTTA
CTATGGAACTCAAATGGTGGCCATGTCATTTCCCTCACCTTCCAGGAGCTCCCTATTCGGCCGTC
ACCACAGAGCCGCAACGACGGCAGCTTGGTGTAGCACACAGCTGACTCAGATAAGGACGGCAAAAT
TTGGCTTTCTGCCCTAGTGAGAGACTTACACGGAGCAGGCAACGGAGAAAGCAACCTGTGTGTCC
GTTCACTTTGAGGGCCGCTCTACTCTGCCTGCACACATAAGGCGCTCGGATGGTTACCGCTGGTG
GCCACACAGCCAATATGACAGGATAAATGATGGCTTCCCTTACCCGAGTGGACGCGACCGTAG
TTGGGGCAACTCGGCAGGAGGCTGTGGCTTCCCTCTGCTTCTGGGCAAGCAGTACTTCTCTGT
TACCAGCAGCGCCGCAAGGATGGGCGCTTGGTGTGGCACACATGAACTTGCACACTGACAAGAAG
TGGGGTTTGTGTCAGACCAAGGATACAGCTGTCTGGTGGCAGCGCACGAGTTCGGCCATGCACCTGG
GCTTAGATCATTCCAGCGTGGCGAAGCGCTCATGTACCCGCTGTATAGCTACCTCGAGGGCTTCCCT
GAATAAAGACGACATAGACGGCATCAAGTCTGTATGGTGTGGTCTTAAGCTGACCAAGGCTTCCA
GCCACACACAACTGAACACAGCCGACAGCAGCTCCACATATGTGTCCCACTACTCCACGGCT
ATCCACAGTGGGCCACGGTGGCCCTACAGGCGCCCTCACCTGGCCCAACAGCAGCCGCTCAC
TGGCCCTACAGGCGCCCTCACCTGGCCCTACAGGCGCCCTACTGGGGCTTCTTGAAGGCTTACA
GAGTCTTGGTGTGGCAGACAACTCTTCAAGTGGATGTTTGTATGCTATTGCTGAGATCCAGGGCG
CTCTGCATTTCTCAAGGAGGTTGGTACTGGAAGTCTTGAATCATAGAGGAAGCCATACAGGGCC
CTTCTTACTGCCGACGCTGGCAGCCGCTGCTGCACAGCTGGACTCCGCTTTGAGGATCCGACAGCC
AAGAGGGTTTCTTCTTCTGGAGCTCAAATGGGTGTACACAGGCAAGACCGTGTGGGCCCAAGGA
GCTCGGATAAGTGGGTAGGCCAGAGGTAACCCAGCTCAGCGGGCTTCTCCCGCTGTCTCGGAA
GGCTGTGTTCCAGCAAGGGCGTGTGGAGATCGAATGAACTCAGAAAGTGAAGTCCAGAGGCTCC
GCATCTGCTGGATGAGGAGTCTCTGGTGTGGCTGAACTCACACGACATCTCCAGTACCAAGACA
AAGCTTATTTGCACTGGCAAACTTCTTGGCGTGGAGTTCCAAATGAGGTGAACAAAGTGGACCA
TGAAGTGAACCAAGTGGACGAGTGGCTACGTGACCTACGACCTCTGCGAGTCCCTTGAATAGGGCT
CCTTTTGGCTCAACCGTGCAGTGCAGTCTTAGAGACACACACACACACACACACACACAAACCCCA
TCCAGGGGAAAGGTTGCTAGCTGGCCAGTACAGACTGGTGTCTTCTAGAGACTGGGAGAGTGGAG
GAGGAGGGCTCTCTGCCCACCGCTTCTTGTGGACTTCTTAATAACACGGATCCCAACCT
TTTTCCAGCTACTTATGCAATCAGCTTATCTGTAGTGTGAGATGATCAGGCAAGAGCAACTTGT
AGGGTGGATTTGACCTTTATTTTGTGGCGTGGAAATGAACTGAGTGGCTTTGTGACAGGCA
CTTCCAGGCTAAACCACTCTCCGACTCCAGCCCTTATTTATATGATGAGGTTATGTTTCAATG
CATGATTTAAACCCAGAAATGCTTACTGTGTGGGGCGGCTCCCAACCGTGCATAAATTAAGGT
ATTGAGTGGCCCTAGGAGGATATGATTAATTTCTCTTACATTTGGAGAACACACCCAGGCTA
TCCACTCATCAAACTTATTTAGAGACTCCTAGGAGCCAGGCTCTACTGGGGTGGAGACAGAA
ATGTTGGTCTTCTTCAAGGATGCTCAGAGATCTCCGCTGCTGTAATCTGCTGAAACAGAGCC
AGACTCTCTCTCCGAGAGTCCAACCTACCTAGTGGTGTGGCAGCTGCAGATGCTATACAG
CATGTGTCTAGAGAGGTAGAGGGGCTGTGGCTTATGGTTCAGGTGAGCTGTCTCCAGGTGAGA
TGACCCCTCAGCTGAACTGATCAGGAGGATAACCAAGTGTCTTCTGGCAGTCTTTTAAATAAAT
GAATAAATGAATATTACTTATTTAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA

```

Local de pareamento do siRNA MMP9

Mus musculus matrix metalloproteinase 9 (MMP9)  
NCBI Reference Sequence: NM\_013599.4

Figura 30: Localização do pareamento de siRNA ao RNA mensageiro do gene MMP9. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, acesso em 28/12/2018).

