

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

**Ana Beatriz Caribé dos Santos Valle**

**SILENCIAMENTO DO GENE HOXB7 EM LINHAGEM DE CÂNCER DE  
MAMA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CONTENDO siRNA E  
CO-TRATAMENTO COM TAMOXIFENO**

JUIZ DE FORA - MG

2019

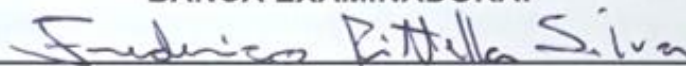
ANA BEATRIZ CARIBÉ DOS SANTOS VALLE

SILENCIAMENTO DO GENE HOXB7 EM LINHAGEM DE CÂNCER DE MAMA  
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CONTENDO SIRNA E CO-  
TRATAMENTO COM TAMOXIFENO

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 14 / 02 / 2019.

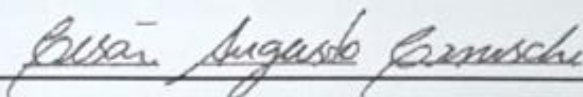
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

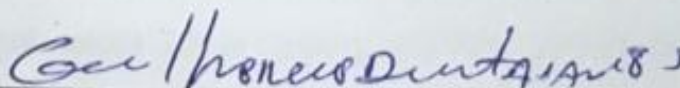
Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. César Augusto Caneschi

Fundação Presidente Antônio Carlos - Ubá



Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Universidade Federal de Juiz de Fora

## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço a meus pais, Ana Cristina Caribé e Raúl René Valle, pelo amor e carinho. Pelas oportunidades e pela base que me passaram que me fizeram ser quem sou. Gostaria de agradecer a minha família, meus avós, tios, tias, primas e primos pelo apoio. Vocês foram e são muito importantes. Amo vocês!

Aos meus queridos amigos de todas as horas, a distância não influencia em nada o carinho e a força que me dão.

Ao Professor Frederico Pittella, pela orientação, oportunidade, apoio e otimismo sempre.

À Professora Jacy Gameiro por permitir a minha presença no seu grupo de pesquisa e me acolher como se fosse do mesmo.

À Ana Gualberto por me receber de braços abertos, pelos ensinamentos e pela amizade.

Às amigas e ICs mais lindas do LDNano, Milena, Fernanda, Ana e Kézia por sempre estarem dispostas a me ajudar, tornarem o trabalho mais prazeroso e pelas boas risadas.

Aos amigos do mestrado, Judith, Diana e Hyago e aos amigos do Anão por fazer meus dias mais leves, pela amizade, paciência, descontração e carinho.

Ao Professor Humberto de Mello Brandão por permitir a utilização dos equipamentos da EMBRAPA

À doutora Camila Guimarães pela ajuda, disponibilidade e risadas.

À Professora Tânia Creczynski-Pasa por permitir a minha visita ao laboratório do GEIMM.

À doutoranda Gabriela Souza, sempre disponível e disposta a nos ajudar com toda a sua experiência e competência.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC pela realização das imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos funcionários da UFJF por sempre estarem dispostos a ajudar e resolver os problemas diários.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para o meu crescimento profissional.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro

A todos, OBRIGADA!

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.*

Marcel Proust

## RESUMO

O câncer é a segunda principal causa de morte mundialmente e responsável por aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018. Dentre os casos de câncer em mulheres, o câncer de mama é o segundo tipo mais comum e o que mais mata no Brasil e no mundo. Entre os tratamentos convencionais, os mais comuns são cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia. No entanto, esses tratamentos promovem diversos efeitos colaterais, e por isso, terapias direcionadas estão emergindo. Entre elas, pode-se citar a terapia por RNA interferente (RNAi) que consiste no silenciamento gênico a partir da degradação do RNA mensageiro (RNAm) do gene-alvo pelo pareamento específico de pequenas moléculas de RNA interferente (siRNA). Dentre os genes chave de importância no câncer, o gene HOXB7 atua em diversas vias metabólicas do câncer de mama receptor de hormônio positivo, como sobrevivência e proliferação celular, além de atuar também, na resistência a drogas utilizadas na hormonioterapia, como o tamoxifeno. No entanto, para o silenciamento de tal gene pelo efeito de RNAi, é necessária a utilização de nanocarreadores para transpor as barreiras biológicas. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi realizar o silenciamento do gene HOXB7 na linhagem MCF7 de câncer mamário humano utilizando nanopartículas híbridas (NPs) carregando siRNA e a eficácia do co-tratamento com a droga tamoxifeno em concentrações subtóxicas. Primeiramente, nanopartículas de fosfato de cálcio estabilizadas por copolímeros em bloco contendo polietilenoglicol (PEG) foram formadas por auto-associação a partir de mistura estequiométrica dos constituintes. As NPs apresentaram diâmetros hidrodinâmicos médios de  $87,9\text{nm} \pm 0,9$  e  $104,9\text{nm} \pm 0,4$  e índice de polidispersividade (PDI) de  $0,100 \pm 0,009$  e  $0,123 \pm 0,008$  para NP-siHOXB7 e NP-*mock* (sem siRNA), respectivamente, com morfologia arredondada e homogênea. O potencial Zeta de ambas NPs foi próxima ao neutro, indicando a presença do polímero PEG na sua superfície. A eficiência de encapsulação do siRNA foi de aproximadamente 65%. O teste de estabilidade mostrou que as NPs foram estáveis por 7 dias quando armazenadas em temperatura de 4°C. Não houve redução da viabilidade celular de células de câncer de mama após tratamento com as NPs híbridas carregando siRNA contra o gene HOXB7 em 24h. No entanto, houve redução da viabilidade ( $p < 0,05$ ) das mesmas células a partir de 48h com tratamento de NPs carregando concentração final de siRNA de 150nM. O sinergismo do co-tratamento de NPs-siHOXB7 e TAM foi observado já em 15h. Ainda, a partir desses ensaios foi possível constatar que o sistema nanoestruturado utilizado mostrou pouca ou nenhuma citotoxicidade, uma vez que não houve redução de viabilidade no tratamento com a nanopartícula *mock*. O silenciamento de 65% ( $p < 0,05$ ) foi observado, assim como a internalização das nanopartículas por microscopia confocal. Assim, pode-se concluir que as nanopartículas utilizadas são eficientes na transfecção de células MCF7 e que o silenciamento gênico de HOXB7 utilizando como sistema de entrega as nanopartículas híbridas, combinado ao tamoxifeno se mostra como uma opção promissora para o tratamento de câncer de mama positivo para receptor de estrogênio.

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

## ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death in the world and accounted for approximately 9.6 million deaths in 2018. Among the cases of cancer in women, breast cancer is the second most common type and the one that kills the most in Brazil and in the world. Among the conventional treatments, the most common are surgery, radiotherapy, chemotherapy and hormone therapy. However, these treatments promote several side effects, and therefore, targeted therapies are emerging. Among them, we can mention interfering RNA therapy (RNAi) consisting of gene silencing from messenger RNA degradation (mRNA) of the target gene by the specific pairing of small interfering RNA molecules (siRNA). Among the key genes of importance in cancer, the HOXB7 gene acts on several metabolic pathways of hormone receptor-positive breast cancer, such as cell survival and proliferation, and also acts on resistance to drugs used in hormone therapy such as tamoxifen. However, for the silencing of such a gene by the effect of RNAi, the use of nanocarriers is required to transverse the biological barriers. The objective of this study was to perform the silencing of the HOXB7 gene in the human mammary cancer MCF7 strain using hybrid nanoparticles (NPs) carrying siRNA and the efficacy of co-treatment with the drug tamoxifen in subtoxic concentrations. First, calcium phosphate nanoparticles stabilized by block copolymers containing polyethylene glycol (PEG) were formed by self-association from a stoichiometric mixture of the constituents. The NPs had mean hydrodynamic diameters of  $87.9\text{nm} \pm 0.9$  and  $104.9\text{nm} \pm 0.4$  and polydispersity index (Pdl) of  $0.100 \pm 0.009$  and  $0.123 \pm 0.008$  for NP-siHOXB7 and NP-*mock* (without siRNA), respectively, with rounded and homogeneous morphology. The Zeta potential of both NPs was close to the neutral, indicating the presence of the PEG polymer on its surface. The siRNA encapsulation efficiency was approximately 65%. The stability test showed that the NPs were stable for 7 days when stored at 4 ° C. There was no reduction of the cell viability of breast cancer cells after treatment with the hybrid NPs carrying siRNA against the HOXB7 gene in 24h. However, there was a reduction in viability ( $p < 0.05$ ) of the same cells from 48h with treatment of NPs carrying final siRNA concentration of 150nM. The synergism of co-treatment of NPs-siHOXB7 and TAM was observed as early as 15h. Also, from these tests it was possible to verify that the nanostructured system used showed little or no cytotoxicity, since there was no reduction of viability in the treatment with the mock nanoparticle. The 65% ( $p < 0.05$ ) silencing was observed, as well as the internalization of the nanoparticles by confocal microscopy. Thus, it can be concluded that the nanoparticles used are efficient in the transfection of MCF7 cells and that the gene silencing of HOXB7 using as a delivery system the hybrid nanoparticles combined with tamoxifen is shown as a promising option for the treatment of positive breast cancer for estrogen receptor.

**Keywords:** RNAi therapy, calcium phosphate, siRNA, nanocarrier, HOXB7, tamoxifen.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do fármaco tamoxifeno.	21
Figura 2	Via de ação do tamoxifeno utilizado na hormonioterapia contra o câncer de mama positivo para receptores de hormônio.	22
Figura 3	Mecanismo de interferência por RNA que ocorre naturalmente em células eucariotas.	24
Figura 4	Organização dos genes HOX em clusters.	26
Figura 5	Vias metabólicas em que o gene HOXB7 está envolvido.	27
Figura 6	Relação entre tamoxifeno e HOXB7 na via de sinalização de câncer de mama resistente ao tamoxifeno.	31
Figura 7	Mecanismo de ação passivo das nanopartículas através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada.	34
Figura 8	Representação da nanopartícula híbrida formada pelo núcleo inorgânico composto por fosfato de cálcio, com siRNA complexado, e pelo revestimento orgânico formado pelo bloco de copolímero PEG-poliânion.	39
Figura 9	Indicação do sítio de ligação do siRNA ao éxon 2 do RNA mensageiro do gene <i>HOXB7</i> .	51
Figura 10	Histograma de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas híbridas ponderados por intensidade (%), para (A) NP-siHOXB7 e (B) NP-mock.	53
Figura 11	Imagem da morfologia de nanopartículas de fosfato de cálcio/PEG-PGlu obtidas com MET.	55
Figura 12	Estabilidade coloidal de NP-siHOXB7 estocadas em 4°C e a temperatura ambiente (T.A.).	59
Figura 13	Estabilidade coloidal de NP-mock estocadas em 4°C.	60
Figura 14	Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama MCF7 após incubação com NP-siHOXB7 em diferentes concentrações.	61
Figura 15	Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama MCF7 após incubação com NP-siHOXB7	63

(100nM) e tratamento conjunto com tamoxifeno.

- Figura 16 Expressão do gene HOXB7 em células de câncer de mama MCF7 após tratamento com NP-siHOXB7. 65
- Figura 17 Localização intracelular das nanopartículas híbridas. 68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições da reação de qPCR para o gene HOXB7	47
Tabela 2. Sequências de siRNAs utilizadas	49
Tabela 3. Estudo de formulação de nanopartículas carreando siRNA com diferentes concentrações de PEG-PGlu	51
Tabela 4. Resumo da caracterização das nanopartículas híbridas a partir das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz e Mobilidade Eletroforética	55

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4EBP1 – Gene fator de iniciação eucariótico 4E ligante a proteína 1  
AF-1 – Ativador de função 1  
AF-2 – Ativador de função 2  
Ago2 – Argonauta 2  
AKT – Oncogene V-akt viral de timoma murino homólogo  
Ang-2 – Gene angiogenina 2  
ANOVA – Análise de variância  
ATCC – Coleção americana de tipos de cultura (do inglês *American Type Culture Collection*)  
BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro  
BLAST – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*)  
CCND1 – Gene ciclina D1  
CD31 – Gene molécula 1 de adesão celular endotelial e de plaqueta  
COX-2 – Gene subunidade 2 oxidase do citocromo C  
DAPI - Dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole  
DLS – Espalhamento dinâmico de luz (do inglês *Dynamic Light Scattering*)  
DMSO - dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DNAc – DNA complementar  
EGFR – Gene receptor do fator de crescimento epidermal  
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária  
EPR – Efeito de permeabilidade e retenção aumentada  
ERE - Elemento de resposta ao estrogênio  
ER $\alpha$  - Receptor de estrogênio  $\alpha$   
FDA – Administração de comidas e drogas (do inglês *Food and Drug Administration*)  
FGF – Gene fator de crescimento de fibroblasto  
FGF2 – Gene fator 2 de crescimento de fibroblasto  
FGFR – Gene receptor do fator de crescimento de fibroblasto  
GREB1 – Gene receptor de ligação 1 da regulação de crescimento do estrogênio  
GRO $\alpha$  – Oncogene  $\alpha$  relacionado ao crescimento  
HEPES - Ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico]  
HER2 – Gene receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2  
HOX – Gene *homeobox*  
HOXB7 – Gene *homeobox* B7  
IC50 – Concentração inibitória de 50%  
IL-8 – Gene isoleucina-8  
Ki67 – Marcador de proliferação Ki67  
MAPK – Gene proteínas quinase ativadas por mitógenos  
MET – Microscopia de transmissão eletrônica  
miRNA - microRNA  
MMP9 – Gene metaloproteinase de matriz 9  
MMPs – Metaloproteinases de matriz  
*Mock* – Nanopartícula sem siRNA  
MTT - Brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio

MWCO – Corte de peso molecular (do inglês *Molecular Weight Cut-Off*)  
MYC – Oncogene mielocitomatose  
*Naked* – siRNA livre  
NP - Nanopartícula  
Pdl – Índice de polidispersividade  
PEG - Polietilenoglicol  
PEG-PGlu – Polietilenoglicol-poliânion-ácido glutâmico  
pH – potencial de hidrogênio  
PIWI – Gene testículos Wimpy induzidos por Elemento P  
PTKs – Proteínas tirosina quinase  
qPCR – PCR quantitativo ou PCR em tempo real  
Raf – Proto-oncogene proteína serina/treonina quinase  
Ras – Gene vírus sarcoma RA<sub>t</sub> (do inglês *RA<sub>t</sub> Sarcoma vírus*)  
RE – Receptor de estrogênio  
RE $\alpha$  – Receptor de estrogênio  $\alpha$   
RhoA – Gene homólogo da família Ras, membro A  
RISC - Complexo de silenciamento induzido por RNA  
RNA – Ácido ribonucléico  
RNAi – RNA interferente  
RNAm – RNA mensageiro  
RP – Receptor de progesterona  
RPMI – Meio de cultura Instituto memorial Roswell Park (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*)  
S6K – Gene proteína quinase ribossomal S6  
*Scramble* – Sequência de siRNA não complementar  
SFB – Soro fetal bovino  
siHOXB7 – Pequeno RNA interferente do gene HOXB7  
siRNA – Pequeno RNA interferente  
SMAD3 – Gene membro 3 da família SMAD  
TAM - Tamoxifeno  
TGF $\beta$  – Gene fator de crescimento de transformação beta  
TGF $\beta$ 2 – Gene fator de crescimento de transformação beta 2  
TRBP – Gene proteína ligadora de RNA TAR  
TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano  
TRIS-HCL – Tris (hidroximetil) aminometano ajustado com ácido clorídrico  
TTR – gene/proteína transtirretina  
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

°C – Graus Celsius  
kDa – kilodalton  
 $\mu$ g - Micrograma  
 $\mu$ L - Microlitro  
 $\mu$ M - Micromolar  
M - Molar  
mL - Mililitro  
mV - Milivolts  
nM - Nanomolar

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
2.1 CÂNCER DE MAMA.....	18
2.2 TAMOXIFENO.....	20
2.3 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA.....	23
2.4 FAMÍLIA DE GENES HOMEBOX E O GENE HOXB7 .....	25
2.4.1 Relação entre tamoxifeno e HOXB7 .....	29
2.5 NANOCARREADORES.....	32
2.5.1 Nanopartículas de fosfato de cálcio.....	37
2.5.2 Copolímeros em bloco.....	38
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 MATERIAIS.....	41
4.2 CONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE siRNA E PRIMERS.....	41
4.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS .....	42
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS .....	43
4.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersão das nanopartículas híbridas .....	43
4.4.2 Determinação do potencial Zeta das nanopartículas .....	43
4.4.3 Determinação da morfologia da nanopartículas .....	44
4.4.4 Eficiência de encapsulação de siRNA.....	44
4.4.5 Estabilidade coloidal das nanopartículas.....	45
4.5 CULTURA CELULAR.....	45
4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT .....	46
4.7 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO SISTEMA NANOCARREADOR.....	47
4.7.1 Extração RNA.....	47
4.7.2 Síntese de DNA complementar (DNAc).....	47
4.7.3 PCR quantitativo.....	47
4.8 INTERNALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS.....	48
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
5.1 SEQUÊNCIAS DE siRNAs.....	50
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS .....	51
5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE siRNA .....	57
5.4 ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NANOPARTÍCULAS .....	58
5.5 VIABILIDADE CELULAR .....	60
5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	65
5.7 INTERNALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS.....	67
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento e proliferação celular descontrolado em determinado tecido. Mundialmente, é a segunda maior causa de mortes, sendo que a cada seis fatalidades, uma é devido ao câncer. Para esta enfermidade, espera-se 9.6 milhões de mortes apenas em 2018 (WHO, 2018).