```

CTTGGCCCTGGGAAAGGAGAGACTCCAGGCACTGCTGGGACCAATGCATTGAGTATCTCTGGCCACTTCT
CTTGTGAGCTGGACTCCCTTGGTCCCTGCCCTTCCCTATGGTGAATGATGATGATGACTGTCT
GAGGAAGACCTTGTGTTGAGAGCACTACTTGAATACATACACTCCCTGCGACTTGGCGGAAATCC
TGAAGAAGTCTACAGTGACCTCCACAGTGGACAGGCTCCGAGAAATGCAATCTTCTTGGCTTAGAGGT
GACTGGCAAACTGATGATCCACCTTAGACATCATGAGAAACCAAGATGGAGTGGCTGATGGGT
GAATAACAATGTTTCCCTAGAACACTCAAATGGTCCCAACGAACTTAACTTACAGGATGTGAACATA
TCTCTGATATGTCCTTCTGAAAGTGGAGAAAGGCTTCAAGAAAGCTTCAAGGTCTGGTGTGATGAC
ACCACTGAAATTCACAGAACTATGATGGCAGCTGACATCATGATATCTTTGGGACTAAAGAACT
GGTGACTTCTACCAATTTGATGGACTTCTGGTCTTGGCACAGGCTTCTCTCTGGACCAAACTATG
GTGGGATGCCATTTGATGATGAAACTGGCAAGCAGTTCCAAAGGCTACAACCTGTTTATGTTGT
TGTGCCCATGAGCTTGGCCACTCCCTAGCTTGGATCACTCCAAAGGACCAAGGAGCCCTGATGTTCC
ATCTATACCTACAGTGGCAAAAGCAATTTCACTGCTTCTGATGATGAGCTCAAGGAAATCAGTCTT
ATGGTCCAGGGGATGAAAGCCCAACCTAAGCATCCAAACACAGAGAAAGTGGACCCAGCCCTTCT
CCTTGGTGCATACAGCTCCGAGGAGAACTATGATCTTAAAGACAGATTTCTTGGCGCTGCAC
CCTCAGCAGGTGGAGCTGAGCTCTTTTGAAGAAAGTCTTTGGCCAGAACTTCCCAACCTGAGGATG
TGCATATGAACATCCATCCGCTGACTTATGTTTCTTTAGAGGAGAAATCTGGGCTGAAATGG
TTATGACATCTGGAAGGTTATCCAGAAATAATGACCTGGGATCCCAAAAGGTTGGAAGAGACTG
AGCGCTGCGGTTCACTTTGAGAAACAGGGGAGAGCCCTTCTTCTTGAAGACTGAGTGGAGTTATG
ATGATGTTAACAGACTATGAGCAAGGATATCCCGCTCATAGAGAGGAAATCCCTGGAAATGGCAA
CAAAGTAGATGCTGTATGAGAAAAATGGCTATATCACTTTTCAATGGGCCATACAGTTTGAATAC
AGTATCTGGAGTAATCGCATTTGAGAGTCAAGCAAAATTTATATTTGGTGTAAAGCATCTTAA
AAGTGTATTTATCTCCAGAGAGTATTTGAAACTTCTCAATGATGGGGTGGGGTGGGGTGGAGA
TATCAGGGGAGAGCTTAGTCTGTGAAACGAGCTTCAAGTGAATTTTGGATCTTTGAGCATACAGTAT
CTATGCTGGCTGGAACACATGGAAGAAATTTAAAGTAAATGCAATGAGAACCCCAAGGATCACCTGAT
TCTTGGCTGATGAGAAACAGATGATGAAACCCACAGCAACATGGGGTCCATCTGCTTTTGAAGA
GCATGCAATAATTAATAATATTTATTTTAAAGGCTAACAGACATAAAATAAATCATATTTATATAAC
TGAATGCTTTACAAAAAGTATAATTTAGAAACTTGAATAATGAGGAGTTCATGATGGGGAGCC
ACAGATGAGCAGATAAAGGGAAATGGCTAAAAAATGCACGTTAACGGACAACCTTCCAAAGAGAGAT
TCAGCTTTCACTGGCAGGCTTCAAGTTTATCCACTTTTATAACCAATAAAAAAATACCAAGTCA
CTAAAGAAAGGGATAACAGCCACTACAAGGACAGTGGAGTGGCTTACATTTGGCTTAAATTTATGT
TGGTCACTCAAGGCTATGCACACTGGTGAAGATATGAGAGAGAAATGGAGGAGATTTCTTTTT
ATTAATATTTAGGCTATGAAAGACCATAGTGTGAAAGTCAAATTTGCTATAAGATACGTAAGCAATG
CCATAGCTTTTCAATGAATTTTGAATTTTGAATAAACTAATGTTCAACCTGTTTATCTACCC
ACTGTTCTAAAGACTATAGACTTTTGAATACATGCTCTTTCTAGTAACCTGTGTGACAGGGGCTA
AGGCAAGAAATATGATGAGAGATGATCAGCTAAGACACAGCAAGCCAGAAATAAGAGCTGTGCCAGCTG
TCAGTGCCTTTTGAAGCACTCTTGTGCTCCACCATGTTGTTAATCCCTCTGCTTCTCTTAG
CGAGTAACACTTGGTCTCTGATGATGTTGAAAGCTATGTTGTCAAGAGACAGTGTAAATAACTGGG
AAAAACAAAAAGACTTTTTTGAATAATATGTTAGACTGATTTATGTTGTTCTAATAAAAAATAG
TGTTTTCAGCAGATA

```

Local de pareamento do siRNA MMP13

Mus musculus matrix metalloproteinase 13 (MMP13)  
NCBI Reference Sequence: NM\_008607.2

Figura 11: Localização do pareamento de siRNA ao RNA mensageiro do gene MMP13. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, acesso em 28/12/2018).

## 4.2. Caracterização de nanopartículas híbridas

As nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio foram preparadas conforme Kakizawa, Furukawa, & Kataoka, 2004, com pequenas modificações, por autoassociação por meio da mistura simples e estequiométrica de duas soluções aquosas de  $\text{CaCl}_2$  em tampão TRIS pH 10 e HEPES pH 7,4 com PEG-GLU na presença de siRNA e, em seguida, analisadas pela técnica de DLS.

Os resultados obtidos mostraram diâmetros hidrodinâmicos médios de 62,50 nm e índice de polidispersão (Pdl) de 0,105 com distribuição monodispersa como mostra a figura 13. Esses dados são compatíveis com os encontrados por Pittella et al., 2011 que, ao utilizar nanopartículas de CaP, obtiveram distribuição unimodal com tamanho médio de 42nm e com Mello Junior et al., 2017 que encontraram tamanho médio de 68.9nm e 69.6nm em nanopartículas de CaP.

O tamanho das nanopartículas é essencial para a entrega seletiva de siRNA ao alvo. Para que isso ocorra com efeito RNAi, a sensibilidade de nanopartículas de CaP ao pH é imprescindível permitindo uma entrega controlada. Além disso, quando as células internalizam as nanopartículas via endossomal, o pH ácido do meio tumoral favorece a dissolução do fosfato de cálcio. A alta concentração de íons cálcio promove a entrada de íons e água para o interior do endossomo que aumentará a pressão osmótica, ocorrendo a rompimento da membrana endossomal com liberação do ácido nucléico (Ma, 2014; Polo, 2011, Pittella, 2011).

Deve-se destacar as excelentes propriedades do fosfato de cálcio utilizado na formulação das nanopartículas em questão como a alta biocompatibilidade, boa biodegradabilidade e toxicidade mínima e também a capacidade de as utilizar com diferentes siRNAs. Mas, apesar desses fatores benéficos, a presença de um polímero como o PEG-GLU mostrou-se necessária para evitar o crescimento do cristal de CaP mantendo a nanopartícula em escala nanométrica (Kakizawa et al., 2004; Pittella et al., 2012, 2011; Zhang, Li, & Huangb, 2014).

A análise da homogeneidade das nanopartículas também foi confirmada por meio do índice de polidispersão (Pdl). Este parâmetro aceita valores de 0 a 1 e

os resultados obtidos na faixa de 0,089 – 0,105 são considerados adequados (Verma and Stellacci, 2010).

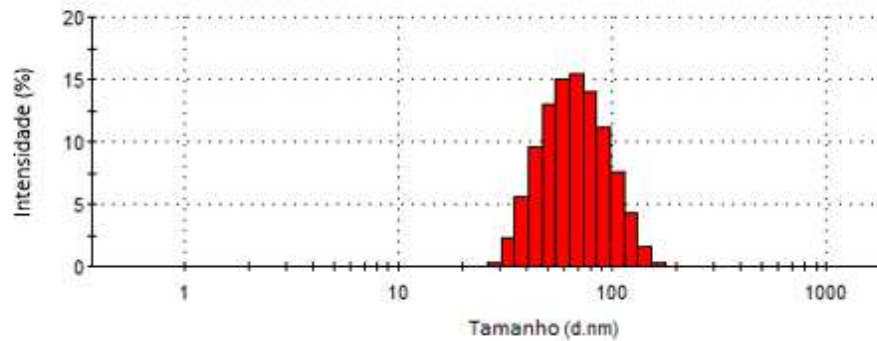


Figura 12: Histograma de distribuição de tamanho de nanopartículas de CaP por intensidade.

Há mais de 30 anos as MMPs foram descobertas como alvos promissores à terapia do com câncer com a identificação de suas propriedades em degradar componentes da MEC. A partir daí, rapidamente inibidores de MMPs sintéticos foram desenvolvidos, mas não obtiveram sucesso em ensaios clínicos pela baixa biodisponibilidade, por causarem efeitos colaterais, entre outras causas (Hardwick, Rhee and Coussens, 2002). Diante isso, os estudos atuais com nanocarreadores, como as nanopartículas de CaP, se tornaram uma esperança para novas formas terapêuticas pois possuem como propriedades essenciais a capacidade de transfecção alvo-específica e biodisponibilidade (Mello et al., 2017; Pittella et al., 2012).

#### 4.3. Eficiência de encapsulação de siRNA

Para a análise de encapsulação de siRNAs à nanopartículas CaP utilizando a absorbância por espectrofotometria foram testadas cinco concentrações de polietileno-glicol-ácido glutâmico (PEG-GLU): 300µg/mL, 400µg/mL, 500µg/mL, 700µg/mL e 1000µg/mL como mostra a tabela 2. Com os valores de absorbância, construiu-se um gráfico de dispersão com interesse na equação da reta gerada ( $y = 0,1877x + 0,0101$ ) Utilizando essa equação conseguimos substituir o valor de y pelos valores de absorbância e calcular a porcentagem de incorporação.



Concentrações de PEG-GLU ( $\mu\text{g/mL}$ ) (%)	Absorbância	Incorporação (%)
400	0,32	81,92
500	0,107	65,58
700	0,141	53,51
1000	0,23	21,93

Tabela 2: Eficiência de incorporação de siRNA à nanopartícula de CaP em diferentes concentrações de PEG-GLU.

Diante dos dados expostos, a concentração de PEG-GLU utilizada em todos os ensaios foi de  $400\mu\text{g/mL}$  com encapsulação de siRNA de aproximadamente de 80%. Trata-se de uma concentração de PEG-GLU de fato eficiente como mostrado por Mello Junior et al., 2017 que utilizaram nanopartículas de CaP com PEG-GLU a  $400\mu\text{g/mL}$  e obtiveram em torno de 50% de diminuição na expressão do gene BCL-2 e 77% de diminuição na expressão de BCL-XL.

A quantidade de siRNA encapsulado nas nanopartículas de CaP foi monitorada de acordo com diferentes concentrações de polímero como mostradas anteriormente. Kakizawa, Furukawa, & Kataoka, 2004 demonstraram que quanto mais alta é a concentração de polímero, menor é a eficiência de encapsulação. Provavelmente isso ocorre pelo de fato de haver competição entre o siRNA e bloco polianiónico carregados negativamente por íons de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse fato é relevante já que a carga da nanopartícula pode influenciar a forma de interação com as células alvo e com outras moléculas do organismo. (Kakizawa, Furukawa and Kataoka, 2004).

#### 4.4. Avaliação do silenciamento gênico

O silenciamento por RNA de interferência do gene de MMP9 após 24h de incubação em células 4T1 foi avaliado por meio da técnica de PCR em tempo real quantificando-se os níveis de RNA mensageiro.

Analisando a expressão do gene alvo, representado na figura 14, após o tratamento com NP siMMP9, obtivemos aproximadamente 40% de expressão do gene MMP9. Isso significa que a expressão de MMP9 diminuiu 60% em relação ao grupo controle não tratado como mostra a figura 14.

O silenciamento ocorrendo de forma adequada indica que a sequência de siRNA construída para esse gene foi eficiente seguindo os critérios propostos. Além disso, podemos inferir que o nanocarreador atuou de forma eficaz com o transporte de siRNA até o citoplasma celular onde o mesmo foi liberado após o escape endossomal. Foi demonstrado em modelo de câncer de mama *in vivo* com células 4T1 que o uso de NP de CaP/PEG-GLU/siRNA foi capaz de silenciar o gene BCL-2 em aproximadamente 40% (Mello et al., 2018) diminuindo o volume do tumor. A redução da expressão de genes anti-apoptóticos como BCL-2 por RNAi foi demonstrado pelo mesmo autor em 2017 (Mello et al., 2017) como alvo promissor na terapia contra o câncer de mama já que esse gene está relacionado a sobrevivência celular com a inibição da apoptose.

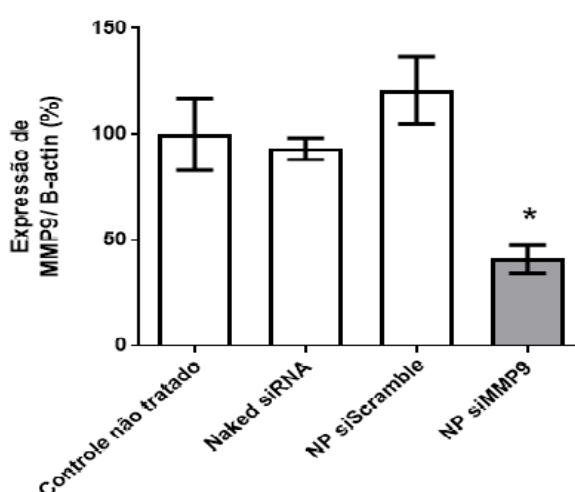


Figura 13: Análise da expressão do gene MMP9 em células de câncer de mama 4T1 por PCR. Incubação com NP siMMP9 (200nM) por 24h. Análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Tukey.

A análise da expressão de MMP9 foi feita por PCR em tempo real e os primers utilizados estão descritos na tabela 3.

Gene	Sequências (forward/reverse)	Eficiência (%)
MMP9	CGAGGGACGCTCCTATTCG/ TTGCCGTGCTCCGTGTAG	97
MMP13	TGCACGTTAACGGACAACCTTC/ TCCCCTTTCTTAGTGACTTTGGT	98
B-actina	CCACCATGTACCCAGGCATT ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	99

Tabela 3: Características dos primers utilizados na reação de PCR.

#### 4.5. Análise da viabilidade celular

A análise de viabilidade celular envolve a utilização de ferramentas que qualificam e/ou quantificam células metabolicamente ativas.

A capacidade antitumoral de nanopartículas analisadas por meio da citotoxicidade de CaP/PEG/siMMP9 e CaP/PEG/siMMP13 em células tumorais 4T1 foi observada através dos ensaios de MTT e Azul de Tripán.

Foi utilizado o ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) que permite avaliar o metabolismo mitocondrial por meio de desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente viáveis. Essas enzimas clivam o anel de tetrazólio transformando um composto de coloração amarela em coloração roxa chamado de formazan (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan)). Assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (Mosman, 1983).

Como mostrado nas figuras 15 e 16, o uso das nanopartículas de CaP com o siMMP9 e siMMP13 não se mostraram citotóxicas nos tempos de 24h e 48h em nenhuma das concentrações testadas.