O câncer de mama é o segundo tipo mais incidente em mulheres no Brasil e no mundo, e também, aquele que mais causa mortes no gênero feminino (BRASIL, 2018a; BRAY *et al.*, 2018). A cada três casos de câncer de mama, dois são do tipo positivo para receptores de hormônios, evidenciando a importância do estudo desse subtipo molecular (ACS, 2018a).

Existem diversos tratamentos direcionados para estas doenças. Eles podem ser divididos em locais e sistêmicos. Dentre os locais podem ser citados a cirurgia conservativa ou mastectomia e a radioterapia. Entre os sistêmicos, os principais são quimioterapia e hormonioterapia. O tamoxifeno é uma droga utilizada na hormonioterapia que ora age como agonista, ora como antagonista do receptor de estrógeno. Na mama, esse modulador é antagonista, bloqueando a cascata de sinalização de proliferação celular desencadeada pela ligação do estrogênio ao seu receptor (ACS, 2018b).

Apesar da grande contribuição que o tamoxifeno promoveu na sobrevivência de pacientes portadores de tumores positivos para receptores hormonais (JORDAN, 2007), existe uma elevada taxa de desenvolvimento de resistência de células cancerígenas a esta droga. Ainda, os tratamentos comumente utilizados não atingem somente células tumorais, mas também células saudáveis, promovendo diversos efeitos colaterais (ACS, 2018b).

Devido a isso, tratamentos direcionados estão sendo cada vez mais explorados devido a sua especificidade. O mecanismo de interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo natural encontrado em eucariotos que atua na defesa contra materiais genéticos exógenos e na regulação da expressão gênica (ALMEIDA; ALLSHIRE, 2005). A terapia por RNAi se baseia nesse mecanismo, onde pequenas moléculas de RNA complementares a RNAs



mensageiros (RNAm) específicos bloqueiam a tradução ou degradam o RNAm (MENCK, 2010).

Para que a utilização do efeito de RNAi como terapia seja eficaz, genes chaves na progressão do câncer de mama devem ser selecionados. Os genes *Homeobox* codificam fatores de transcrição que possuem papel crucial na embriogênese. Alterações na expressão dessa família já são conhecidas por causar anomalias neoplásicas (SHAH; SUKUMAR, 2010). Dentre os genes integrantes, o HOXB7 age em diversas vias metabólicas do câncer como proliferação celular, angiogênese, invasão, reparo do DNA, sobrevivência celular e resistência a drogas, como tamoxifeno (CARE *et al.*, 1996; WU *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2012; RUBIN *et al.*, 2007).

Estudos apontam relação entre a expressão do gene HOXB7 e a resistência de tumores hormônio positivos ao tamoxifeno. A terapia combinada de concentrações subtóxicas de tamoxifeno em conjunto com o silenciamento do gene HOXB7 a partir do mecanismo de RNAi é uma alternativa promissora no combate ao câncer de mama (JIN *et al.*, 2015). No entanto, a molécula de siRNA (pequeno RNA interferente) enfrenta algumas barreiras que impossibilitam a administração do mesmo em sua forma livre (GUO *et al.*, 2011). Por isso, a utilização de nanocarreadores vem ganhando destaque por promover especificidade de alvo e controle na liberação de fármacos (PITTELLA *et al.*, 2011), além de causar redução significativa da toxicidade e resposta imune. Dentre eles, as nanopartículas de fosfato de cálcio revestidas com polietilenoglicol (PEG) tem se destacado por não utilizar solventes orgânicos e devido à facilidade de produção por auto-associação (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002).

Diante do exposto, o presente estudo irá apresentar uma abordagem de terapia combinada contra o câncer de mama receptor de hormônio positivo por tamoxifeno e silenciamento do gene HOXB7 através do mecanismo de RNAi. Para isso, nanopartículas híbridas serão utilizadas como ferramenta para a entrega eficaz de siRNAs responsáveis pela degradação do RNAm alvo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama faz parte de um grupo de doenças que possuem em comum o crescimento e proliferação celular descontrolado. É o segundo tipo de câncer mais incidente em mulheres, representando 25% dos cânceres em mulheres no mundo (BRAY *et al.*, 2018) e 29,5% no Brasil (BRASIL, 2018a). Para o biênio 2018-2019 são estimados quase 120 mil novos casos no Brasil. Ainda, o câncer de mama é considerado o tipo de câncer que mais provoca mortes entre mulheres no mundo (BRASIL, 2018a) e no Brasil (BRASIL, 2015).

Pode ser originado de forma hereditária ou provocado pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos. O primeiro, diz respeito à fatores geneticamente pré-determinados e o segundo à fatores ambientais e comportamentais. Mutações hereditárias são a causa de 5% a 10% dos cânceres de mama, mas, na maioria dos casos, o câncer de mama não possui uma causa única e sua formação é uma combinação de diversos fatores. Uns dos principais fatores de risco desse tipo de câncer é o sexo e a idade. Mulheres acima de 50 anos são mais suscetíveis a desenvolver a doença, enquanto apenas 1% das ocorrências de câncer de mama acometem homens. Isso se deve a fatores endócrinos como a longa exposição ao estrogênio, menarca precoce, menopausa tardia e uso de contraceptivos orais. Os fatores ambientais mais frequentes são ingestão de álcool, obesidade, exposição à radiação ionizante, tabagismo e sedentarismo, dentre outros. (BRASIL, 2018b).

O câncer de mama pode ser classificado considerando aspectos histológicos e morfológicos ou aspectos moleculares. Na mama, esse tumor pode ser originado nos ductos lactíferos ou nos lóbulos mamários. Por isso, os principais tipos, levando em conta a classificação histológica, são os carcinomas ductal *in situ*, ductal invasivo, lobular *in situ* e lobular invasivo (MALHOTRA *et al.*, 2010).

Em 2011 foi apresentada uma nova classificação dos subtipos de câncer de mama no Painel de Especialistas na Conferência Internacional de Câncer de Mama de St. Gallen, baseada nas características moleculares (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; SIERRA *et al.*, 2014). Esta classificação é realizada a partir de análises imuno-histoquímicas que verificam a presença de alguns marcadores moleculares, entre eles os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2) e Ki67, uma proteína expressa nas fases do ciclo celular, que indica proliferação celular (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011).

Levando em consideração esses aspectos o câncer de mama pode ser dividido em quatro principais subtipos. O Triplo-negativo é o tipo mais agressivo com alta taxa de proliferação e maior taxa de metástase. Suas principais características são ausência de expressão dos receptores hormonais e do receptor HER2. O tipo Superexpressor de HER2 possui duplicação da expressão deste gene e ausência de receptores hormonais, além de alta taxa de proliferação, levando a um pobre prognóstico. O Luminal A é o subtipo mais comum e com melhor prognóstico. Possui origem no epitélio luminal dos ductos, reduzida taxa de proliferação (abaixo de 14%), expressão de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e ausência de HER2. Por fim, o subtipo Luminal B difere do A pela oscilação de expressão do receptor de progesterona e de HER2 e taxa de proliferação acima de 14% (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; EROLES *et al.*, 2012; SIERRA *et al.*, 2014; BARROS; LEITE, 2015), resultando em mal prognóstico (EROLES *et al.*, 2012).

O tipo molecular do câncer, pode ser uma característica determinante na escolha do tratamento mais eficaz (MALHOTRA *et al.*, 2010), aumentando as chances de cura principalmente quando o câncer for diagnosticado precocemente (BRASIL, 2018c).

Os procedimentos atuais mais utilizados para o tratamento de câncer de mama são divididos em locais e sistêmicos. Os tratamentos locais são mais usados em estágios menos avançados do câncer e incluem a cirurgia, que pode ser conservativa ou mastectomia, e a radioterapia, que utiliza emissão de radiação ionizante para eliminação das células cancerosas proveniente de uma fonte externa ou interna (braquiterapia). Alguns efeitos colaterais da radioterapia incluem inchaço do seio e mudanças de pele na área

tratada, além de problemas na amamentação, danos nos nervos dos braços, linfedema e raramente, angiossarcoma (NIH, 2017; BRASIL, 2018e; ACS, 2018b).

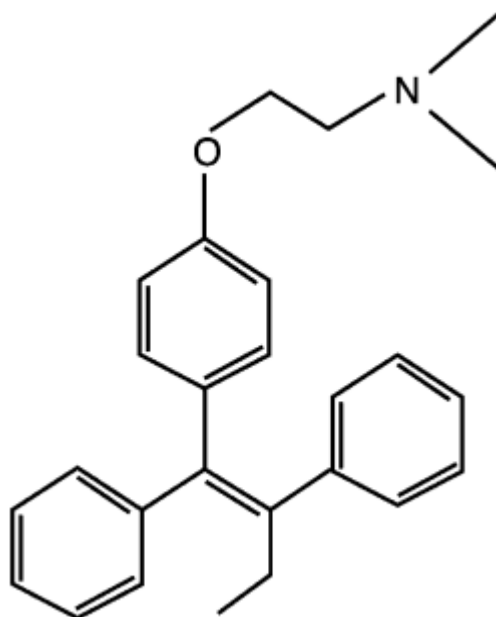
Os tratamentos sistêmicos mais comuns incluem a quimioterapia e hormonioterapia. A quimioterapia envolve a administração de medicamentos que visam destruir as células interferindo na divisão celular. No entanto, esses medicamentos agem de forma inespecífica e por isso causam inúmeros efeitos colaterais, principalmente, em tecidos em que as células se dividem mais rapidamente, sendo os mais comuns a perda de pelos, náuseas, vômitos, diarreia, além de aumentar a chance de infecções, problemas de fertilidade, de coração e aumento no risco de leucemia (NIH, 2015a; BRASIL, 2018f; ACS, 2018).

Diversos tipos de câncer dependem da ação de hormônios para a proliferação e sobrevivência celular. Existem diversas estratégias de manipulação dos hormônios para interferir no crescimento tumoral, como a retirada cirúrgica de glândulas endócrinas, administração de doses suprafisiológicas de hormônios ou pela administração de fármacos que irão agir como inibidores da síntese de hormônios ou competidores de receptores de hormônio (NIH, 2015b; ACS, 2018). No caso do estrogênio, a sua ligação ao seu receptor promove a proliferação celular das células de câncer. Dessa forma, esses fármacos impedem a síntese ou a ligação de hormônios aos seus receptores, respectivamente. Um dos fármacos mais utilizados nesse tipo de terapia é o tamoxifeno, pertencente à classe de competidores de estrógeno (ACS, 2018).

## **2.2 TAMOXIFENO**

Aproximadamente 70% dos pacientes diagnosticados com câncer de mama são dos subtipos moleculares Luminal A ou B que apresentam receptor de estrogênio positivo (HARVEY *et al.*, 1999). Devido a isso, tratamentos endócrinos são os mais recomendados para esses subtipos, sendo que o fármaco tamoxifeno ainda é um dos mais utilizados (EROLES *et al.*, 2012; SIERRA *et al.*, 2014).

O tamoxifeno (Figura 1) foi sintetizado na década de 1970 a partir do desenvolvimento de um composto que, em ratos, agia como contraceptivo, mas que em humanos induzia a ovulação. Em testes relacionados à terapia de câncer de mama, o tamoxifeno obteve resultados positivos, principalmente por ser menos tóxico que outros fármacos utilizados na época (JORDAN, 2007).

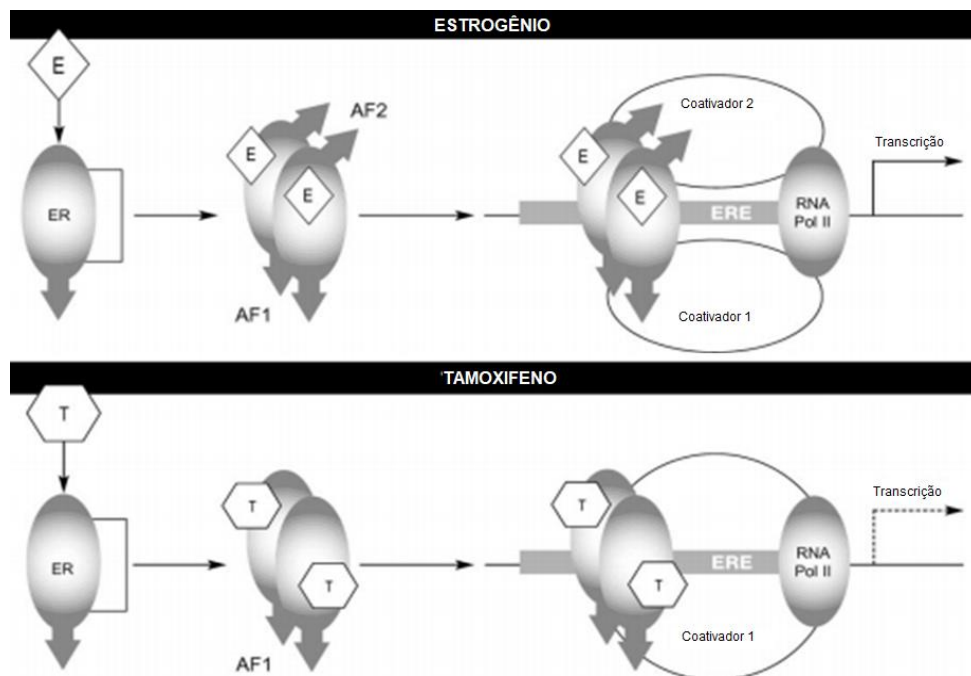


**Figura 1.** Estrutura química do fármaco tamoxifeno (Fonte: CLEMONS; DANSON; HOWELL, 2002)

O tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno, ou seja, age de diferentes formas nos diversos tecidos podendo inibir ou estimular a ação do hormônio. Na mama tem ação antagonista ao receptor de estrogênio, isto é, age bloqueando a regulação gênica promovida pela ligação do estradiol ao seu receptor, que está principalmente relacionado à proliferação celular (ACS, 2018).

Em condições normais, o estradiol se liga ao seu receptor, que irá sofrer homodimerização e posteriormente o mesmo se deslocará para o núcleo aonde se liga ao elemento de resposta ao estradiol (ERE). Os domínios ativadores de função 1 e 2 (AF-1 e AF-2) presentes no complexo se ligam a coativadores de transcrição, regulando a expressão gênica pela RNA polimerase II (Figura 2). Sendo assim, o receptor de estrogênio age como um fator de transcrição. No entanto, na hormonioterapia utilizando o tamoxifeno, o

AF-2 é inativado, reduzindo a expressão gênica e por consequência, a proliferação celular (HOWELL *et al.*, 2000; CLEMONS; DANSON; HOWELL, 2002).



**Figura 2.** Via de ação do tamoxifeno utilizado na hormonioterapia contra o câncer de mama positivo para receptores de hormônio. E: estradiol; ER: receptor de estrogênio; ERE: elemento de resposta do estradiol; RNA Pol II: RNA polimerase II; T: tamoxifeno; AF-1: ativador de função 1; AF-2: ativador de função 2 (Fonte: CLEMONS; DANSON; HOWELL, 2002 com modificações).

Uma vez que os fármacos utilizados na hormonioterapia não atingem apenas células cancerígenas, células saudáveis do organismo também são danificadas (ACS, 2018). Ainda, alguns efeitos colaterais preocupantes do tamoxifeno são a grande incidência de câncer endometrial e eventos tromboembólicos (LEITE *et al.*, 2010). Além disso, a administração de tamoxifeno já foi relacionada ao aumento da expressão do gene VEGF em câncer, responsável pela angiogênese (DU *et al.*, 2014).

Aproximadamente 40% da recorrência de câncer de mama positivo para receptores de hormônio não respondem à terapia endócrina. Alguns mecanismos que promovem a resistência a hormonioterapia são a falta da expressão do receptor de hormônio (HOEFNAGEL *et al.*, 2012), superexpressão de receptores tirosina quinase, como EGFR e HER2 (NEWBY

*et al.*, 1997), mutação no gene que expressa o receptor de estrogênio, *ESR1* (JOSELSON *et al.*, 2015) e a inatividade dos alelos do citocromo P450, responsável pela metabolização dos medicamentos (MUSGROVE; SUTHERLAND, 2009).

Assim, as células cancerígenas expostas ao tratamento com tamoxifeno podem frequentemente adquirir resistência à droga (CLEMONS; DANSON; HOWELL, 2002). Por isso, o estudo de tratamentos que sejam eficientes e com ação direcionada para as células cancerígenas se faz necessário.