## Viabilidade celular em 24h

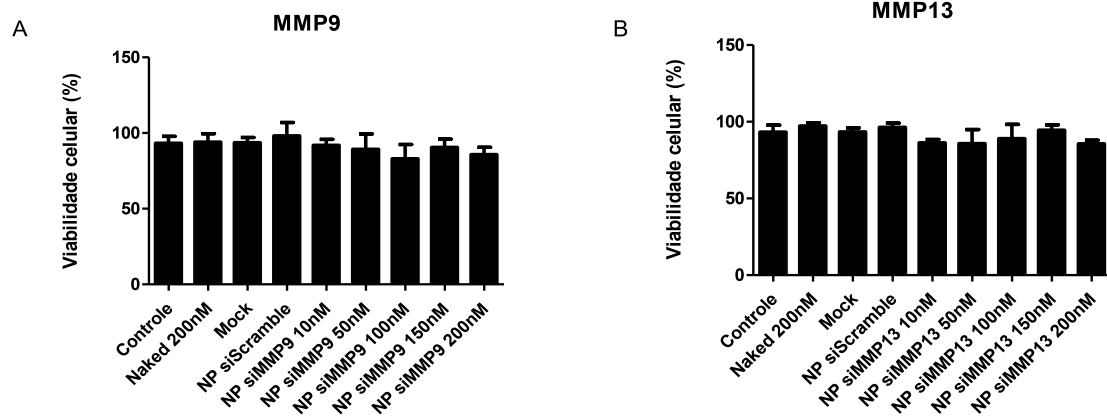


Figura 14: Viabilidade celular para células de câncer de mama 4T1 após incubação por 24h com NP CaP/PEG/siRNA em diferentes concentrações de siRNA. Em A) siRNA MMP9 e em B) siRNA MMP13. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

## Viabilidade celular em 48h

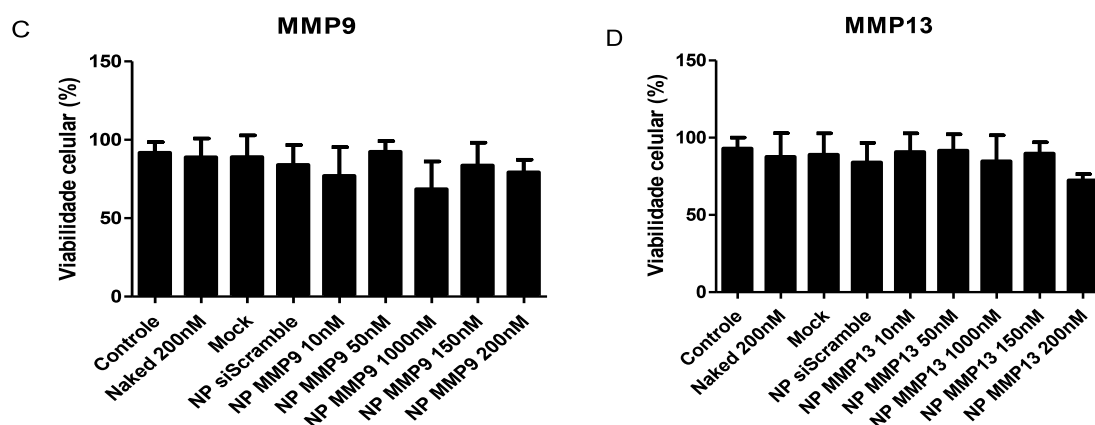


Figura 15: Viabilidade celular para células de câncer de mama 4T1 após incubação por 48h com NP CaP/PEG/siRNA em diferentes concentrações de siRNA. Em C) siRNA MMP9 e em D) siRNA MMP13. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

Para confirmar se as nanopartículas CaP/PEG/siRNA ofereciam algum tipo de citotoxicidade às células 4T1 alterando a viabilidade celular, o número de células viáveis foi avaliado por meio do corante vital azul de tripan. O mecanismo da coloração baseia-se no fato de o corante estar carregado negativamente e não interagir com as células, a menos que a membrana esteja danificada. De fato, as células não danificadas são muito seletivas em relação aos compostos que passam através de suas membranas e, portanto, não devem interagir com o azul de tripan. Portanto, todas as células que excluem o corante são consideradas viáveis.

Analisou-se o número de células 4T1 viáveis após incubação com nanopartículas de CaP com siMMP9 e NP siMMP13 em diferentes concentrações por 24 e 48h. Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular analisada.

## Viabilidade celular em 24h

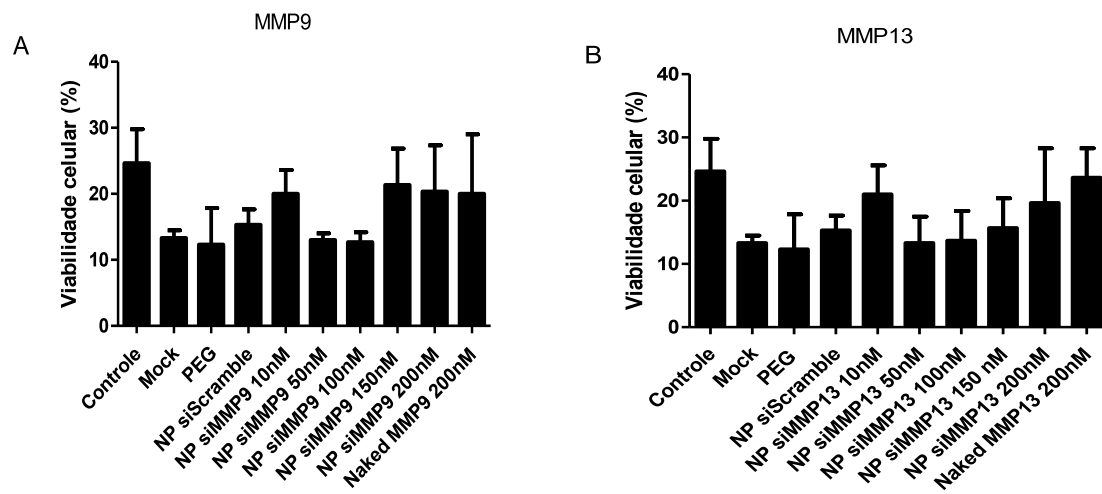


Figura 16: Viabilidade celular para células de câncer de mama 4T1 após incubação por 24h com NP CaP/PEG/siRNA em diferentes concentrações de siRNA. Em A) siRNA MMP9 e em B) siRNA MMP13. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

## Viabilidade celular em 48h

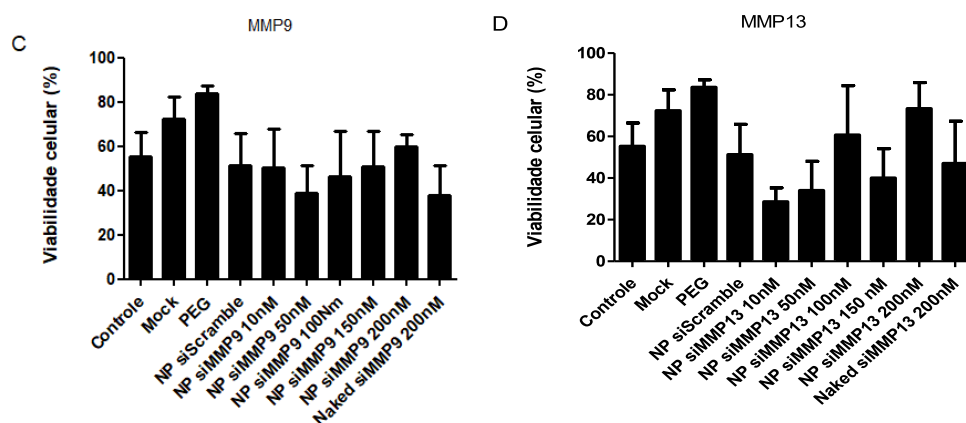


Figura 17: Viabilidade celular para células de câncer de mama 4T1 após incubação por 48h com NP CaP/PEG/siRNA em diferentes concentrações de siRNA. Em C) siRNA MMP9 e em D) siRNA MMP13. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

Nos ensaios apresentados de MTT e Azul de Tripán em células tumorais transfectadas por NP CaP, em nenhum dos tempos e concentrações analisadas houve diferença significativa na viabilidade celular. Ademais, como não houve citotoxicidade nos grupos mock (nanopartícula vazia) e Naked (siRNA livre), o sistema de nanopartícula de CaP/PEG/siRNA proposto se mostra adequado para as investigações seguintes.

Ao analisarmos os efeitos de citotoxicidade do silenciamento de MMPs 9 e 13 em células 4T1, concluímos que essas proteases não são proteínas vitais, ou seja, quando silenciadas, não interferem na sobrevivência das células usadas. Além disso, outro ponto que merece destaque são os sistemas nanoestruturados utilizados que também não apresentaram citotoxicidade (Cho, Xie, Hegedu, & Eliceiri, 2008; Tang, Yamamoto, Lin, Fong, & Tan, 2010; Moirangthem, Bondhopadhyay, & Mukherjee, 2016; Nalla, Gorantla, Gondi, Lakka, & Rao, 2010; Overall & López-Otín, 2002).

Conforme os resultados de viabilidade celular mostrando que não houve diferença significativa entre as concentrações de siRNAs testadas, os ensaios mostrados a seguir, a concentração de siRNA utilizada foi de 200nM.

### 4.6. Análise de proliferação celular por clonogenicidade

O ensaio clonogênico permite avaliar a capacidade de sobrevivência celular em condições adversas, representada pela perda do contato célula-célula. A capacidade de sobrevivência é medida pela quantidade de clones presentes na placa de cultura ao final do experimento. Assim, a capacidade de formação de colônias das células tumorais 4T1 após incubação com nanopartículas de CaP/PEG/siMMP9 e CaP/PEG/siMMP13 foram analisadas por meio dos números de clones celulares formados e da absorbância por espectrofotometria. Não houve diferença significativa no número de colônias formados bem como na análise de absorbância, corroborando com nossos resultados de viabilidade celular. Estes resultados em conjunto são contrários aos observados na literatura. Estudos mostraram que a redução da expressão de MMP9 e MMP13 em células de câncer de mama, levaram a diminuição da viabilidade e proliferação celular (Ding et al., 2016; Wang et al., 2015; Jiang et al., 2011; Kwok et al., 2009). Porém nenhum destes trabalhos foram aplicados em células 4T1, sendo que a maioria deles são realizados em linhagens tumorais humanas. Através de estudos da literatura, Tyagi, et al., 2017 desenvolveram um banco de dados contendo informações sobre 195 siRNAs/shRNAs que tem como alvo 865 genes relacionados ao câncer de mama em diferentes linhagens celulares. Estes autores encontraram apenas 1% destes trabalhos realizados com células da linhagem 4T1(Tyagi et al, 2017).

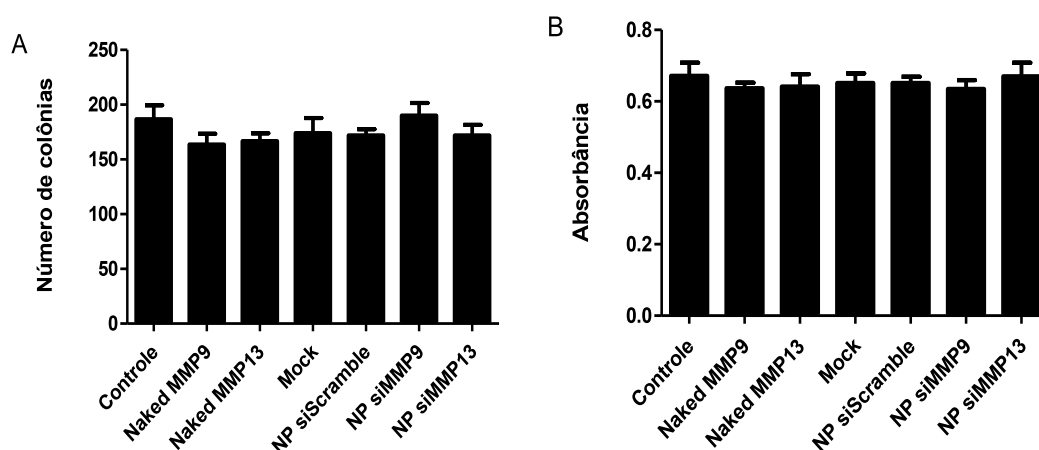


Figura 18: Análise da formação de clones celulares de células 4T1 incubadas com NP siMMP9, NP siMMP13, NP siRNA Scramble, Naked MMP9 e MMMP13 (siRNA livre), Mock (nanopartícula



vazia) e somente DMEM por sete dias. A) Número de colônias utilizando o software Image ProPlus. B) Absorbância por espectrofotometria em Spectramax 190. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

#### **4.7. Avaliação da capacidade de migração celular**

Sabendo que o silenciamento das MMP9 e MMP13 através de nanopartículas CaP não afetou a viabilidade e proliferação das células tumorais, nosso próximo passo foi avaliar se este silenciamento altera a migração dessas células uma vez que muitos estudos mostram a importância de proteases na migração de diversas linhagens tumorais. Além disso, as MMP9 e MMP13 são descritas como super-expressas em câncer de mama metastático revelando que a avaliação da capacidade migratória de células tumorais 4T1 submetidas ao silenciamento das MMPs citadas é de grande relevância.

A avaliação do potencial de migração coletiva das células de câncer de mama 4T1 com silenciamento de MMP9 ou MMP13 foi feita pelo ensaio de cicatrização (wound healing) após encubação com NP siMMP9, NP siMMP13, NP siScramble e somente DMEM e analisados por microscopia ótica. Encontramos diferenças expressivas e significativas quanto à capacidade de migração de células com MMPs 9 e 13 silenciadas em comparação com os controles.

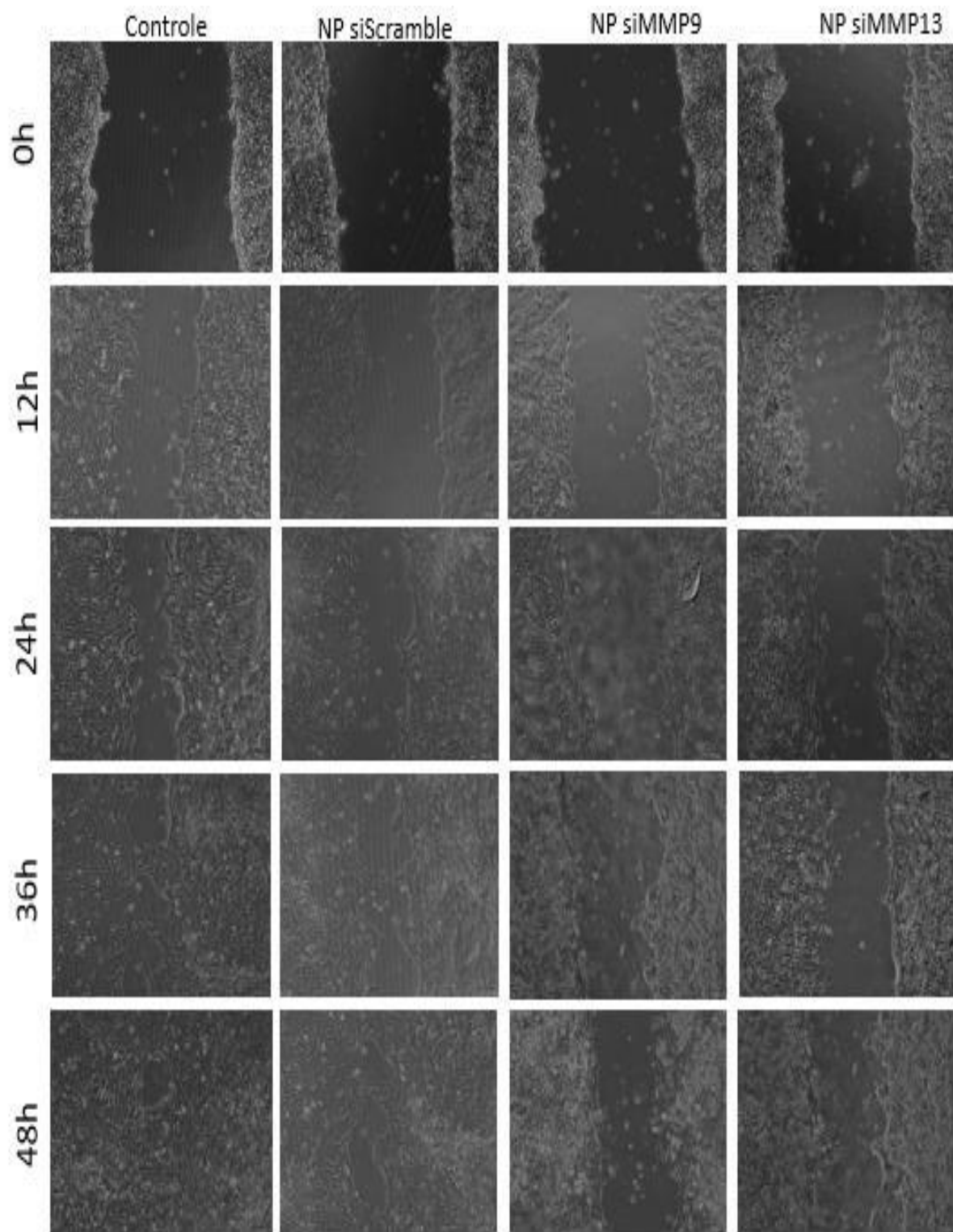


Figura 19: Avaliação do potencial migratório de células de câncer de mama 4T1 encubadas com NP siMMP9, NP siMMP13, NP siScramble e DMEM. Os campos foram fotografados a cada 12h em aumento de 10x.