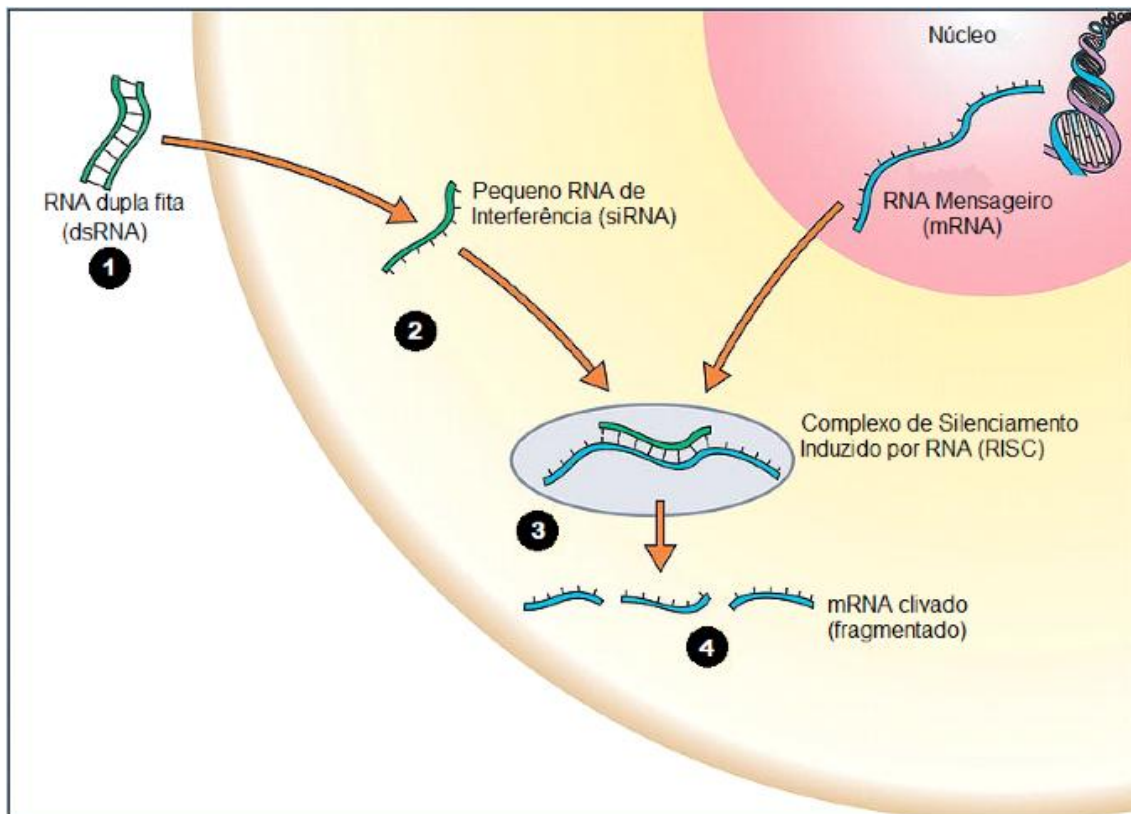
### 2.3 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA

A terapia por RNA interferente (RNAi) se baseia no mecanismo de interferência por RNA. Este é um mecanismo bem conservado e ocorre naturalmente em todos os eucariotos (FIRE, 1999; BERNSTEIN *et al.*, 2001; MATZKE *et al.*, 2001) e foi descrito em 1998 por Fire e colaboradores enquanto estudavam a interferência na expressão gênica em *Caenorhabditis elegans* (FIRE *et al.*, 1998).

Esse mecanismo foi primeiramente reconhecido como um mecanismo de defesa contra elementos transponíveis (TABARA *et al.*, 1999) e elementos exógenos (ALMEIDA; ALLSHIRE, 2005), principalmente vírus de RNA (TENLLADO; DIAZ-RUIZ, 2001). Mais tarde foi amplamente utilizado na descoberta de função gênica (WIANNY; ZERNICKA-GOETZ, 2000). Atualmente, esse mecanismo vem sendo explorado para uso diagnóstico (DAI *et al.*, 2007; IORIO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2012) e como terapia em diversas doenças (MENCK, 2010).

Brevemente, o mecanismo de RNAi (Figura 3) consiste na transcrição da molécula precursora dsRNA e processamento da mesma pela enzima Dicer em siRNAs ou miRNAs de aproximadamente 22 pb com extremidade 3' com dois nucleotídeos livres e extremidade 5' com um fosfato (BERNSTEIN *et al.*, 2001; ELBASHIR *et al.*, 2001a). O pequeno RNA é carregado na proteína Ago2 pelo complexo Dicer-TRBP-Ago2 (CHENDRIMADA *et al.*, 2005). A presença da extremidade 5' fosfato é

importante para a estabilidade e fidelidade da ligação siRNA-Ago2 e como guia de clivagem do RNAm-alvo (RIVAS *et al.*, 2005). A própria *Dicer* possui um domínio onde uma enzima helicase se liga, separando a dupla fita de siRNA. Assim, o domínio PIWI da Ago2 cliva a fita *sense* da dupla fita de RNA ao meio e incorpora a fita *antisense* ao RISC (RAND *et al.*, 2004; 2005; RIVAS *et al.*, 2005). Com a incorporação da fita *antisense*, o RISC é ativado e está pronto para pareamento e clivagem do seu RNAm-alvo, que ocorre geralmente na região 3' não traduzida do RNAm (MENCK, 2010; PIERCE, 2016). A Ago2 cliva esse RNAm entre os pares de base 10 e 11 da extremidade 5' do pequeno RNA (ELBASHIR *et al.*, 2001b; RAND *et al.*, 2005).



**Figura 3.** Mecanismo de interferência por RNA que ocorre naturalmente em células eucariotas.

Ao contrário da terapia gênica, que consiste na inserção de um fragmento de DNA para o aumento da expressão de genes de interesse, o objetivo da terapia por RNAi é a diminuição da expressão de genes associados a diversas vias de interesse, como angiogênica (PITTELLA *et al.*, 2012), apoptótica (MELLO JR. *et al.*, 2017), de proliferação e sobrevivência celular (SOUZA, 2016) e de resistência a drogas (NIETH *et al.*, 2003). A redução na



expressão do gene-alvo a partir da técnica de RNAi pode ser alcançado a partir de duas vias: bloqueando a tradução (miRNA) ou degradando o RNAm-alvo (siRNA) (PIERCE, 2016).

No entanto, para o sucesso dessa técnica, se faz necessária a busca por genes-chaves que estão relacionados a uma ou diversas vias de ação, como o gene desse estudo, o HOXB7.

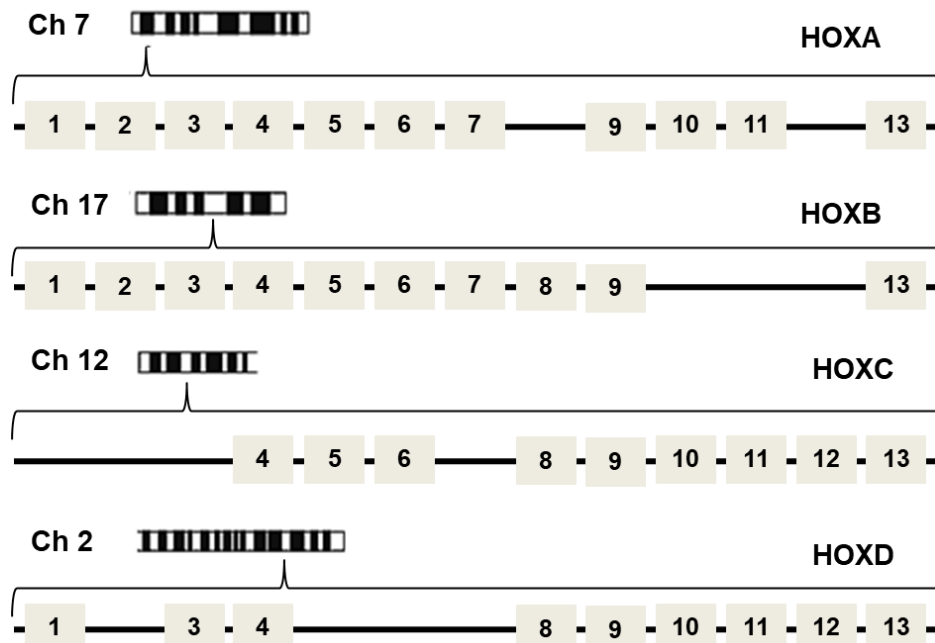
## 2.4 FAMÍLIA DE GENES HOMEBOX E O GENE HOXB7

A família *Homeobox* é um conjunto de genes que foram inicialmente identificados em *Drosophila* pela habilidade de causar mutações homeóticas. Esses genes codificam fatores de transcrição com um homeodomínio, sequência conservada que se liga a sequências específicas de DNA (SHAH; SUKUMAR, 2010).

Em humanos, os genes HOX são divididos em quatro grupos (HOXA, HOXB, HOXC e HOXD) localizados em quatro cromossomos diferentes, totalizando 39 genes. Cada grupo possui de 9 a 11 genes denominados de acordo com a ordem que aparecem na direção 3' – 5' (Figura 4) (FAVIER; DOLLE, 1997; SHAH; SUKUMAR, 2010). Os genes com mesma numeração representam grupos parálogos, genes que possuem um ancestral comum, mas que se divergiram por duplicação e atuam em funções distintas. Além disso, a expressão desses genes é específica a cada órgão e segue uma colinearidade espacial e temporal, onde genes mais próximos da extremidade 3' são responsáveis pelo desenvolvimento da parte anterior do corpo e expressos primeiro, enquanto que aqueles próximos da extremidade 5' são expressos mais tardiamente e correspondem a partes posteriores do corpo (SHAH; SUKUMAR, 2010).

Esses genes possuem papéis cruciais na embriogênese, regulando diversos processos relacionados a divisão celular, adesão celular, apoptose e diferenciação celular (FAVIER; DOLLE, 1997; SHAH; SUKUMAR, 2010). No entanto, anormalidades na expressão de muitos genes pertencentes a essa família são associados a alguns tipos de câncer, como carcinoma de ovário, cervical, pulmão, próstata e até de mama (SHAH; SUKUMAR, 2010; JIN;

SUKUMAR, 2015). Cantile e colaboradores (2003) e Svingen e colaboradores (2003) enfatizam a importância da rede de genes HOX na evolução do câncer e destacam a possibilidade de uso de genes HOX como potencial alvo de futuras terapias para câncer.



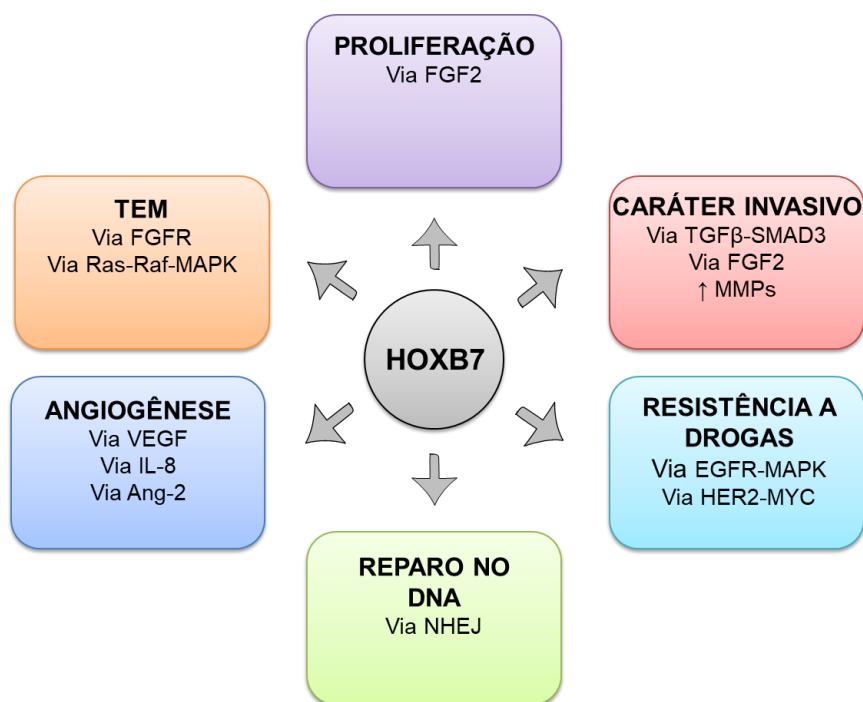
**Figura 4.** Organização dos genes HOX em clusters (Fonte: SHAH; SUKUMAR, 2010 com modificações).

O gene HOXB7 está presente no grupo HOXB junto com outros nove genes em *cluster* localizados no cromossomo 17q21.32. Sua transcrição resulta em um RNA mensageiro (RNAm) de 1377 pb com dois éxons. A tradução desse gene forma uma proteína com 217 aminoácidos, na qual o domínio homeobox está localizado entre os aminoácidos 141 e 193 (NCBI, 2018).

Em condições normais, esse gene está envolvido no desenvolvimento embrionário (CARÉ *et al.*, 1998; CHEN; SUKUMAR, 2003). No entanto, é sabido que a superexpressão de HOXB7 é observado em alguns tipos de cânceres como câncer de ovário (NAORA *et al.*, 2001), de pulmão (YUAN *et al.*, 2014), de pâncreas (CHILE *et al.*, 2013), oral (DESTRO *et al.*, 2009), gástrico (HE *et al.*, 2016), de esôfago (LI *et al.*, 2015), colorrectal (LIAO *et al.*, 2011), de fígado (HUAN *et al.*, 2017), mieloma (STORTI *et al.*, 2011), e melanoma (CARE *et al.*, 1996).

No câncer de mama esse gene é diferencialmente expresso em algumas linhagens. O estudo de Hur e colaboradores (2014) possibilitou mapeamento de expressão gênica de todos os genes HOX em algumas linhagens de câncer de mama. Expressão de HOXB7 foi observada nas linhagens BT474, T47D, HCC1428, HCC70 e MCF7, sendo que a maioria é receptor de hormônio-positivo. Na linhagem triplo-negativa mais estudada, MDA-MB-231, a expressão do HOXB7 foi nula, assim como na linhagem não-tumoral de tecido mamário, MCF10A.

A proteína HOXB7 age em diversas vias metabólicas do câncer (Figura 5) que incluem proliferação celular, angiogênese (CARE, 1998), invasão (WU *et al.*, 2006; JIN *et al.*, 2012), reparo do DNA, sobrevivência celular (RUBIN *et al.*, 2007) e resistência ao tamoxifeno (JIN *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Vias metabólicas em que o gene HOXB7 está envolvido (Fonte: própria autora).

Fatores de crescimento relacionados à angiogênese como VEGF, GRO $\alpha$ , IL-8, Ang-2, CD31 tiveram sua expressão aumentada em 3 a 10 vezes em células de câncer de mama que também apresentavam a expressão de HOXB7 (CARE *et al.*, 2001). Outros estudos inferem a existência de uma relação entre a expressão de HOXB7 e de FGF2 (fator 2 de crescimento de fibroblasto), atuante em vias mitogênica e angiogênica (CARE *et al.*, 1996;

CARE *et al.*, 1998; WU *et al.*, 2006). Care e colaboradores (1998) mostraram que a expressão de FGF2 induzida a partir do HOXB7 aumentou a taxa de proliferação em pelo menos 10 vezes. Wu e colaboradores (2006) evidenciaram também que a inibição do receptor FGF (FGFR) bloqueou a habilidade de invasão em 80% e que o FGF2 é um importante mediador da transição epitelial-mesenquimal iniciada pelo HOXB7.

A transição epidermal-mesenquimal é um passo importante na embriogênese, no entanto, também é considerado um mecanismo de conversão de tumores em estágio inicial para invasivos. Isso se dá pela perda da aderência epitelial e de proteínas de junção, perdendo o contato célula-célula e seguindo para um remodelamento do citoesqueleto que facilita a motilidade celular e invasão. No estudo de Wu e colaboradores (2006), ao transfectarem a linhagem não tumorigênica MCF10A com plasmídeo codificando HOXB7, células epiteliais se diferenciaram em mesenquimais e sofreram rearranjo no citoesqueleto típico de transição epidermal-mesenquimal. Moléculas importantes na adesão (e-caderina) e proteínas de junção (claudinas) não foram encontradas em MCF10A-HOXB7, em contraste com o controle. Ainda, marcadores de células mesenquimais foram observados em MCF10A-HOXB7, indicando uma atividade metastática do tumor. O mesmo foi observado por He e colaboradores (2017) em câncer gástrico.

Outra via importante na indução da transição epidermal-mesenquimal é a via Ras-Raf-MAPK. Em células com expressão de HOXB7, Wu e colaboradores (2006) observaram aumento das proteínas RhoA, Ras e p42/p44 MAPK. Somado a este fato, a inibição das últimas duas proteínas resultou em supressão do fenótipo invasivo da célula. Além disso, o silenciamento de HOXB7 desativou a via Ras-Raf-MAPK, e consequentemente a habilidade invasiva do tumor. Além disso, Jin e colaboradores (2012) também observaram aumento de MAPK quando ocorre superexpressão de HOXB7.