A área de fechamento foi quantificada por se relacionar diretamente com a quantidade de células que migraram para a região em que foi feito o risco.

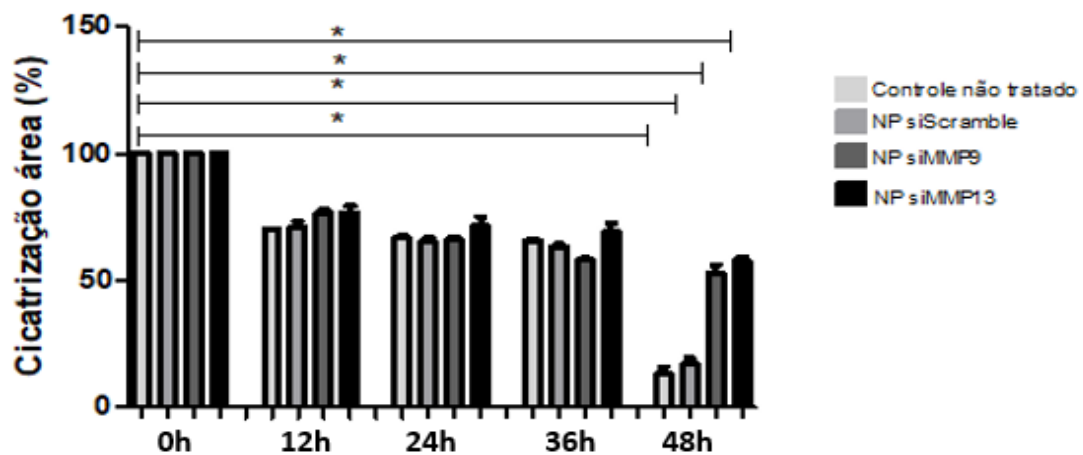


Figura 20: Capacidade de migração em células tumorais encubadas com NP siMMP9, NP siMMP13 e NP siScramble.

O gráfico representa a quantificação do efeito do silenciamento de MMP9 e MMP13 na % de migração por meio de análise da área a cada 12h. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Image ProPlus e GraphPad Prism. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

Para confirmar o fato de que MMP 9 e MMP13 estão associadas a processos de migração tumoral, o efeito da capacidade de migração individual de células de câncer de mama 4T1 expostas a NP siMMP9, NP siMMP13 e NP siScramble foi avaliado pelo ensaio de Transwell como mostrado na figura 20.

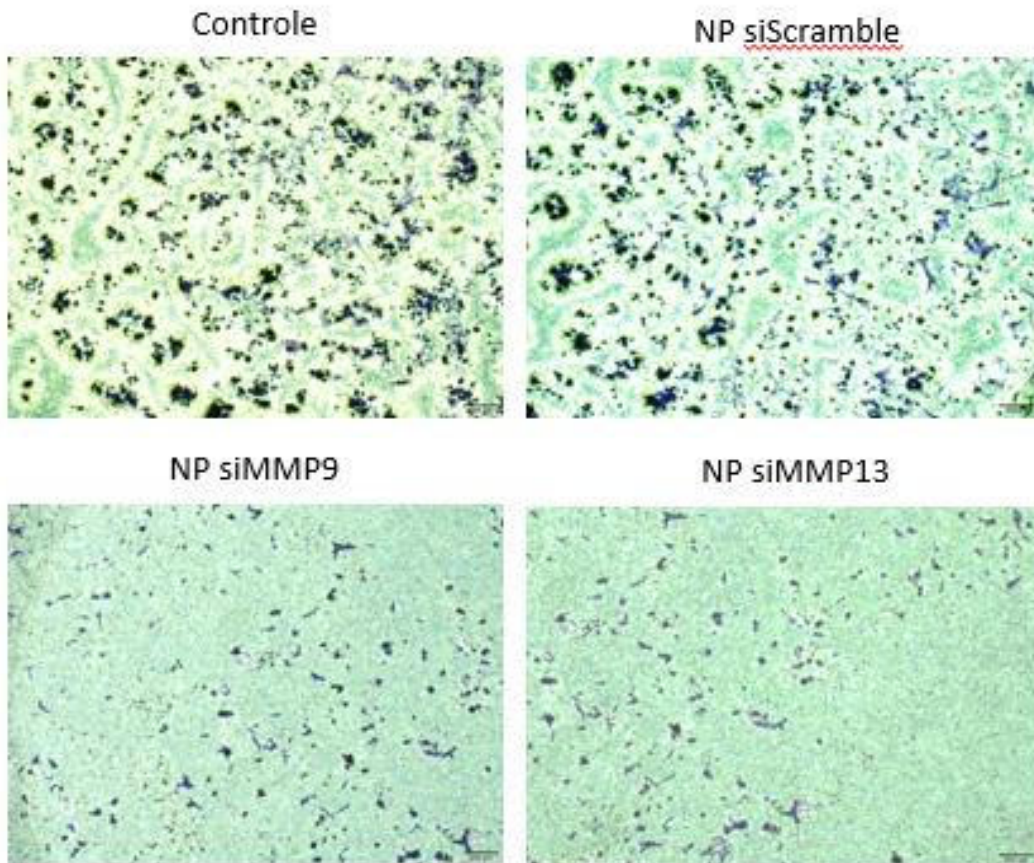


Figura 21: Avaliação da migração individual de células 4T1 encubadas com NP siMMP9, NP siMMP13 e NP siScramble por 24h. Aumento de 4x.

As células foram quantificadas utilizando o programa Image ProPlus e a análise estatística foi feita através do GraphPad Prism.

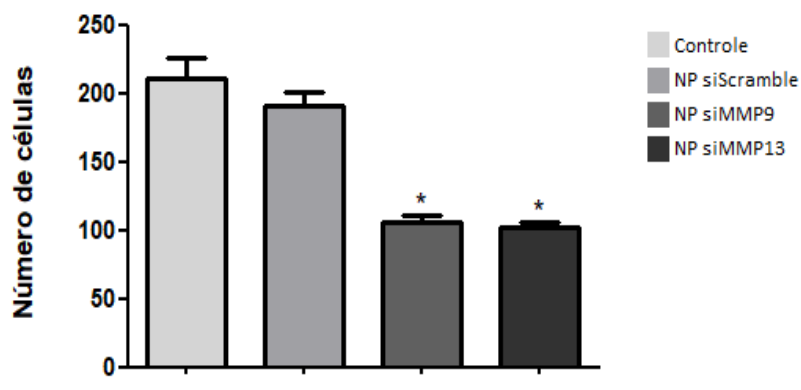


Figura 22: Capacidade de migração em células tumorais encubadas com NP siMMP9, NP siMMP13 e NP siScramble. Gráfico representa o número de células que migraram pelo Matrigel em cada transwell. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Image ProPlus e GraphPad Prism. A análise estatística foi ANOVA com  $p < 0,05$  seguido de Bonferroni.