Também foi demonstrado que a superexpressão de HOXB7 ativa diretamente a expressão de TGF $\beta$  (fator de transformação do crescimento  $\beta$ ) em células de câncer de mama humano e murino. A produção de TGF $\beta$  induzida por HOXB7 promove a progressão do tumor e metástase pela via TGF $\beta$ -SMAD3. Ao realizar o ensaio de cicatrização em células com

superexpressão de HOXB7, o silenciamento de TGF $\beta$ 2 inibiu significativamente a migração celular quando comparado a células controle (LIU *et al.*, 2015).

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de zinco que promovem a degradação da matriz extracelular, favorecendo a migração de células tumorais (HSIAO, 2013). Care e colaboradores (2001) mostraram que em células com expressão de HOXB7 aumentada, algumas MMPs também são superexpressas, como a MMP9 que teve aumento de trinta e oito vezes na sua expressão normal.

Outra via de ação do HOXB7 em células de câncer de mama é no reparo de DNA e sobrevivência celular. Ensaio clonogênico com exposição à radiação ionizante mostrou vantagem duas vezes maior de sobrevivência em células expressando HOXB7. Em MCF7, o silenciamento de HOXB7 reduziu a sobrevivência clonogênica significativamente. Além disso, aberrações cromossômicas devido à radiação foram significativamente menores em células SkBr3-HOXB7. Essas células tiveram a via de reparo de DNA por união de extremidade não-homóloga 2,5 vezes mais estimulada. Ainda, esses autores mostraram que células com expressão de HOXB7 obtiveram habilidade de proliferação mesmo em meio deficiente de suplementação (RUBIN *et al.*, 2007).

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

#### **2.4.1 Relação entre tamoxifeno e HOXB7**

A expressão de HOXB7 está associada a alguns tipos de câncer de mama (WU *et al.*, 2006) e participa na proliferação, metástase e resistência ao tamoxifeno (TAM), medicamento importante na hormonioterapia (JIN *et al.*, 2012)

Proteínas tirosina quinase (PTKs) são responsáveis pela transdução de sinais, ao fosforilar resíduos de tirosina nas proteínas, desencadeando diversas cascatas de sinalização. As PTKs agem em diversos processos responsáveis por eventos chaves no organismo. No núcleo, envolve o controle do ciclo celular e na regulação da expressão gênica através da ativação ou não de fatores de transcrição (HUBBARD, 2002).

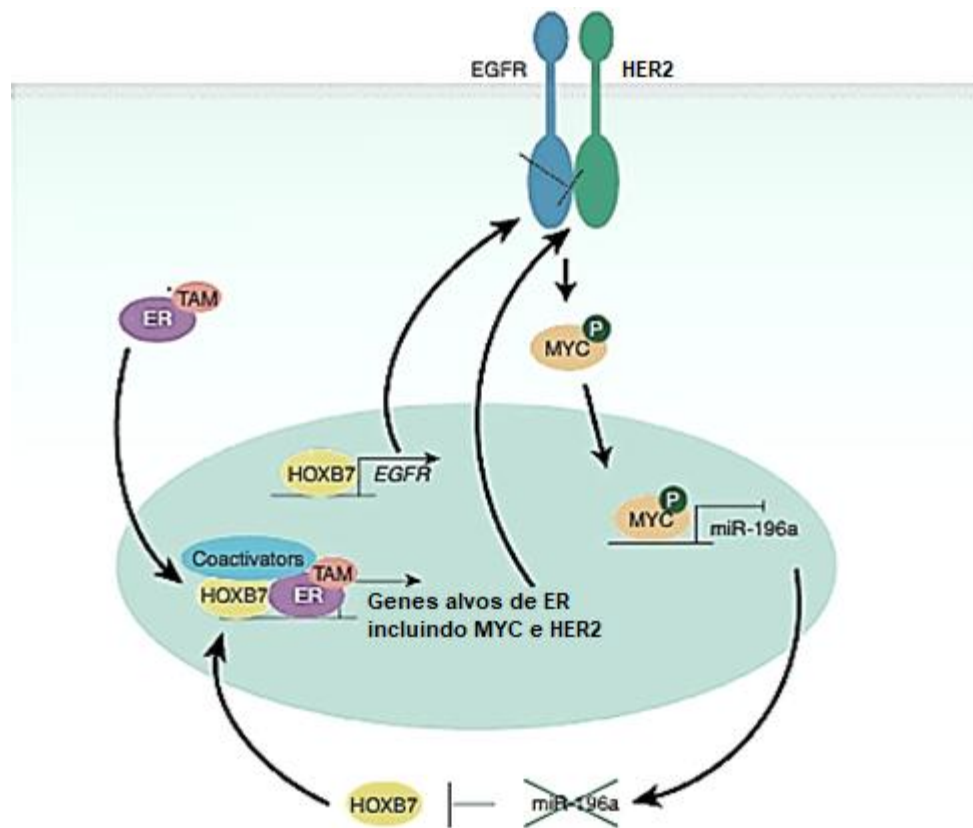
Alguns receptores importantes pertencentes a superfamília PTK são o EGFR (receptor do fator epidermal de crescimento) e HER2 (receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2). O EGFR é um receptor de superfície celular que se liga a um fator de crescimento epidermal, que irá induzir a dimerização do receptor e auto fosforilação da tirosina, resultando em proliferação celular. O HER2 também é um receptor de superfície celular, porém não permite ligação de fatores de crescimento. No entanto, forma heterodímero com outros membros da família EGF, ativando vias de sinalização mitogênica (NCBI, 2018). A terapia endócrina prolongada é associada com aumento na expressão de receptores EGFR e HER2 que leva a resistência endócrina (NICHOLSON et al 2005).

Jin e colaboradores (2012) verificaram que a superexpressão de HOXB7 torna as células de câncer de mama resistentes ao tamoxifeno através da ativação da via EGFR-MAPK. A inibição desse receptor através do *gefitinib* sensibilizou as células ao tratamento com TAM.

Os resultados de Jin e colaboradores (2015) indicam uma interação direta entre HOXB7, que age como coativador, e RE como crucial para a regulação dos genes alvos do receptor de estrogênio em câncer de mama, como MYC, HER2, GREB1 e CCND1 (ciclina D1). MYC é estabilizado através da sinalização da via EGFR-HER2. Então em células com superexpressão de HOXB7, e consequente superexpressão de EGFR, o MYC é fosforilado e suprime o mi-196a, repressor natural do HOXB7 (Figura 6). Além disso, observaram que em células de câncer de mama com superexpressão de HOXB7, o tamoxifeno pode oscilar de antagonista para agonista, ou seja, agir da mesma forma que o estrogênio, desencadeando uma cascata de proliferação celular, ao invés de bloqueá-la.

Em células resistentes ao tamoxifeno com superexpressão de HOXB7, existe uma alta expressão do gene HER2, regulado diretamente pela

interação entre ER/HOXB7. Essa expressão aumentada de HER2 ativa vias importantes como Akt, p44/42 MAPK, S6K, 4EBP1 (JIN *et al.*, 2012). Portanto, a inibição do gene HOXB7 pode resultar na redução de expressão de HER2 e dos genes ativados nesta cascata, além de induzir a sensibilização ao tamoxifeno.



**Figura 6.** Relação entre tamoxifeno e HOXB7 na via de sinalização de câncer de mama resistente ao tamoxifeno (Fonte: HEIDEMAN *et al.*, 2015 com modificações).

A utilização de moléculas efectoras de RNAi para o silenciamento do gene HOXB7 em câncer de mama envolve a aplicação de carreadores para entrega no tecido doente. O siRNA é uma molécula considerada grande (~13 kDa) e de característica aniônica, o que dificulta seu transporte através da membrana celular, além de poder sofrer degradação por RNases (SOUTSCHEK *et al.*, 2004). Ainda, quando injetado diretamente no sangue, o siRNA livre interage com macromoléculas do plasma (CHOI *et al.*, 2007) e ativa o sistema retículo-endotelial (JUDGE *et al.*, 2005). Somado a este fato, moléculas menores que 50 kDa ou 10 nm possuem rápida excreção renal, o

que resulta em curto período de circulação *in vivo*, baixa biodistribuição e biodisponibilidade (KHALED *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2011).

Por isso, existe a necessidade da utilização, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, de vetores de entrega que protejam o siRNA do sistema imune e de nucleases, que sejam capazes de extravasar para o tecido tumoral, resistir ao meio extracelular, transpor a membrana plasmática, escapar de endossoma/lisossoma e liberar as moléculas de forma eficaz no citoplasma (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; GUO *et al.*, 2011; PITTELLA *et al.*, 2011).

## 2.5 NANOCARREADORES

Os nanocarreadores são de grande interesse científico devido ao seu tamanho em escala nanométrica que promove propriedades físicas, químicas, mecânicas e ópticas únicas que ocorrem naturalmente nesses materiais. Isso é devido aos efeitos quânticos que regem o comportamento desses materiais, diferente de quando a mesma substância está em maior escala (MITTAL; BANERJEE, 2016). A relação superfície-volume é uma propriedade chave para explicar esse comportamento. Quanto menor a partícula, maior o número de átomos dispostos na superfície do nanocarreador em relação ao seu volume, o que aumenta a reatividade do mesmo (CAO, 2011). Existem divergências quanto ao conceito de nanocarreador, no entanto, é convencional defini-lo como sendo material que possui ao menos uma dimensão menor que 100nm (ISO, 2008).

O “pensar nano” ocorre desde o início do século XX quando Paul Ehrlich recebeu o Prêmio Nobel de Medicina ao desenvolver o medicamento Salvarsan contra a sífilis. Para isso, ele imaginou o conceito de “bala mágica” que erradicaria micro-organismos ou células malignas do corpo, mas não afetaria as células saudáveis (KREUTER *et al.*, 2007). Nas décadas seguintes, o desenvolvimento da microscopia foi crucial para os campos da química e biologia, e levaram a descoberta de estruturas e constituintes celulares e em 1981, com o microscópio de tunelamento, foi possível a visualização de átomos (MG *et al.*, 2015). A produção de anticorpos monoclonais em 1975 resultou na



descoberta de diversos inibidores molecularmente direcionados na terapia anticâncer, confirmando a teoria de “balas mágicas” criada por Ehrlich (KOHLENER; MILSTEIN, 1975).

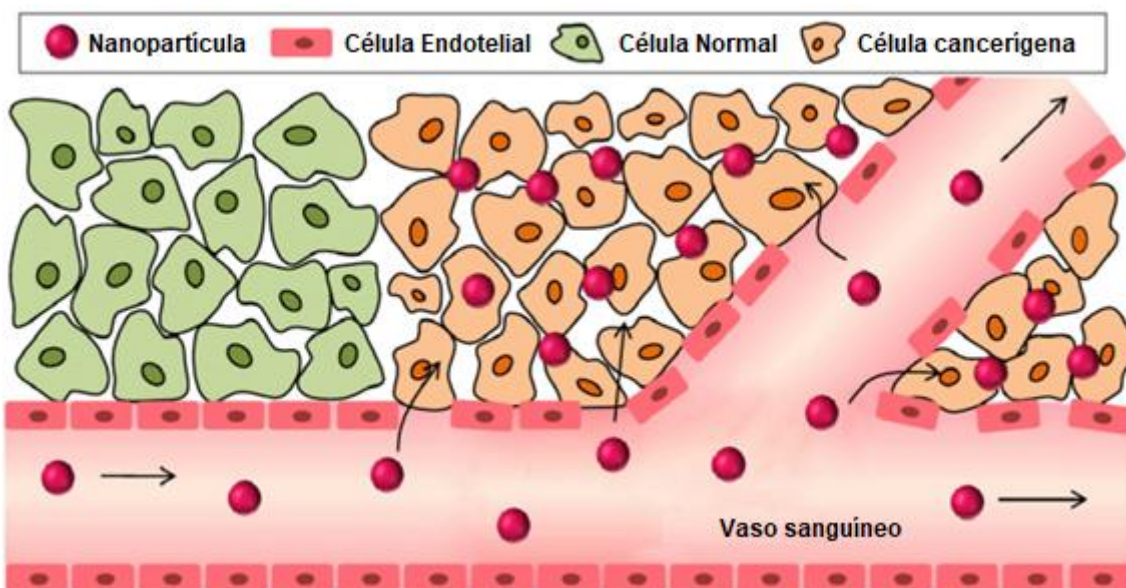
A década de 1960 é considerada um marco na nanomedicina, já que em 1965 os lipossomas foram desenvolvidos (BANGHAM *et al.*, 1965), seguido de sistemas poliméricos (LANGER; FOLKMAN, 1976) e dendrímeros a partir da década de 70 (BUHLEIER *et al.*, 1978). Foi apenas em 1995 que vetores virais foram utilizados com sucesso na entrega de informação genética (BLAESE *et al.*, 1995). Por serem agentes de transfecção perfeitos, os mesmos foram continuamente explorados devido à: uniformidade morfológica, alta eficiência de encapsulação e fácil modelação de tamanho e funcionalização. Posteriormente eles apresentam alta toxicidade e resposta imune, o que impactou o desenvolvimento e utilização. Por isso, carreadores não virais estão sendo cada vez mais estudados a fim de superar as limitações dos primeiros (TOMANIN; SCARPA, 2004).

As nanopartículas não-virais são classificadas de acordo com o componente predominante na sua estrutura em orgânicas, inorgânicas ou híbridas. Alguns materiais inorgânicos bastante utilizados na área farmacêutica são os metais (prata e ouro), ferro (SPIONS) e das mais diversas substâncias químicas, como fosfato de cálcio (KANWAR; MAHIDHARA; KANWAR, 2011; BHATIA, 2016; SIAFAKA *et al.*, 2016).

Na área da saúde ainda existe uma busca para a maior eficiência de fármacos, seja com novos compostos ou fármacos convencionalmente utilizados. Atualmente, muitos estudos têm evidenciado o uso de nanopartículas como sistemas de *drug delivery*. A aplicação nanotecnológica na área da farmácia vem sendo bastante explorada na construção de nanocarreadores “inteligentes”, isto é, carreadores que conduzem fármacos de forma específica à tecidos ou células e que também são capazes de liberá-lo de maneira controlada e prolongada (ALLEN; CULLIS, 2004; JHAVERI; DESHPANDE; TORCHILIN, 2014; SIAFAKA *et al.*, 2016; HOSSEN *et al.*, 2019). Além disso, outras vantagens podem ser apontadas, como: i) redução da toxicidade; ii) redução da resposta imune pelo sistema reticuloendotelial; iii) proteção do composto encapsulado; iv) incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto de substâncias lipofílicas; v) maior tempo de circulação *in*

vivo, que leva a maior eficácia terapêutica (ALLEN; CULLIS, 2004); vi) solubilização de substâncias acima do limite de solubilidade; e vii) redução da dose efetiva.

Existem diversas estratégias para a entrega de fármacos e genes a células, tecidos e órgãos de interesse. Estas são normalmente classificadas em acumulação ativa ou acumulação passiva. No caso da acumulação ativa, o direcionamento ao tecido de interesse ocorre após a funcionalização da superfície dos nanocarreadores. Algumas formas de funcionalização são a partir da conjugação de ligantes como anticorpos, aptâmeros e polímeros (NAM *et al.*, 2013). Já a acumulação passiva, bastante utilizada na terapia contra o câncer, é realizada valendo-se do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR) (Figura 7) (MATSUMURA; MAEDA, 1986). Em células endoteliais vasculares normais, o espaçamento entre as mesmas é de poucos nanômetros e por isso, nanocarreadores com tamanhos superiores não conseguem adentrar em tecidos saudáveis, a menos que funcionalizados para tal objetivo (ALLEN; CULLIS, 2004; VIEIRA; GAMARRA, 2016).



**Figura 7.** Mecanismo de ação passivo das nanopartículas através do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (Fonte: NAM *et al.*, 2013 com modificações).

No entanto, a alta taxa de proliferação celular de tecidos cancerígenos leva a formação de vasos sanguíneos desorganizados, promovendo lacunas (GUO *et al.*, 2011; KANWAR; MAHIDHARA; KANWAR,

2011) de até 800 nm entre as células do endotélio vascular (ALLEN; CULLIS, 2004). O tamanho dessas lacunas difere em relação aos diversos tipos de tumores sólidos. Enquanto que em modelos de câncer de colón, nanopartículas de até 400 nm acumularam de forma significativa, em câncer de pâncreas apenas aquelas com aproximadamente 30 nm conseguiram atividade antitumoral satisfatória (KIM *et al.*, 2016). A partir dessas lacunas, nanocarreadores conseguem permear o tecido tumoral e seguem retidas devido à ausência de vasos linfáticos no tecido cancerígeno, levando a maior probabilidade de promover o efeito desejado (MATSUMURA; MAEDA, 1986), já que concentrações de fármacos nanoencapsulados podem chegar até 10 vezes mais que o mesmo livre (NORTHFELT *et al.*, 1996).

Por isso, tamanhos médios de até 200 nm são indicados para aplicações biomédicas e terapêuticas, principalmente quando o intuito da mesma é a liberação de genes ou fármacos no interior de células-alvo (GUO *et al.*, 2011). Ainda, deve-se levar em consideração a rota de ação da nanopartícula. Em casos em que a mesma é endocitada pela célula (KAKIZAWA *et al.*, 2004b), um tamanho menor que 100 nm é desejado. Além disso, é sabido que quanto menor o tamanho da nanopartícula, maior a profundidade de alcance da mesma nos tumores sólidos *in vivo* (KIM *et al.*, 2016). Outras propriedades além do tamanho são levadas em consideração quando se refere ao nível de acumulação de nanocarreadores no tumor. O potencial Zeta, a meia vida do carreador, o grau de vascularização do tumor e de angiogênese, o tamanho das lacunas entre as células e o microambiente tumoral são algumas dessas características (ALLEN; CULLIS, 2004).

Ademais, o *design* do nanocarreador deve ser bem planejado. A depender da natureza química do fármaco ou molécula a ser encapsulada, certos nanomateriais são mais indicados que outros. Nanopartículas lipídicas, por exemplo, são mais recomendadas na encapsulação de fármacos hidrofóbicos e menos utilizadas quando se trata da encapsulação de substâncias hidrofílicas. No entanto, ainda é importante entender como esse nanocarreador irá ser estável o suficiente para superar barreiras biológicas, adentrar na célula e liberar o fármaco de forma eficaz (NAM *et al.*, 2013)

A estabilidade dos nanocarreadores pode ser alcançada a partir de dois principais métodos: estabilização eletrostática ou estabilização estérica. A

primeira diz respeito à nanocarreadores com potencial zeta (potencial Zeta) elevado (maior que 30 mV em módulo), promovendo a repulsão eletrostática entre as nanopartículas (BHATTACHARJEE, 2016). Já a segunda, vale-se do uso de moléculas não iônicas de caráter hidrofílico que geram cargas superficiais neutras e uma camada de água que disfarça a presença dos nanocarreadores (LOURENÇO, 1996).

Por fim, os gatilhos de liberação devem ser pensados anteriormente para que o efeito desejado seja promovido. As estratégias para a liberação do material encapsulado são convencionalmente classificadas em gatilhos extrínsecos e intrínsecos. No primeiro, os gatilhos mais comuns para a terapia antitumoral são: i) a temperatura, onde uma fonte de calor externa é utilizada para elevar a temperatura que a nanopartícula se dissolve; ii) ultrassom; iii) e a luz, por fotodegradação utilizando por exemplo, o laser em determinado comprimento de onda. Já entre os principais gatilhos endógenos pode-se citar, principalmente, a mudança no pH, já que o pH no tumor geralmente é menor (<7,0) que em tecidos saudáveis (7,2-7,4) devido ao aumento de ácido lático; aumento do potencial redox, devido ao aumento dos níveis de glutathione quando comparado ao meio extracelular e a células normais; e a temperatura, já que a hipertermia é uma consequência de um ambiente inflamado (JHAVERI; DESHPANDE; TORCHILIN, 2014).

A primeira nanomedicina utilizada no ocidente na terapia anticâncer foi a formulação lipossomal de doxorubicina (Doxil) para o tratamento de sarcoma de Kaposi, aprovada em 1995 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (JAMES *et al.*, 1994). Dez anos depois, o Abraxane, que consiste em nanopartículas à base de albumina e palitaxel, foi aprovado pela mesma organização para o tratamento de câncer de mama, pulmão e pâncreas (GREEN *et al.*, 2006). Em 2013, a ado-trastuzuman emtansine (Kadcyla) foi autorizada para o tratamento em pacientes com câncer de mama com receptor HER2 superexpresso (KAMALY *et al.*, 2012).

Recentemente, a nanotecnologia foi utilizada para o desenvolvimento do medicamento Onpattro (Patisiran). Após 23 anos da aprovação da primeira nanomedicina, o primeiro nanomedicamento baseado em RNA de interferência foi aprovado pelo FDA em 2018 (KAISER, 2018). Esse fármaco trata uma doença rara chamada amiloidose de transtirretina

(TTR), onde a estrutura da proteína transtirretina é produzida de forma anormal, impedindo o transporte de vitamina A e hormônio tireoideano tiroxina. Essa proteína defeituosa é depositada no coração e nervos periféricos, causando cardiomiopatia. Assim, Onpattro é composto por nanopartículas lipídicas que carregam moléculas de siRNA que pareiam com o RNAm do gene TTR, degradando-o, impedindo a formação de proteínas mutadas de TTR (ONPATTRO, 2018).

A aprovação do Onpattro abre portas para uma nova classe de medicamentos baseados em RNAi. A mesma empresa responsável pelo nanomedicamento recém-aprovado também é responsável atualmente pela formulação de outros oito nanofármacos que possuem a mesma tecnologia de RNAi. As formulações são direcionadas para tratamento de doenças genéticas, cardíacas e hepáticas e estão em diferentes fases de testes clínicos (ALNYLAM, 2018).

### **2.5.1 Nanopartículas de fosfato de cálcio**

O fosfato de cálcio é um sal formado por íons de cálcio e fosfato, e é encontrado em ossos, dentes e tendões, tornando esse composto uma opção biocompatível e com baixa toxicidade celular (ZHANG; KATAOKA, 2009). A grande vantagem dessas nanopartículas é que, a mistura de soluções contendo íons de fosfato e cálcio em condições estequiométricas resultam na formação de cristais em escala nanométrica por simples auto-associação dos constituintes (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002). Além disso, não necessitam da utilização de solventes orgânicos, possuem baixo custo, são facilmente preparadas e encapsulam eficientemente material genético (ZHANG; KATAOKA, 2009).

É sabido que as nanopartículas de fosfato de cálcio são internalizadas pelas células por endocitose (KAKIZAWA *et al.*, 2004b; PITTELLA *et al.*, 2011). Uma vez endocitadas e movidas aos endossomas/lisossomas, o pH ácido deste compartimento celular faz com que as nanopartículas se dissolvam, devido a maior concentração de íons  $H^+$ . O gradiente de íons resultantes desta solubilização provoca influxo de água do

meio intracelular para o endossoma, causando a ruptura da membrana deste compartimento. Desta forma os íons e materiais encapsulados são liberados no citoplasma, local de ação das moléculas de siRNA que irão promover o efeito de interferência por RNA (KAKIZAWA *et al.*, 2004b).

A primeira vez em que o fosfato de cálcio foi utilizado na transfecção de DNA em células de mamíferos foi em 1973 por Graham e Van Der Eb, produzido a partir do método de precipitação. A precipitação dos cristais depende da mistura de soluções aquosas em condições estequiométricas (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002).

Primeiramente, ocorre a fase de nucleação onde são formados diversos pontos iniciais instáveis de agregados de fosfato de cálcio amorfo até que um dos solutos seja totalmente consumido. Ao contrário de uma substância com estrutura cristalina, uma substância amorfa apresenta estrutura atômica desorganizada, permitindo a incorporação de moléculas de interesse. Por fim, ocorre a fase de crescimento, aonde esse material amorfo irá se reorganizar, agregar e crescer (USKOKOVIC; USKOKOVIC, 2010).

Sem uma forma de controle de crescimento, este material irá aglomerar de maneira descontrolada. Por isso, uma etapa adicional de estabilização é necessária para evitar o crescimento não desejado dos cristais (SOUSA FILHO; SERRA, 2015). Para isso uma opção é a utilização de blocos de copolímero, em que um dos blocos possui características aniônicas (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002).

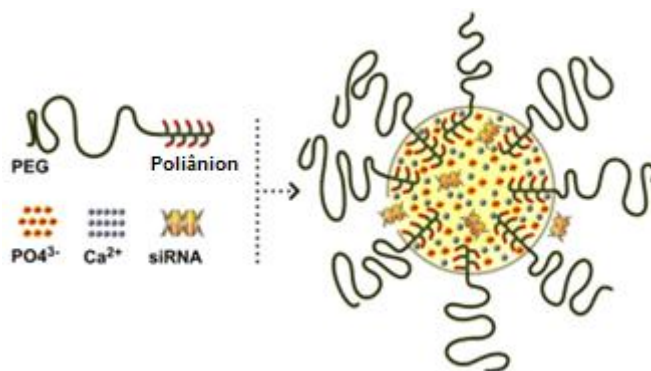
### **2.5.2 Copolímeros em bloco**

Para aplicações biomédicas é imprescindível a estabilidade das nanopartículas em meio aquoso. Existem duas formas de promovê-la: por repulsão eletrostática (NAM *et al.*, 2013) e por estabilização estérica (LOURENÇO, 1996; PERRAULT *et al.*, 2009). Esta última diz respeito ao mecanismo de estabilização de partículas a partir de moléculas não-iônicas (EVANS; NAPPER, 1973), como é o caso do polietilenoglicol (PEG).

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

principalmente na conferência de estabilidade coloidal. Também é importante na redução de interações com biomacromoléculas *in vivo* (PELAZ *et al.*, 2015) e no maior tempo de circulação no sangue, levando a uma maior acumulação das nanopartículas no tecido tumoral devido ao efeito EPR (PERRAULT *et al.*, 2009).

A união do fosfato de cálcio inorgânico com o bloco de copolímero PEG-poliânion permite a produção de nanopartículas híbridas (Figura 8) (PITTELLA *et al.*, 2011) onde o siRNA fica incorporado no núcleo de fosfato de cálcio (BISHT *et al.*, 2005). Esse copolímero permite a ligação do bloco polianiónico ao íon cálcio, que possui carga positiva. Dessa forma, o bloco polianiónico é internalizado, enquanto o bloco de PEG permanece externo e recobre a nanopartícula (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002).



**Figura 8.** Representação da nanopartícula híbrida formada pelo núcleo inorgânico composto por fosfato de cálcio, com siRNA complexado, e pelo revestimento orgânico formado pelo bloco de copolímero PEG-poliânion (Fonte: PITTELLA *et al.*, 2011 com modificação).

Diante do exposto, diversos estudos têm usado copolímeros PEG-poliânion para a estabilização dos cristais de fosfato de cálcio, no intuito de utilizar a nanopartícula resultante como carreadora de fármacos ou genes (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; KAKIZAWA *et al.*, 2004a; KIM *et al.*, 2011; PITTELLA *et al.*, 2011, 2012, 2014; MAEDA *et al.*, 2014; SOUZA, 2016; MELLO JR *et al.*, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar nanopartículas híbridas baseadas em fosfato de cálcio para entrega de siRNA complementar ao gene HOXB7 na linhagem MCF7 de câncer de mama e avaliar a eficiência da co-tratamento com o tamoxifeno.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenhar sequências de siRNA complementares ao gene HOXB7 e siRNA *scramble*;
2. Preparar nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio, PEG-poliânion e siRNA;
3. Caracterizar as nanopartículas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, distribuição de tamanho, potencial Zeta, morfologia e eficiência de encapsulação;
4. Avaliar a estabilidade coloidal do sistema nanoparticulado;
5. Verificar a viabilidade celular de células MCF7 após tratamento com as nanopartículas carreando HOXB7 siRNA, com e sem presença do tamoxifeno;
6. Avaliar o silenciamento do gene HOXB7 em células MCF7 após tratamento com as nanopartículas carreando HOXB7 siRNA;
7. Observar a internalização das nanopartículas pelas células MCF7.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Cloreto de cálcio e Tamoxifeno foram adquiridos da Sigma Aldrich. Fosfato de sódio dibásico foi adquirido da Proquimios. Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) e ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES) foram adquiridos da Synth. Bloco de copolímero polietilenoglicol-bloco-poli-L-ácido glutâmico (PEG-P(Glu)) foi adquirido da Alamanda Polymers, Inc. Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI), soro fetal bovino (SFB) e tripsina foram adquiridos da Gibco. Azul tripan e brometo de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT) adquiridos da Invitrogen. RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit foi adquirido da Qiagen. High Capacity DNAC Reverse Transcription kit adquirido da Applied Biosystems (Foster City, California, EUA). qPCR-SYBR-Green mix adquirido da Ludwig Biotecnologia Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil). As sequências de siRNA e primers foram sintetizadas pela Sigma-Aldrich. A mesma empresa sintetizou as seguintes sequências de primer: CCAACCGCGAGAAGATGA (*β-actina forward*), CCAGAGGCGTACAGGGATA (*β-actina reverse*), CTTTGTGGACTGTGGGTCTGG (*HOXB7 forward*) e CACAGAATGTAAAAGGGAGCATGG (*HOXB7 reverse*).

### 4.2 CONSTRUÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE siRNA E PRIMERS

O desenho das sequências de siRNA para o gene HOXB7 foi realizado na ferramenta *Whitehead siRNA Selection Server* (2004) (<http://sirna.wi.mit.edu/home.php>) levando em consideração a porcentagem de guanina-citosina (35-52%), valores de energia termodinâmica (quantidade de A/U na extremidade 5' *antisense*), temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) (altas T<sub>m</sub> favorecem formação de *hairpin*) (REYNOLDS *et al.*, 2004). Sequências com quatro ou mais nucleotídeos repetidos foram excluídas.

Ao desenhar o siRNA, deve-se ter o cuidado de escolher sequências que não possuam homologia com outros genes, para que não ocorra

pareamento inespecífico (FIRE *et al.*, 1998). Por isso, as sequências desenhadas pelo Whitehead siRNA foram ainda processadas no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de nucleotídeos, disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essa ferramenta fornece informações importantes para a escolha da melhor sequência de siRNA. Foram levadas em consideração principalmente a porcentagem de complementariedade e identidade, assim como valores score e valor-E.

As sequências dos iniciadores dos genes  $\beta$ -actina humana e HOXB7 humano foram desenhadas através da ferramenta disponível na página do NCBI, o Primer-Blast.

### 4.3 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

As nanopartículas híbridas (NP) foram preparadas por auto-associação dos constituintes através de mistura simples e estequiométrica de soluções aquosas, baseada no trabalho de Kakizawa e Kataoka (2002), com modificações. Inicialmente, uma solução de  $\text{CaCl}_2$  2,5M (PM=111g/mol) foi diluída em solução tampão TRIS 25mM (PM=121,14g/mol) formando a solução 1 (1:11,5 v/v). A solução 2 foi preparada adicionando-se siRNA, em 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de poli(etilenoglicol)-bloco-poli(ácido glutâmico) (PEG-PGlu) (5K-50DP) diluído em TRIS-HCl, e uma solução tampão HEPES 50mM (PM=238,3g/mol),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5mM (PM=142,07g/mol) e NaCl 140mM (PM=58,44g/mol) na proporção de 1:1:3 v/v. A solução 2 foi adicionada a solução 1 e homogeneizadas para a obtenção de concentração final de siRNA em 1,5  $\mu\text{M}$ . Devido à interação eletrostática entre os constituintes, NPs incorporando siHOXB7 (NP-siHOXB7) e siRNA *scramble* (NP-si-*Scramble*) foram obtidas por auto-associação, assim como NP vazias sem siRNA (NP-*mock*). Todas as soluções iniciais foram esterilizadas por filtração. Todas as NP foram preparadas em fluxo laminar, para garantir esterilidade das mesmas.

## **4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS**

### **4.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, da distribuição de tamanho e do índice de polidispersão das nanopartículas híbridas**

A determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas (NP), diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão (Pdl) foram obtidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering - DLS*). Essa técnica se baseia na análise das flutuações de intensidade de espalhamento de luz de NPs em movimento Browniano em um determinado ângulo, quando um feixe de luz é incidido sobre a suspensão. Essas flutuações são analisadas pelo método cumulante e o coeficiente de difusão obtido é utilizado para cálculo dos diâmetros hidrodinâmicos e índice de polidispersão da população usando a equação de Stokes-Einstein. As medidas foram realizadas com laser He-Ne (633 nm) em ângulo de detecção de 173° utilizando cubeta de quartzo (ZEN2112) a 25°C após a preparação das NPs. O ensaio foi realizado em equipamento do Laboratório de Nanotecnologia da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (EMBRAPA) em Juiz de Fora.

### **4.4.2 Determinação do potencial Zeta das nanopartículas**

A determinação do potencial Zeta das NPs foi obtida utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) com cubeta específica (DTS1060) a partir da técnica de mobilidade eletroforética, em campo elétrico com potencial de  $\pm 150\text{mV}$ . O potencial Zeta se refere ao potencial elétrico na interface da dupla camada de íons entre a partícula e o meio dispersivo (LU; GAO, 2010). É resultante da velocidade de migração das NPs para o eletrodo de carga oposta quando um campo elétrico é acionado, usando a equação de Smoluchowski (BHATTACHARJEE, 2016). O

ensaio foi realizado em equipamento do Laboratório de Nanotecnologia da EMBRAPA em Juiz de Fora.

#### **4.4.3 Determinação da morfologia da nanopartículas**

A determinação da morfologia das NPs foi realizada utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina com o equipamento JEM-1011 TEM (Jeol LTD., Tokyo, Japan) operado em voltagem de aceleração de 80kV. Uma amostra da solução de NPs foi depositada em grades de níquel malha 200 (CF200-Ni, EMS) Parlodion® revestidos com carbono amorfo seguido de secagem por 24h a temperatura ambiente. Para análise da morfologia, o microscópio foi operado em modo de campo brilhante com ampliação de até 50.000x.