Os resultados obtidos dos ensaios de migração celular corroboram com os dados de Moirangthem, Bondhopadhyay, & Mukherjee, 2016 que mostraram em células MDA-MB-231 a diminuição na capacidade migratória e invasiva dessas células com silenciamento de MMP9 e de Cho, Xie, Hegedu, & Eliceiri, 2008 que ao silenciar MMP13 em modelo in vitro de câncer de mama humano por meio da linhagem MDA-MB-231, obteve diminuição na migração dessas células tumorais.

A maior parte dos estudos que envolvem a diminuição da expressão de MMPs por siRNA em cânceres estão relacionados à migração e invasão de células tumorais. Pesquisas com MMP3 e silenciamento por siRNA mostraram que em células de câncer de mama humano MDA-MB-231 houve indícios do papel de MMP3 no caráter invasivo do câncer (Cho *et al.*, 2008); em condrossarcoma humano a migração celular foi inibida pelo silenciamento de MMP3 (Tang *et al.*, 2010) e em câncer gástrico, o silenciamento de MMP3 diminuiu a invasão por células tumorais (Gencer, Cebeci and Irmak-yazicioglu, 2011). O silenciamento de MMP2 em células de carcinoma de laringe apresentou resultados satisfatórios na inibição da invasão e crescimento de células tumorais (Sun *et al.*, 2008) e em modelo de retinoblastoma, o silenciamento de MMP2 e MMP9 diminuiu a migração celular e angiogênese (Webb *et al.*, 2017). O silenciamento de MMP13 em modelo de câncer oral reduziu a invasão, migração e a capacidade de adesão de células tumorais (Law et al., 2016) e em células de câncer de mama humano MDA-MB-231, siMMP13 também foi capaz de diminuir a invasão de células tumorais (Cho *et al.*, 2008).

## 5. CONCLUSÃO

Com este estudo, podemos concluir que as nanopartículas de fosfato de cálcio tem se mostrado potentes carreadores para tumores de mama *in vitro* permitindo a entrega de siRNA à célula tumoral com o consequente efeito de RNAi.

Diante disso, as metaloproteinases de matriz 9 e 13 se mostraram alvos promissores para a terapia de RNAi devido aos efeitos expressivos de redução na migração de células tumorais.

Assim, estudos que possibilitem avaliar o efeito do silenciamento de metaloproteinases de matriz 9 e 13 *in vivo* com diminuição de metástases devido à redução migratória das células tumorais se fazem necessários.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akram, M. and Siddiqui, S. (2012) 'Breast cancer management: Past, present and evolving', *Indian Journal of Cancer*, 49(3), p. 277. doi: 10.4103/0019-509x.104486.

Alizadeh, A. M., Shiri, S. and Farsinejad, S. (2014) *Metastasis review: from bench to bedside*, *Tumor Biology*. doi: 10.1007/s13277-014-2421-z.

Anders, C. K. *et al.* (2016) 'The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics', *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 36, pp. 34–42. doi: 10.14694/edbk\_159135.

Andrew Fire\*, SiQun Xu\*, Mary K. Montgomery\*, Steven A. Kostas\*†, S. E. D. & C. C. M. (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* Andrew', *Nature*, 391(February), pp. 806–811. doi: 10.1038/35888.

Arnedos, M. *et al.* (2012) 'Triple-negative breast cancer: Are we making headway at least?', *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 4(4), pp. 195–210. doi: 10.1177/1758834012444711.

Beasley, K. D. and Toms, S. A. (2011) 'The Molecular Pathobiology of Metastasis to the Brain: A Review', *Neurosurgery Clinics of NA*. Elsevier Ltd, 22(1), pp. 7–14. doi: 10.1016/j.nec.2010.08.009.

Beech, D. (2014) 'Triple Negative Breast Cancer – An Overview NIH Public Access', 2013(December), pp. 1–7. doi: 10.4172/2161-1041.S2-001.Triple.

Bray, F., Ferlay, J. and Soerjomataram, I. (2018) 'Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

Cedolini, C. *et al.* (2014) 'Type of Breast Cancer Diagnosis, Screening, and Survival', *Clinical Breast Cancer*. Elsevier Inc, 14(4), pp. 235–240. doi: 10.1016/j.clbc.2014.02.004.

Cho, H. *et al.* (2008) 'Additional MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Matrix

Metalloproteinases Promote Invasiveness', (December 2007), pp. 480–485. doi: 10.1002/jcp.21417.

Cobleigh, M. *et al.* (2007) 'Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer', *New England Journal of Medicine*, 357(26), pp. 2666–2676. doi: 10.1056/nejmoa072113.

Conde, J. *et al.* (2015) 'Dual targeted immunotherapy via in vivo delivery of biohybrid RNAi-peptide nanoparticles to tumour-associated macrophages and cancer cells', *Adv Funct Mater*, 25(27), pp. 4183–4194. doi: 10.1002/adfm.201501283.Dual.

Corkery, B. *et al.* (2009) 'Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer', *Annals of Oncology*, 20(5), pp. 862–867. doi: 10.1093/annonc/mdn710.

Criscitiello, C. *et al.* (2012) 'research article Understanding the biology of triple-negative breast cancer research article', 23(Supplement 6). doi: 10.1093/annonc/mds188.

Davies, K. J. (2014) 'The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma.', *International journal of breast cancer*, 2014, p. 839094. doi: 10.1155/2014/839094.

Davis, M. E. *et al.* (2010) 'Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7291), pp. 1067–1070. doi: 10.1038/nature08956.

DeClerck, Y. a *et al.* (2004) 'Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section.', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 164(4), pp. 1131–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63200-2.

Eliyatkın, N. *et al.* (2015) 'Molecular Classification of Breast Carcinoma : From Traditional , Old-Fashioned Way to A New Age , and A New Way', pp. 59–66. doi: 10.5152/tjbh.2015.1669.

Fentiman, I. S. (2009) 'Male breast cancer: A review', *Ecancermedicalscience*,



3(1). doi: 10.3332/ecancer.2009.140.

Figueira, R. C. S. *et al.* (2009) 'Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential.', *BMC cancer*, 9, p. 20. doi: 10.1186/1471-2407-9-20.

Gencer, S., Cebeci, A. and Irmak-yazicioglu, M. B. (2011) 'Silencing of the MMP-3 Gene by siRNA Transfection in Gastric Cancer AGS Cells'.

Hardwick, K. G., Rhee, J. and Coussens, L. M. (2002) 'RECKing MMP function : implications for cancer development', 12(5), pp. 209–211.

INCA, I. N. de C. (2014) *Portal - Instituto Nacional de Câncer - INCA, Rio de Janeiro: INCA, 2014*. Available at:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> (Accessed: 18 December 2014).

INCA, I. N. de C. J. A. G. da S. (2014) *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil, Rio de Janeiro: INCA, 2014*. Available at:

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> (Accessed: 18 December 2014).

Kakizawa, Y., Furukawa, S. and Kataoka, K. (2004) 'Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery', 97, pp. 345–356. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.03.031.

Kanasty, R. *et al.* (2013) 'Delivery materials for siRNA therapeutics', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 12(11), pp. 967–977. doi: 10.1038/nmat3765.

Kessenbrock, K., Plaks, V. and Werb, Z. (2010) 'Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment.', *Cell*, 141(1), pp. 52–67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015.