#### **4.4.4 Eficiência de encapsulação de siRNA**

As amostras de NPs contendo siRNA foram primeiramente colocadas em filtros Amicon de Ultra Centrifugação MWCO 30k (Merck, EUA). Estes foram centrifugados a 15.000 rpm por 20 min, utilizando centrífuga Heraeus Megafure 16R (Thermo Scientific, EUA). O filtrado foi coletado e medido em espectrofotômetro Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) em comprimento de onda 260nm. Para obter a curva de calibração foram preparadas soluções de siRNA em água estéril nas concentrações de 0,1µM a 1,5µM. A partir da equação da curva de calibração foi possível determinar a concentração de siRNA livre no filtrado e calcular a porcentagem de incorporação de siRNA pelas NPs (Fórmula I)

---

#### **4.4.5 Estabilidade coloidal das nanopartículas**

A estabilidade do sistema nanoestruturado foi avaliada a partir de leituras semanais por quatro semanas. Para isso, soluções de NPs foram estocadas a 4°C e a temperatura ambiente e avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta por meio das técnicas de DLS e mobilidade eletroforética, conforme já descrito no item 4.4.1 e 4.4.2, respectivamente.

#### **4.5 CULTURA CELULAR**

A linhagem celular de câncer de mama MCF7 (ATCC® HTB-22) utilizada nos experimentos foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essa linhagem foi descrita em 1973 e é proveniente de uma paciente do Estado de Michigan nos Estados Unidos. Pertence ao subtipo Luminal A que possui baixa taxa de proliferação, alta expressão de receptores de estrogênio e ausência na expressão de HER2, sendo responsiva a hormonioterapia (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011; LEE; OESTERREIC; DAVIDSON, 2015). A grande contribuição dessa linhagem para a ciência tem sido o estudo de RE $\alpha$ , pelo fato de ser uma das poucas linhagens que expressa esse receptor e mimetiza a maioria dos cânceres de mama invasivos RE+ (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015).

As células foram mantidas em garrafas de cultura celular com meio de cultura recomendado pelo BCRJ: meio RMPI suplementado com 2mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 1mM de piruvato de sódio, 4.500mg/L de glicose, 1.500mg/L de bicarbonato de sódio, 20% de soro fetal bovino inativado, além de 1% de penicilina-estreptomicina. As garrafas com as células foram encubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas a uma densidade de 1 x 10<sup>6</sup> células por garrafa e submetidas a transferência a cada 48h em fluxo laminar.

Para cada experimento as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de meio de cultura recomendado. O número de células viáveis foi avaliado através do método de exclusão do Azul de Tripán. Esse corante é bastante utilizado pela incapacidade das células de internalizarem, por apresentarem membrana plasmática íntegra. Dessa forma, apenas células com membrana danificada são coradas, indicando morte celular (FRESHNEY, 1987). Foram escolhidas as culturas de células com ao menos 95% de viabilidade celular.

#### 4.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Culturas de células com alta viabilidade foram escolhidas e semeadas em 100µL de meio de cultura recomendado a uma densidade de  $5 \times 10^3$  de células por poço em placa de 96 poços estéril e incubadas *overnight* a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Suspensões de nanopartículas (NPs) contendo siHOXB7 foram adicionadas aos poços para a obtenção de concentrações finais de 150nM, 100nM, 50nM e 10nM de siHOXB7. NP-*mock* (sem siRNA), NP-siRNA *scramble* (sequências sem homologias a genes conhecidos) e siRNA *naked* (siRNA livre) foram utilizados como controles negativos. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 20h, 48h e 72h. Após o tempo de incubação, o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} foi adicionado e as placas foram novamente incubadas por 4h nas condições anteriores. Os precipitados de formazan formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) após o tempo determinado. A absorbância foi medida em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, California, USA) em comprimento de onda 540nm. O grupo controle contendo apenas meio de cultura foi considerado como 100% de células viáveis e comparado aos tratamentos, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Ensaio posteriores foram realizados nas mesmas condições de cultura e incluíram o co-tratamento de NP-siHOXB7 e tamoxifeno. O tamoxifeno foi inicialmente solubilizado em DMSO. O MTT de sensibilização conjunta foi realizado combinando NP-siHOXB7 (100nM) e tamoxifeno nas

concentrações 3 $\mu$ M, 9 $\mu$ M, 15 $\mu$ M e 30 $\mu$ M. Os controles utilizados foram meio, DMSO e as quatro concentrações de tamoxifeno puro já indicadas. As leituras foram realizadas em 15h, 24h e 48h após adição do co-tratamento.

## **4.7 AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO SISTEMA NANOCARREADOR**

### **4.7.1 Extração RNA**

As células de MCF7 foram semeadas em placa de seis poços em RPMI recomendado (1 x 10<sup>6</sup> células/poço) e incubadas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 24h. NPs contendo siHOXB7 foram adicionadas para obtenção de 150nM siRNA por poço. Os tratamentos utilizados como controles negativos foram células com meio de cultura, NPs com siRNA *scramble* e siRNA *naked*. Após 20 horas, as células foram submetidas à extração de RNA utilizando RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit (Qiagen, Alemanha), conforme instruções do fabricante. O RNA extraído foi armazenado a -20°C.

### **4.7.2 Síntese de DNA complementar (DNAC)**

A qualidade e concentração de RNA total extraído foi determinada por Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). Anteriormente à reação de transcriptase reversa, a concentração de RNA foi padronizada com água RNase free para a mesma concentração por amostra. A síntese de DNAC foi feita utilizando o *High Capacity DNAC Reverse Transcription* kit (Applied Biosystems) conforme instruções do fabricante. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf, Germany). Os microtubos contendo DNAC foram armazenados a -20°C.

### **4.7.3 PCR quantitativo**

Após a síntese de DNAC, a reação de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) para a análise da expressão do gene HOXB7 foi realizada em equipamento StepOnePlus Real-Time (Applied Biosystems, USA) utilizando

qPCR-SYBR-Green mix (Ludwig Biotecnologia Ltda, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante nas condições conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições da reação de qPCR para o gene HOXB7

	Holding	50 ciclos			Curva de dissociação		
Tempo	5 min	10 s	10 s	30 s	15 s	1 min	15 s
T (°C)	94	94	60	72	95	60	95

Para a normalização da expressão gênica foi utilizada a  $\beta$ -actina humana como gene *house-keeper* e a expressão gênica foi quantificada através de curva padrão, normalizada pela expressão de  $\beta$ -actina e relativizada como porcentagem da expressão normalizada do controle não tratado.

#### 4.8 INTERNALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

Células MCF7 foram cultivadas em placas 35 x 10mm com lamínula 22x22mm aderida ao fundo (SPL, Brasil) a uma densidade de  $8 \times 10^4$  células/poço em 2mL de meio RPMI contendo 20% de SFB. Após 24h, o meio foi removido e as células foram tratadas com suspensão de NP encapsulando siRNA marcado com cianina 5 (siRNA-Cy5) e siRNA-Cy5 não encapsulado nas concentrações de 150nM de siRNA. Após os tempos de 4h e 24h, os meios foram removidos e deu-se início a marcação do endossomo/lisossomo com o corante LysoTracker Green na concentração de 50nM com incubação de 120 minutos. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos e adicionou-se DAPI na concentração de 1 $\mu$ g/mL por 10 minutos. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz e entre os tratamentos com respectivos corantes, as células foram lavadas com PBS 1x. As imagens de microscopia confocal foram obtidas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Leica Mucrosystems ®) com óleo de imersão e objetiva de 63x.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA



A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar os efeitos dos tratamentos e o teste de Bonferroni foi usado para comparações entre os grupos de tratamentos individuais, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Valores de p menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos. A colocalização foi comparada a partir de coeficiente de Pearson. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados foram expressos em valores médios  $\pm$  erro padrão da média, exceto quando devidamente identificado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SEQUÊNCIAS DE siRNAs

O *design* racional de sequências de siRNA melhora significativamente a seleção de moléculas eficazes aprimorando a eficiência de silenciamento do gene. Após análise de 180 siRNAs, Reynolds e colaboradores (2004) concluíram que a fita senso dessas moléculas deveriam seguir oito critérios que contribuem para a eficiência do efeito, sendo elas: i) porcentagem de GC entre 30% e 52%; ii) baixa estabilidade na fita senso na extremidade 3' (de três a cinco pares de AU); iii) ausência de repetições invertidas; iv) preferência de A na posição 19; v) preferência de A na posição 3; vi) preferência de U na posição 10; vii) ausência de G na posição 13; viii) e ausência de G ou C na posição 19.

A sequência de siHOXB7 desenhada está de acordo com quatro dos oito critérios propostos por Reynolds e colaboradores (2004). Ainda, tamanhos de 21 e 22 pb e *overhangs* na extremidade 3' da fita *antisense* são importantes para degradação específica do RNA mensageiro (ELBASHIR *et al.*, 2001b). As sequências de siRNA do HOXB7 e siRNA *scramble* estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequências de siRNAs utilizadas

Gene	Sequência senso (5'-3')	Espécie	Referência
	Sequência antisense (5'-3')		
<i>HOXB7</i>	ACCUACCACUCGCGUGUUC[dT][dT] GAACACGCGAGUGGUAGGU[dT][dT]	<i>H. sapiens</i>	Autora
<i>Scramble</i>	GGAGUCGACGAGCAUAGGU ACCUAUGCUCGUCGACUCC	<i>H. sapiens</i>	Autora

A Figura 9 mostra a sequência de 1377 pb do RNAm do gene HOXB7 permitindo uma ampla visualização do local exato em que o siRNA desenhado parecia com o RNAm desse gene. O siRNA de 21 pb emparelha nos nucleotídeos 1240-1261 que fazem parte do éxon 2 do RNAm.

A ferramenta de pesquisa de alinhamento mostra se a sequência desenhada possui homologia a outros genes. A sequência de siHOXB7 definida neste trabalho se mostrou específica ao gene com valores que contemplam os critérios exigidos. A sequência de siRNA HOXB7 utilizada foi a única com 100% de homologia ao seu RNAm, e que possuiu menos de 70% de homologia com outros genes.

```
GGTCCTTTTTGGTGTAATCTGGACTCTAATTCTGTAATATATCAAGGAATCTCGTAAAACCGACACTAA
AACGTCCCTGCCTACAAATCATCCGGCCAAATTATGAGTTCATTGTATTATGCGAATACTTTATTTTCTA
AATATCCAGCCTCAAGTTTCGGTTTTTCGCTACCGGAGCCTTCCCAGAACAACCTTCTGTGCGTTTGCTTC
CAACCCCGAGCGCCCGGGCTATGGAGCGGGTTCGGGCGCTTCCTTCGCCGCTCGATGCAGGGCTTGATC
CCCGGCGGGGGGGGCATGGCGGGCCAGAGCGCGGGCCGGCGTCTACGCGGCCGGCTATGGGCTCGAGCCGA
GTTCTTCAACATGCACTGCGCGCCCTTGGAGCAGAACCCTCCGGGGTGTGTCCCGGCGACTCCGCCAA
GGCGGCGGGCGCCAAGGAGCAGAGGGACTCGGACTTGGCGGGCCGAGAGTAACCTCCGGATCTACCCCTGG
ATGCGAAGCTCAGGAACGACCGCAAACGAGGCCGCCAGACCTACACCCGCTACCAGACCCTGGAGCTGG
AGAAAGAATTTCACTACAATCGCTACCTGACGCGGGCGGCGGCATCGAGATCGCGCACACGCTCTGCCT
CACGGAAGACAGATCAAGATTTGGTTTCAGAACC GGCGCATGAAGTGGAAAAAGGAGAACAAGACCGCG
GGCCCGGGGACCACCGGCCAAGACAGGGCTGAAGCAGAGGAGGAAGAGGAAGAGTGAGGGATGGAGAAAG
GGCAGAGGAAGAGACATGAGAAAGGGAGAGGAAGAGAAGCCAGCTCTGGGAACTGAATCAGGAAACTCA
AATCGAATAGGGAAGTAAAAAACAAAAACAAAAAACAAAAAACAAAAAACAAAAAACCCCTATTTAAATGAA
AGGAGTTTTAAAAACATTTTTTAAGGAGGGAGAAAGGAGAAATTTTTGGTTTTTCAACACTGAAAAATACT
ACCTATAGGAAAGTCTGTGAGTTTGGTTTTTTGTACAATATGAAAAGGATATTATCTACCTGTTCTGT
AGCTTTCTGGAATTTACCTCCCTTTTCTATGTTGCTATTGTAAGGTCTTTGTAATACTTGCAGTTTTG
TAAGCCCTCTTTAATGCTGTCTTTGTGGACTGTGGGTCTGGACTAACCCCTGTGGTTGCCTGCCCTCCTGA
GCCTCCGCTTCCCAGCAGCGGCACCAAGGGGCTTAGGGAGCCCCAAAACCTACCACTCGCGTGTCC
CAAGCGCCTGGCTGCTGCTTCTTGTCCCGTCCCCAGCCCCATGCTCCCTTTACATTCTGTGTGTAT
CTAAAGGATGGAAAAATAAAACGCAATTAATAAAAAAAAAAAAAA
```

**Figura 9.** Indicação do sítio de ligação do siRNA ao éxon 2 do RNA mensageiro do gene *HOXB7* (Fonte: NCBI)

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

Após a preparação das nanopartículas híbridas através da precipitação de mistura simples e estequiométrica de soluções aquosas de  $\text{CaCl}_2$  em tampão TRIS pH 10 e HEPES-fosfato pH 7,4 com PEG-PGlu e siRNA, as mesmas foram caracterizadas.

Primeiramente foi realizado um estudo com nanopartículas com diferentes concentrações de PEG-PGlu para identificação da melhor formulação, conforme mostra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Estudo de formulação de nanopartículas carreando siRNA com diferentes concentrações de PEG-PGlu

Concentração de polímero PEG-PGlu	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (nm)	Pdl	Eficiência de Encapsulação (%)
300 µg/mL	130,1	0,3	113,88
400 µg/mL	122,7	0,2	81,92
500 µg/mL	83,41	0,07	65,58
700 µg/mL	72,84	0,199	53,51
1000 µg/mL	62,58	0,153	21,9

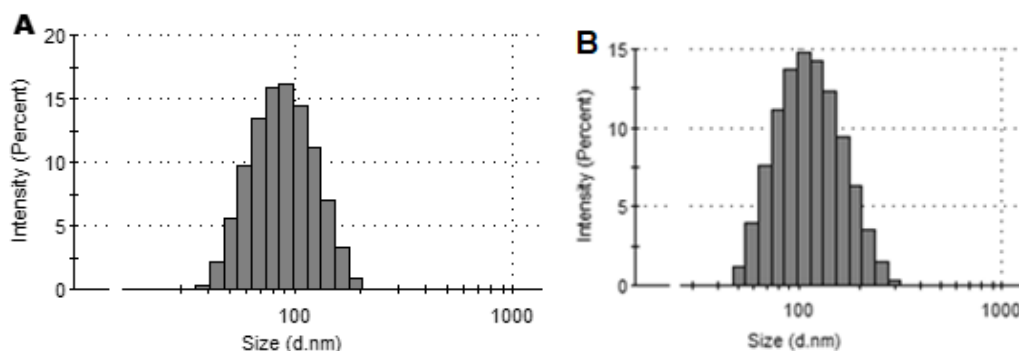
Como pode ser observado na Tabela 3, o diâmetro e eficiência de encapsulação da nanopartícula é dependente da concentração de polímero utilizada. Quanto maior esta concentração, menor é o diâmetro da nanopartícula, no entanto, também é menor a taxa de encapsulação de siRNA na mesma.

Estes resultados são derivados de dados brutos, sem estatística, e por isso estão sendo revelados apenas para a exposição da relação entre a concentração de polímero e o tamanho e taxa de incorporação das nanopartículas. Além do mais, a partir de observações posteriores, pudemos concluir que mesmo NPs-*mock* (sem siRNA) absorviam no mesmo comprimento de onda, sugerindo que a leitura no comprimento de 260nm detecta não só o siRNA, mas também o polímero. Assim, para superar essa limitação, NPs-*mock* foram avaliadas e a sua absorbância foi subtraída daquela obtida pelas NPs-siHOXB7 no tópico 5.3, sendo aquele resultado, o valor real de siRNA encapsulado.

Tamanhos distintos podem ser resultantes de individualidades do processo, como técnica para pipetar, tempo de homogeneização e principalmente, a característica e concentração do polímero utilizado para a estabilização da nanopartícula. Kakizawa e colaboradores (2004a; 2004b) observaram que agregações secundárias e o diâmetro da nanopartícula eram inversamente correlacionados com a concentração de polímero, fato também observado neste trabalho. Além disso, a obtenção e o controle do tamanho de partículas na escala nanométrica através da auto-associação indica a robustez e reprodutibilidade do processo.

Diante desses resultados, a concentração de 500µg/mL foi escolhida para prosseguir com os ensaios de caracterização da nanopartícula, já que a mesma mostrou tamanho e eficiência de encapsulação satisfatórios para os objetivos atuais.

Os resultados obtidos pela técnica de DLS revelaram diâmetro hidrodinâmico médio de 87,9nm ± 0,9 e 104,9nm ± 0,4 para NP-siHOXB7 e NP-*mock*, respectivamente (Figura 10). A NP-*mock* apresentou diâmetro ligeiramente superior em relação à NP-siHOXB7. Este fato se deve à auto-associação de íons catiônicos às moléculas aniônicas, o que determina a formação das nanopartículas. Para a preparação de NP-*mock* (sem siRNA), não há a associação dos íons cálcio ao siRNA; portanto o excesso de cálcio consome maior quantidade de fosfato, fazendo com que o fosfato de cálcio amorfo formado tenha tamanho ligeiramente superior até a estabilização com o polímero.



**Figura 10.** Histograma de distribuição de diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas híbridas ponderados por intensidade (%), para (A) NP-siHOXB7 e (B) NP-*mock*.

Esses resultados corroboram com aqueles achados por Mello Jr. e colaboradores (2017) que utilizaram nanopartículas híbridas semelhantes para carrear siRNA em células de câncer de mama com diâmetro hidrodinâmico por volta de 70 nm. Já Pittella e colaboradores (2011) e Souza (2016) obtiveram tamanhos entre 30-70 nm com protocolos de preparação de partícula de fosfato de cálcio baseado em auto-associação.

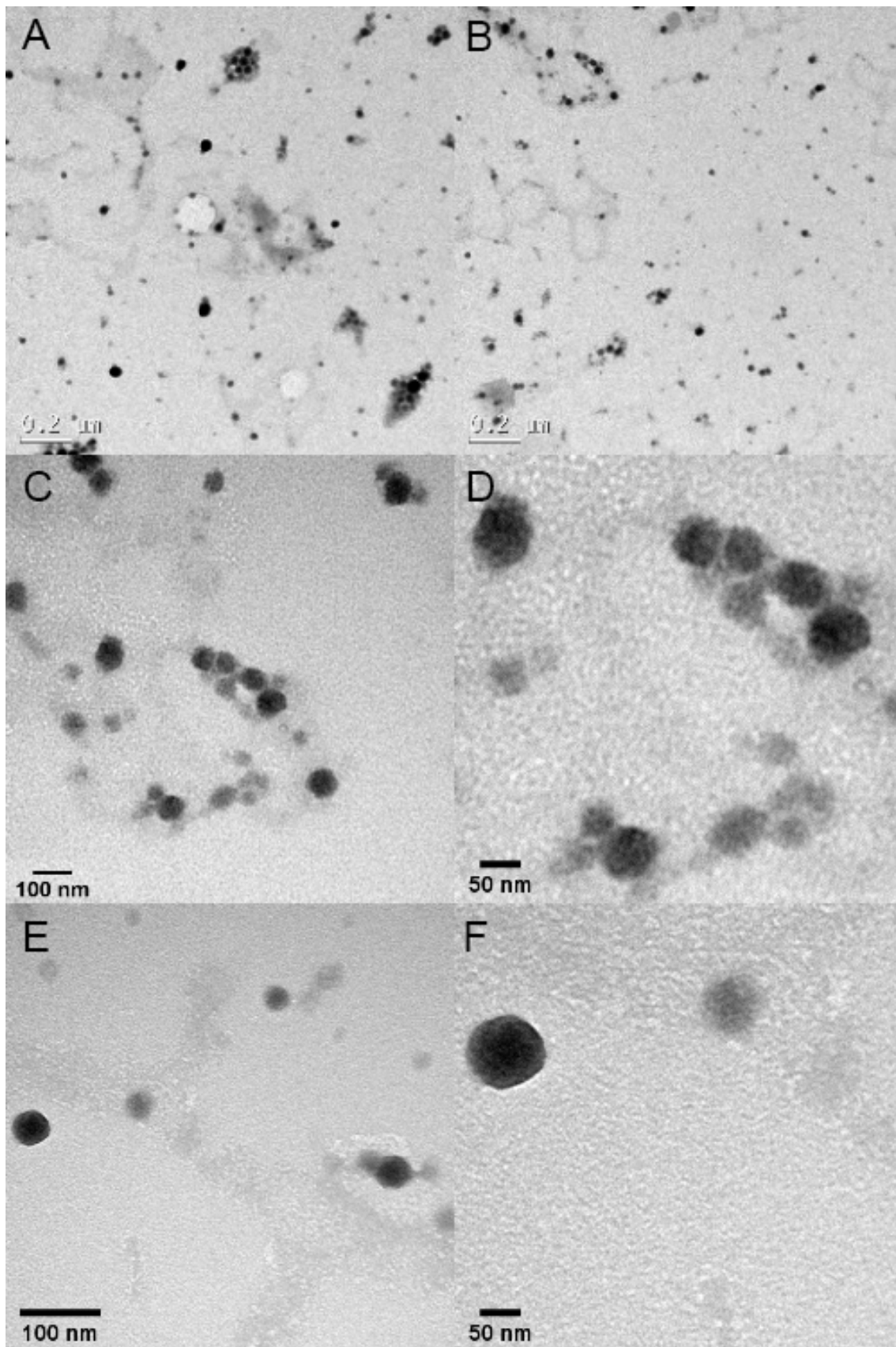
O tamanho da nanopartícula é importante na estratégia de ação para a entrega das mesmas *in vivo*. A neoangiogênese desorganizada que ocorre no tumor resulta em endotélio hiperpermeável, através do qual partículas em

tamanho nanométrico, como as nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio, adentram o tecido cancerígeno a partir do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (efeito EPR). Assim, nanopartículas menores que 100nm são recomendadas (MATSUMURA e MAEDA, 1986; PERRAULT *et al.*, 2009) para a entrega de fármacos e genes no câncer. Diante disso, os valores encontrados neste estudo se mostram ideais para o objetivo do trabalho.

O tamanho também interfere no tempo de translocação destas nanopartículas pela membrana celular. Quanto menor o tamanho da nanopartícula, menor o tempo de difusão na bicamada lipídica e maior número de nanopartículas englobadas pelo mesmo endossomo. De acordo com Chithrani e colaboradores (2006) nanopartículas de características físicas específicas e com tamanho médio de 50nm são englobadas em maior número por endossomo, enquanto que metade é englobada quando se trata de partículas com tamanho médio de 74nm.

O Pdl é uma razão que informa a homogeneidade da distribuição de tamanho em um determinado sistema (PATHAK; NAGARSENKER, 2009). Os valores obtidos de Pdl para as NP-siHOXB7 e NP-*mock* foram de  $0,100 \pm 0,009$  e  $0,123 \pm 0,008$ , respectivamente. Pdl's menores que 0,5 já podem indicar uma suspensão monodispersa, no entanto, índices menores que 0,3 são tipicamente referenciadas como monodispersas (MULLER; HENEMANN, 1992) e ideais para suspensões de nanopartículas cuja aplicação seja biomédica (STATEFELD; MCKENNA; PATEL, 2016). Em concordância com os valores encontrados, os gráficos de distribuição de tamanho do presente estudo revelam uma distribuição única, estreita e com alta intensidade, implicando em uma suspensão monodispersa (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002). Índices próximos a 0,1 também foram observados por Kakizawa e Kataoka (2002), Kakizawa e colaboradores (2004a), Souza (2016) e Mello Jr e colaboradores (2017) ao produzirem nanopartículas híbridas semelhantes a deste estudo.

As imagens obtidas por MET mostraram morfologia arredondada e homogênea (Figura 11). A morfologia da nanopartícula implica diretamente na translocação e adesão da mesma na membrana celular.



**Figura 11.** Imagem da morfologia de nanopartículas de fosfato de cálcio/PEG-PGlu obtidas com MET. (A) e (B) Escala 200 nm, (C) e (E) Escala 100 nm e (D) e (F) Escala 50 nm.

Ao contrário de outras formas, a forma arredondada não possui dependência orientacional, facilitando o seu englobamento pela célula (NANGIA; SURESHKUMAR, 2012). Muitos estudos compararam a internalização de partículas com morfologia esférica e alongada. Partículas esféricas possuíram translocação mais veloz e maior taxa de internalização que aquelas alongadas (CHITHRANI *et al.*, 2006; CHITHRANI; CHAN, 2007; CHAMPION *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2010). Uma explicação para isso pode ser a redução do número de receptores disponíveis devido a maior área de contato de nanopartículas alongadas na superfície celular (CHITHRANI *et al.*, 2006)

O potencial Zeta das formulações de NP-siHOXB7 e NP-*mock* foi de  $0,015 \pm 0,069$  e  $-1,28 \pm 0,183$  mV (Tabela 4). Tais valores indicam a presença do copolímero PEG-PGlu na superfície da nanopartícula, uma vez que o bloco PEG possui caráter não-iônico, o que define valor de superfície próximos a zero mV e promove a estabilidade através do mecanismo estérico. Estudos anteriores encontraram resultados semelhantes de potencial Zeta próximo ao neutro quando utilizaram o PEG como bloco mais externo (KIM *et al.*, 2011; PITTELLA *et al.*, 2014; SOUZA, 2016; MELLO JR. *et al.*, 2017).

**Tabela 4.** Resumo da caracterização das nanopartículas híbridas a partir das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz e Mobilidade Eletroforética.

Nanopartícula Híbrida	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
NP-siHOXB7	$87,93 \pm 0,950$	$0,100 \pm 0,009$	$0,015 \pm 0,069$
NP- <i>mock</i>	$104,96 \pm 0,404$	$0,123 \pm 0,008$	$-1,28 \pm 0,183$

Ao lado do tamanho e forma das nanopartículas, o potencial Zeta também interfere na translocação e adesão da nanopartícula pela membrana plasmática. De acordo com Nangia e Sureshkumar (2012), nanopartículas negativamente carregadas necessitam de maior energia para que sejam englobadas pela célula, já que a carga negativa da membrana plasmática as repele. O oposto acontece com nanopartículas neutras ou positivamente carregadas.

No entanto, aquelas nanopartículas com potencial Zeta positivo podem se acumular mais facilmente em outros tipos celulares, promovendo



efeitos não específicos (HONARY; ZAHIR, 2013). Ainda, estudos já apontaram que a utilização de nanocarreadores positivamente carregados podem promover efeitos citotóxicos para as células (TATUR et al., 2013).

A nanopartícula de fosfato de cálcio revestida por PEG-poliânion objetivando o controle do tamanho dos cristais de fosfato de cálcio foi produzida pela primeira vez por Kakizawa e Kataoka (2002), e desde então partículas semelhantes têm sido material para diversos trabalhos (KAKIZAWA et al., 2004a; KAKIZAWA et al., 2004b; PITTELLA et al., 2011; MAEDA et al., 2014; SOUZA, 2016; MELLO JR et al., 2017).

A utilização do polímero promove maior estabilidade coloidal, evitando maiores agregados, menor interação com biomacromoléculas e reconhecimento pelo sistema imune, promovendo maior biodisponibilidade da nanopartícula no sangue. Conseqüentemente permite maiores oportunidades de acumulação das nanopartículas no tumor em experimentos *in vivo* através do efeito EPR (NAM et al., 2013).

Diante do exposto, o design adequado de nanopartículas é de grande importância no que se refere ao tamanho, forma e potencial Zeta apropriado para cada aplicação (CHITHRANI et al., 2006).

### 5.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE siRNA

A eficiência de encapsulação foi analisada através de espectrofotometria conforme descrito em Pittella e colaboradores (2011) com modificações. A porcentagem de siRNA encapsulado nas nanopartículas híbridas com concentração de PEG a 500µg/mL foi de aproximadamente 64,75 ± 4,49%.

Ao utilizar concentração de 1.000µg/mL do mesmo copolímero deste trabalho, Souza (2016) encontrou eficiência de encapsulação próxima a 45%. Essa concentração permite maior estabilidade coloidal, menor diâmetro hidrodinâmico e maior tempo de circulação em experimentos *in vivo*. No entanto, a porcentagem de encapsulação de siRNA destas nanopartículas é inferior quando comparado a nanopartículas com concentração de polímero menor, como a do presente estudo.

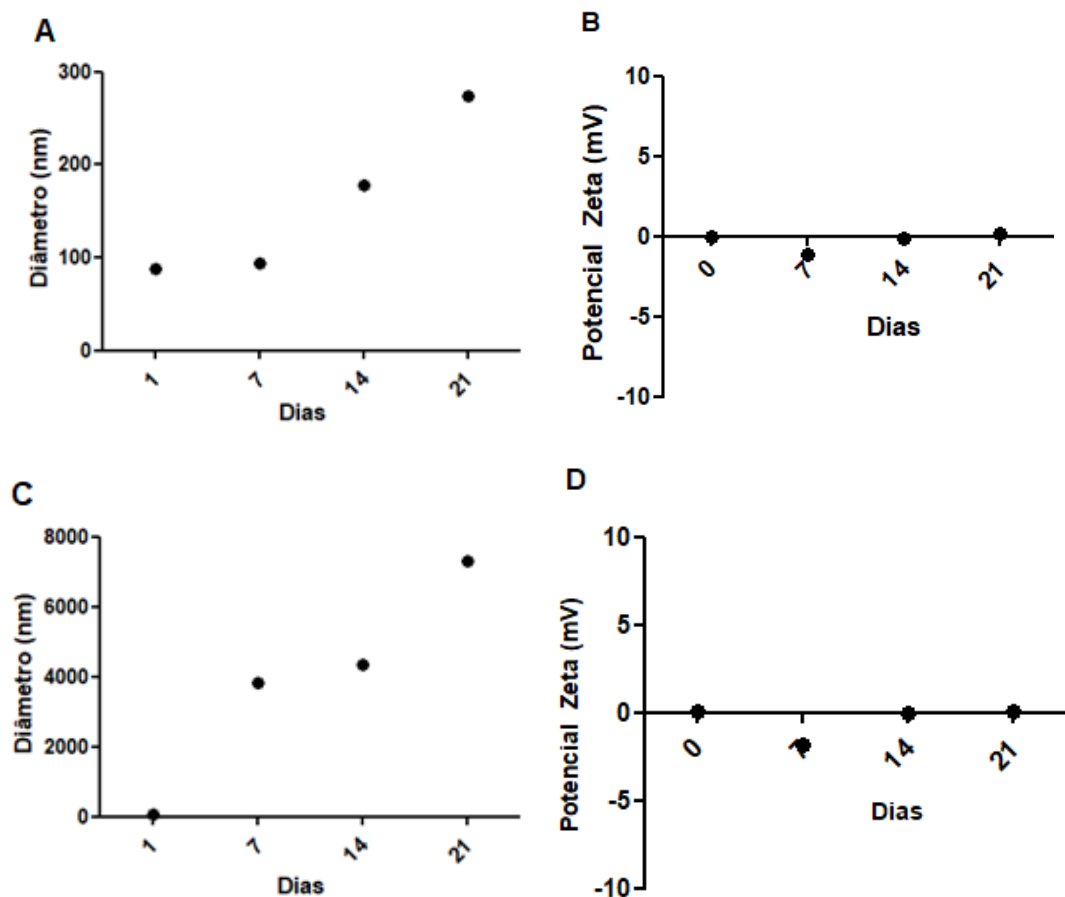
Essa relação se deve a competição entre o bloco polianiónico e siRNA, ambos negativamente carregados, pelos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; KAKIZAWA *et al.*, 2004a). Assim, no presente estudo, a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  utilizada permitiu maior eficiência de encapsulação do material genético como pôde ser observado.

#### 5.4 ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NANOPARTÍCULAS

A estabilidade de NPs pode ser obtida através da repulsão eletrostática ou através da utilização de moléculas não iônicas que irão promover um efeito estérico. No primeiro caso, quanto maior a carga de repulsão seja ela positiva ou negativa, maior a estabilidade do sistema. Já no segundo caso, quanto maior a concentração de tais moléculas não iônicas, maior a camada hidrofílica entre as partículas e maior a estabilidade (LOURENÇO, 1996; KAKIZAWA *et al.*, 2004a).

Assim, nesse estudo, a estabilidade das NPs foi testada a partir de alíquotas estocadas a 4°C e temperatura ambiente (T.A.). Essas soluções foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, Pdl e potencial Zeta por 21 dias (Figura 12).

As nanopartículas NP-siHOXB7 em temperatura ambiente possuíram baixa estabilidade coloidal, começando a agregar logo na primeira semana. Já as NP-siHOXB7 estocadas a 4°C permaneceram estáveis por sete dias, começando a se desorganizar na segunda semana (Figura 12A). Ao final do experimento, as nanopartículas NP-siHOXB7 armazenadas a 4°C possuíram tamanho de aproximadamente 270nm e aquelas que permaneceram em temperatura ambiente já se encontravam em escala micrométrica (Figura 12C). O potencial Zeta permaneceu estável e próximo a 0mV (Figura 12B e 12D). Esses resultados indicam que as nanopartículas híbridas preparadas com 500 $\mu\text{g/mL}$  de polímero mantém seu tamanho e podem ser utilizadas quando armazenadas em temperatura de 4°C.