Kim, D. H. and Rossi, J. J. (2008) 'RNAi mechanisms and applications Daniel', *Biotechniques*, 44(5), pp. 613–616. doi: 10.2144/000112792.RNAi.

Klemp, J. R. (2015) 'Breast Cancer Prevention Across the Cancer Care

Continuum', *Seminars in Oncology Nursing*. Elsevier Ltd, 31(2), pp. 89–99. doi: 10.1016/j.soncn.2015.03.002.

Law, C.-H. *et al.* (2016) 'MMP-13 is involved in oral cancer cell metastasis', *Oncotarget*, 7(13). doi: 10.18632/oncotarget.7942.

Lebeau, A. *et al.* (1999) 'Tissue distribution of major matrix metalloproteinases and their transcripts in human breast carcinomas.', *Anticancer research*, 19(5B), pp. 4257–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10628384> (Accessed: 18 December 2014).

de Mello, L. J. *et al.* (2018) 'In vivo antiapoptotic gene silencing: hybrid nanoparticles as delivery system', *IFAC-PapersOnLine*. Elsevier B.V., 51(27), pp. 10–15. doi: 10.1016/j.ifacol.2018.11.666.

Merdad, A. *et al.* (2014) 'Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis', *Anticancer Research*, 34(3), pp. 1355–1366.

Moirangthem, A., Bondhopadhyay, B. and Mukherjee, M. (2016) 'Simultaneous knockdown of uPA and MMP9 can reduce breast cancer progression by increasing cell-cell adhesion and modulating EMT genes', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (January), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep21903.

Nakai, K., Hung, M. C. and Yamaguchi, H. (2016) 'A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer', *American Journal of Cancer Research*, 6(8), pp. 1609–1623. doi: 10.1109/SC.2001.10047.

Nalla, A. K. *et al.* (2010) 'Targeting MMP-9 , uPAR , and cathepsin B inhibits invasion , migration and activates apoptosis in prostate cancer cells', *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 17(9), pp. 599–613. doi: 10.1038/cgt.2010.16.

Neema Agrawal, P. V. N. Dasaradhi, Asif Mohammed, Pawan Malhotra, Raj K. Bhatnagar, and S. K. M. (2003) 'RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications', *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 67(4), pp. 657–685. doi: 10.1128/MMBR.67.4.657.

Niikura, N. *et al.* (2014) 'Treatment outcomes and prognostic factors for patients with brain metastases from breast cancer of each subtype: A multicenter retrospective analysis', *Breast Cancer Research and Treatment*, 147(1), pp. 103–112. doi: 10.1007/s10549-014-3090-8.

Nounou, M. I. *et al.* (2015) 'Breast Cancer : Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies', 9, pp. 17–34. doi: 10.4137/BCBCR.S29420.TYPE.

Oskarsson, T. (2013) 'Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis.', *Breast (Edinburgh, Scotland)*. Elsevier Ltd, 22 Suppl 2, pp. S66-72. doi: 10.1016/j.breast.2013.07.012.

Overall, C. M. and López-Otín, C. (2002) 'Strategies for MMP inhibition in cancer: Innovations for the post-trial era', *Nature Reviews Cancer*, 2(9), pp. 657–672. doi: 10.1038/nrc884.

Papavramidou, N., Papavramidis, T. and Demetriou, T. (2010) 'Ancient Greek and Greco–Roman Methods in Modern Surgical Treatment of Cancer', *Annals of Surgical Oncology*, 17(3), pp. 665–667. doi: 10.1245/s10434-009-0886-6.

Perou, C. M. *et al.* (2000) 'Molecular portraits of human breast tumours', 533(May), pp. 747–752.

Perret, G. Y. and Cre, M. (2008) 'New pharmacological strategies against metastatic spread', 22, pp. 465–492. doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00614.x.

Pittella, F. *et al.* (2011) 'Biomaterials Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity', 32, pp. 3106–3114. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.057.

Pittella, F. *et al.* (2012) 'Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate / charge-conversional polymer hybrid nanoparticles', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 161(3), pp. 868–874. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.005.

Remacle, A. G. *et al.* (2013) 'Non-destructive and selective imaging of the

functionally active, pro-invasive membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) enzyme in cancer cells.', *The Journal of biological chemistry*, 288(28), pp. 20568–80. doi: 10.1074/jbc.M113.471508.

Report, S. (2016) 'Breast cancer subtypes : morphologic and biologic characterization', 12, pp. 103–119.

Rutgers, E. J. T. *et al.* (2013) 'Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013', *Annals of Oncology*, 24(9), pp. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.

Schmadeka, R., Harmon, B. E. and Singh, M. (2014) 'Triple-negative breast carcinoma: Current and emerging concepts', *American Journal of Clinical Pathology*, 141(4), pp. 462–477. doi: 10.1309/AJCPQN8GZ8SILKGN.

Scully, O. J. *et al.* (2012) 'Breast Cancer Metastasis', 320, pp. 311–320.

Singh, A., Trivedi, P. and Jain, N. K. (2018) 'Advances in siRNA delivery in cancer therapy', *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 46(2), pp. 274–283. doi: 10.1080/21691401.2017.1307210.

Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2001) 'How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.', *Annual review of cell and developmental biology*, 17, pp. 463–516. doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.

Sun, Y. *et al.* (2008) 'Role of siRNA silencing of MMP-2 gene on invasion and growth of laryngeal squamous cell carcinoma', *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 265(11), pp. 1385–1391. doi: 10.1007/s00405-008-0684-y.

Sun, Y. *et al.* (2017) 'Risk Factors and Preventions of Breast Cancer', 13. doi: 10.7150/ijbs.21635.

Tang, C. H. *et al.* (2010) 'Involvement of matrix metalloproteinase-3 in CCL5/CCR5 pathway of chondrosarcomas metastasis', *Biochemical Pharmacology*, 79(2), pp. 209–217. doi: 10.1016/j.bcp.2009.08.006.

Verma, A. and Stellacci, F. (2010) 'Effect of surface properties on nanoparticle-

cell interactions', *Small*, 6(1), pp. 12–21. doi: 10.1002/sml.200901158.

Verma, R. K. *et al.* (2015) 'Anthothecol-encapsulated PLGA nanoparticles inhibit pancreatic cancer stem cell growth by modulating sonic hedgehog pathway', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 11(8), pp. 2061–2070. doi: 10.1016/j.nano.2015.07.001.

Vizoso, F. J. *et al.* (2007) 'Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer.', *British journal of cancer*, 96(6), pp. 903–11. doi: 10.1038/sj.bjc.6603666.

Webb, A. H. *et al.* (2017) 'Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma', *BMC Cancer*. BMC Cancer, 17(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s12885-017-3418-y.

Whitehead, K. A., Langer, R. and Anderson, D. G. (2009) 'Knocking down barriers: advances in siRNA delivery', 8(FEBRUARY). doi: 10.1038/nrd2742.

Wolf, K. and Friedl, P. (2006) 'Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity.', *The British journal of dermatology*, 154 Suppl, pp. 11–15. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07231.x.

Yilmaz, M., Christofori, G. and Lehenbre, F. (2007) 'Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis', *Trends in Molecular Medicine*, 13(12), pp. 535–541. doi: 10.1016/j.molmed.2007.10.004.

Yu, Q. and Stamenkovic, I. (1999) 'Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion', *Genes & Development*, 13(1), pp. 35–48. doi: 10.1101/gad.13.1.35.

Yu, W.-H. *et al.* (2002) 'CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling.', *Genes & development*, 16(3), pp. 307–23. doi: 10.1101/gad.925702.

Zhang, J., Li, X. and Huangb, L. (2014) 'Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer', *J Control Release*, 71(11), pp. 3831–3840. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4002.BONE.