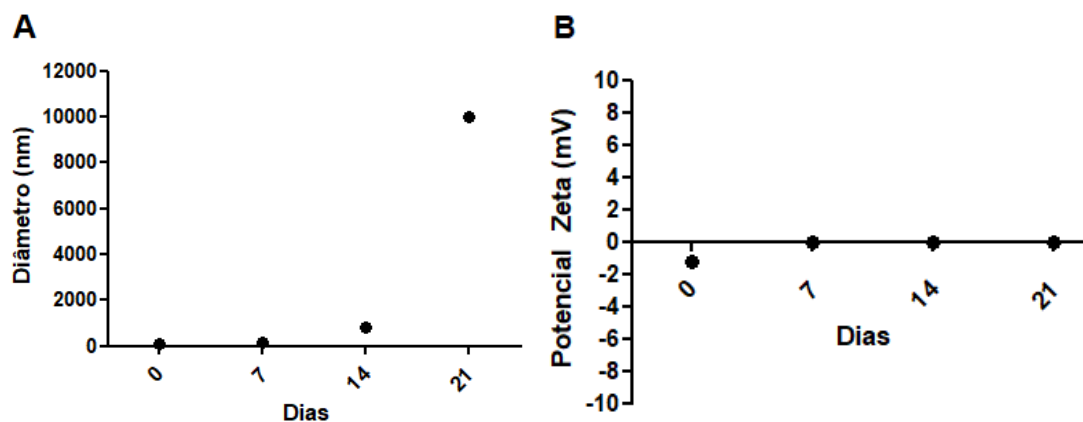
**Figura 12.** Estabilidade coloidal de NP-siHOXB7 estocadas em 4°C e a temperatura ambiente (T.A.). (A) Diâmetro e (B) Potencial Zeta de NP-siHOXB7 estocada a 4°C e (C) Diâmetro e (D) Potencial Zeta de NP-siHOXB7 estocada a T.A.

A NP-*mock* armazenada em 4°C seguiu padrão semelhante ao da NP armazenada a T.A. (Figura 13) e já se encontrava desestabilizada a partir da terceira semana de experimento.

A estabilidade de nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio e polímero é dependente da concentração de PEG em sua superfície. Para o presente trabalho, a concentração de 500 µg/mL de PEG-poliânion foi definida uma vez que em tal concentração há maior encapsulação de siRNA, em detrimento à redução da estabilidade.

Ao utilizar uma maior concentração de polímero (1.000 µg/mL), Souza (2016) observou estabilidade de pelo menos 28 dias quando as NPs foram estocadas a 4°C. Conforme discutido, com a redução de 50% na concentração de polímero, houve diminuição da estabilidade da nanopartícula naquelas condições (PITTELLA *et al.*, 2011; SOUZA, 2016). Desta forma,

acredita-se que para o presente trabalho, a concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$  de copolímero em bloco contendo PEG seja ideal para os ensaios propostos.



**Figura 13.** Estabilidade coloidal de NP-*mock* estocadas em 4°C em relação ao (A) diâmetro e ao (B) potencial Zeta

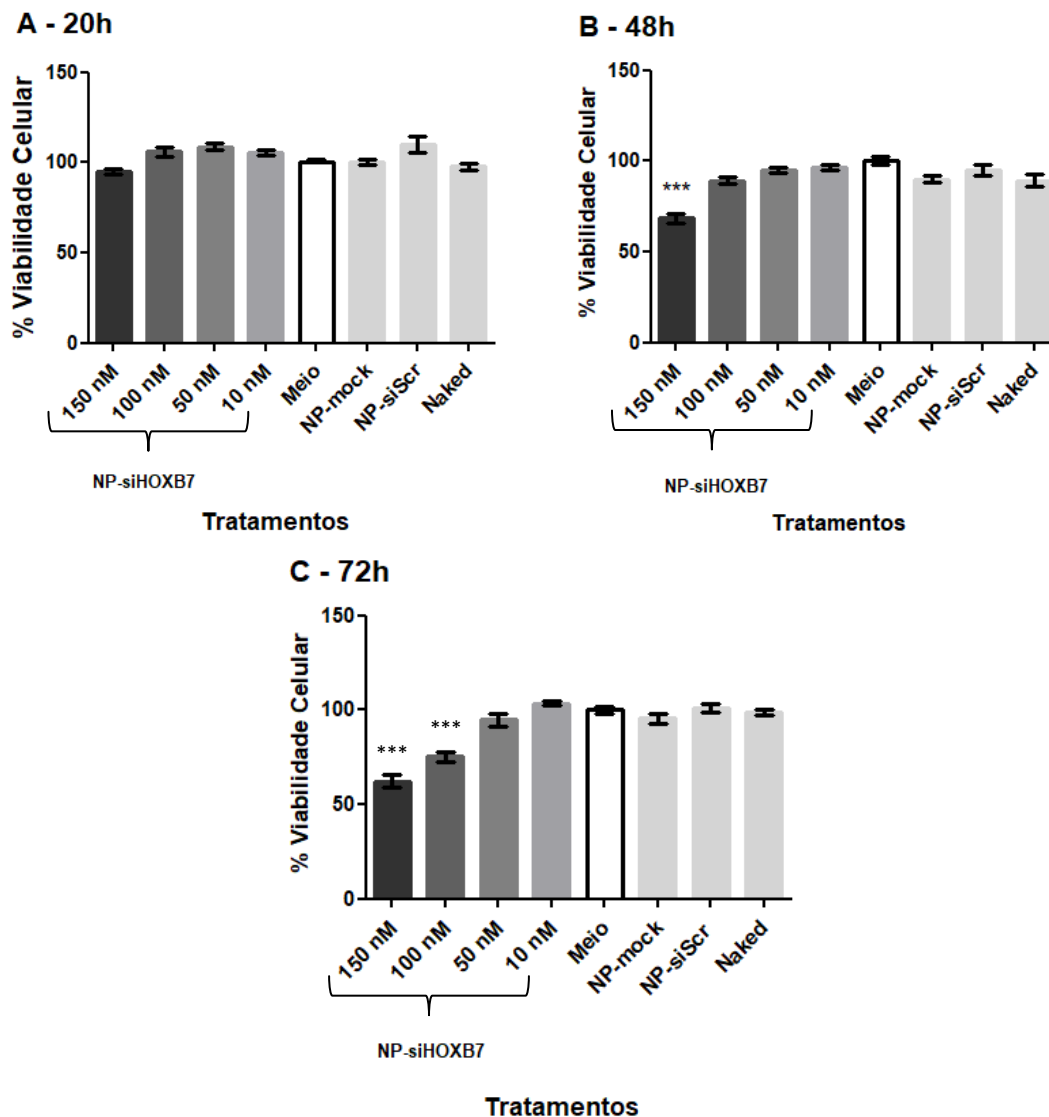
Apesar de que tais nanopartículas podem ser preparadas rapidamente por mistura direta dos reagentes, outros estudos relacionados a estabilidade devem ser realizados, para que seja possível chegar a uma formulação que contemple um tamanho adequado com taxa de encapsulação maior que 50%, mas que também possua maior estabilidade do que a observada no presente estudo.

## 5.5 VIABILIDADE CELULAR

A técnica de redução de MTT foi utilizada para avaliar o efeito citotóxico das nanopartículas híbridas sobre a linhagem tumoral MCF7. Esse método colorimétrico consiste na redução do sal MTT solúvel em água em seu derivado formazan de cor roxa, insolúvel em meio aquoso. Essa redução se dá pelo metabolismo mitocondrial através da atividade das desidrogenases mitocondriais que clivam o anel de tetrazólio (MOSMANN, 1983). Dessa forma, células com metabolismo mitocondrial ativo, irão metabolizar o MTT em formazan, indicando viabilidade celular.

Como mostrado na Figura 14, a redução da viabilidade celular ocorreu de forma dependente de concentração e tempo de incubação. Em 20h

não foi observada redução na viabilidade de nenhum tratamento. Já em 48h houve redução significativa de 31% na viabilidade das células tratadas com NP-siHOXB7 na concentração final de 150nM e de 38% e 25% em 72h nas concentrações de 150nM e 100nM, respectivamente.



**Figura 14.** Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama MCF7 após incubação com NP-siHOXB7 em diferentes concentrações por (A) 20h, (B) 48h e (C) 72h. \*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA seguido de Bonferroni).

O gene HOXB7 codifica proteína que age em diversas vias, como proliferação, apoptose e sobrevivência celular. Portanto é possível que o silenciamento do mesmo reduza a viabilidade celular; conforme observado a partir de 48 horas de tratamento.

Para a escolha do tempo de verificação do silenciamento, é necessário que não haja redução de viabilidade, garantindo assim que a

quantificação dos genes específicos sejam fruto do mecanismo de RNAi ao invés da redução devido à morte celular. Por isso, o tempo de 20h foi escolhido para prosseguir com o experimento de PCR em tempo real, já que a redução da viabilidade celular nesse tempo foi mínima, ao contrário do que ocorreu a partir de 48h. Assim, no tempo de 20h, um possível silenciamento gênico será inteiramente devido ao efeito de RNAi, e não à redução de todos os genes devido à morte celular como no caso de 48h de tratamento.

É importante notar que durante o experimento não houve diferenças estatísticas na viabilidade das células tratadas com os controles NP-*siScramble* e NP-*mock* quando comparados ao meio, indicando que o sistema nanoestruturado não apresenta níveis de toxicidade expressivos, como também foi observado por Kakizawa e Kataoka (2002), Souza (2016) e Mello Jr e colaboradores (2017).

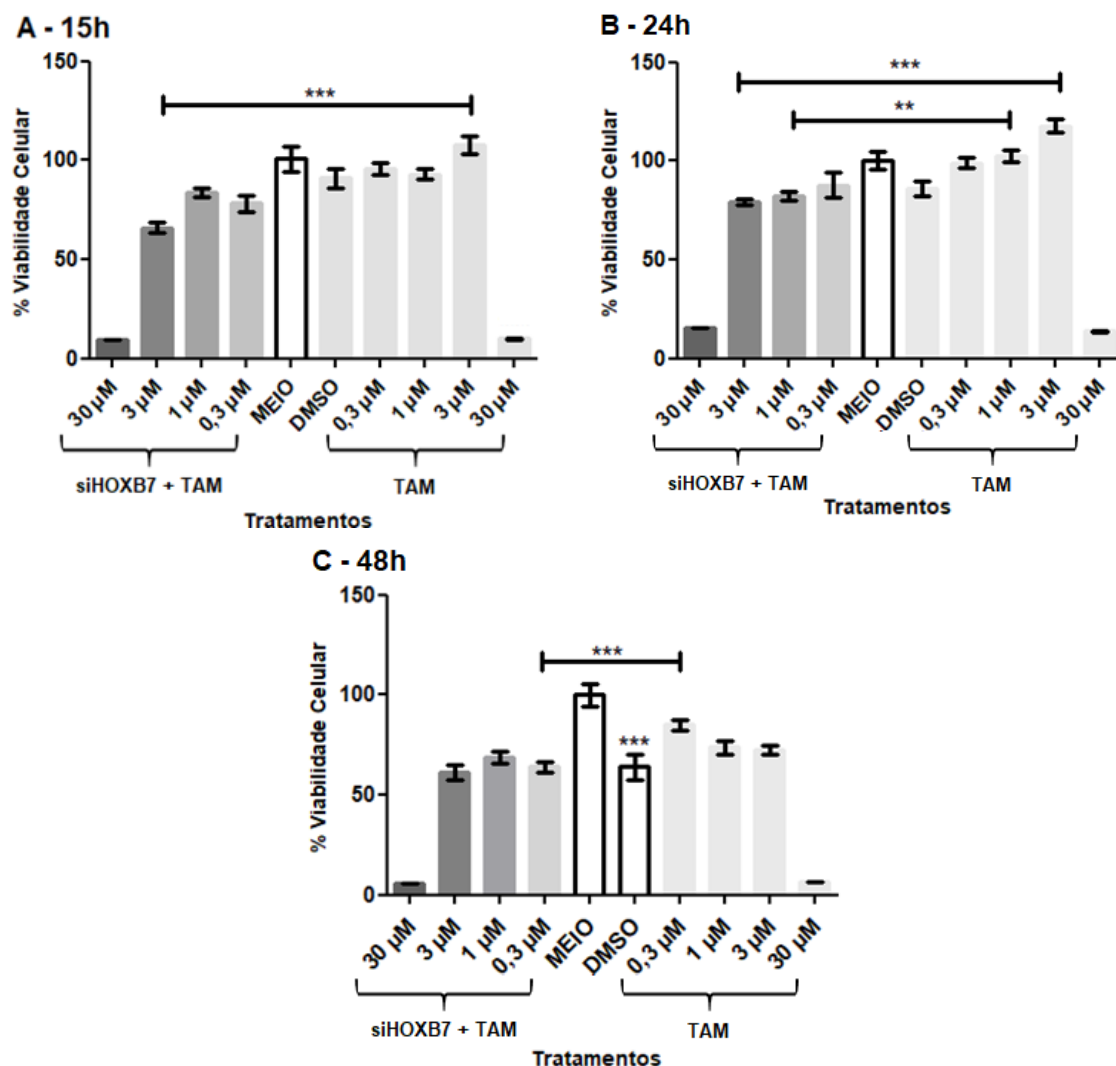
A citotoxicidade do tratamento conjunto com NP-*siHOXB7* (100nM) e tamoxifeno (TAM) também foi avaliada por MTT nos tempos de 15h, 24h e 48h (Figura 15). A linhagem celular MCF7 é estrógeno dependente e suscetível a efeitos citotóxicos do TAM (JIN *et al.*, 2012).

É evidente que a maior concentração de TAM (30 $\mu$ M) foi responsável pela morte de quase 100% das células, independente do co-tratamento com NP-*siHOXB7* nos três tempos de tratamento.

No entanto, em 15h observou-se uma diferença significativa entre o co-tratamento e o tratamento com TAM puro na concentração de 3 $\mu$ M. Esse resultado mostra uma diferença de redução da viabilidade de aproximadamente 41,67% entre TAM puro e o co-tratamento. Tal resultado sugere efeito biológico do tratamento com as NPs-*siRNA*, possivelmente relacionado ao efeito de RNAi, já em 15h. Sendo correta essa hipótese, o silenciamento pelo *siRNA* estaria promovendo sensibilização das células ao tamoxifeno (citotóxico), mas sem reduzir a viabilidade celular, como corroborado pelos resultados de 20h (Figura 14A).

Em 24h, além do co-tratamento com 3 $\mu$ M, também observou-se diferença na concentração de 1 $\mu$ M, resultando em uma redução da viabilidade em 38,35% e 20,06%, respectivamente, quando comparados aos respectivos tratamentos com TAM puro (Figura 15B). Por fim, em 48h o co-tratamento na concentração de 0,3 $\mu$ M apresentou diferença estatística em relação ao TAM

puro e resultou numa redução da viabilidade celular de 20,89% (Figura 15C). Dessa forma, foi possível observar que o tratamento com NP-siHOXB7 potencializa o efeito do tamoxifeno através da sensibilização das células cancerígenas. Ainda, não houve diferença estatística entre os tratamentos com TAM puro e o controle não-tratado (meio) até 24h.



**Figura 15.** Viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células de câncer de mama MCF7 após incubação com NP-siHOXB7 (100nM) e tratamento conjunto com tamoxifeno por (A) 15h, (B) 24h e (C) 48h. \*\*p<0.001; \*\*\*p<0.0001 (ANOVA seguido de Bonferroni).

A concentração inibitória de 50% (IC50) do TAM puro para MCF7 foi calculado em 15,81 $\mu$ M (24h). Notavelmente, após o co-tratamento, o IC50 foi reduzido para 11,81 $\mu$ M. Esse resultado revela uma diminuição de 25% da concentração necessária para inibir 50% das células de câncer e mama.

Importante destacar que o controle DMSO, apesar de reduzir a viabilidade das células em 48h, se refere a maior concentração de DMSO utilizada no experimento, ou seja, aquela utilizada na concentração de 30  $\mu$ M.

Du e colaboradores (2014) mostraram que o silenciamento do gene COX-2, relacionado à tumorigênese na mama, em combinação com tamoxifeno, reduziu significativamente a proliferação celular e o caráter invasivo em células MCF7 e aumentou a taxa de apoptose. De modo semelhante, o silenciamento do gene da survivina, proteína inibidora de apoptose, em conjunto com paclitaxel ou epirubicina também teve efeito aumentado na apoptose celular, ao sensibilizar as células MCF7 aos quimioterápicos (DONG *et al.*, 2015). Assim, como os já citados, outros estudos como o de Raha e colaboradores (2015), Esmaili e colaboradores (2016) e Chen e colaboradores (2017), Gong e colaboradores (2017) e Mello Jr e colaboradores (2017) mostram o potencial desse co-tratamento com silenciamento gênico e drogas quimio ou hormonioterápicas.

A combinação do tamoxifeno com o silenciamento do gene HOXB7 aumentou significativamente a sensibilidade em células de MCF7, quando comparado ao composto sozinho. Neste caso, o silenciamento gênico do HOXB7 pode ter provocado ação negativa em diversas vias de sinalização, aumentando a sensibilidade das células a esse fármaco.

Uma observação importante é que as concentrações de tamoxifeno testadas neste ensaio (30 $\mu$ M) são muito inferiores a normalmente utilizada na hormonioterapia, 35,5mM (CITRATO DE TAMOXIFENO, bula de remédio). Dessa forma, a terapia por RNAi combinada a nanotecnologia se mostra como uma opção não tóxica que permite sensibilização aos tratamentos endócrinos em câncer de mama dos tipos Luminal. Além disso, reduz a incidência de resistência as drogas utilizadas na hormonioterapia já que as mesmas podem ser administradas em concentrações subtóxicas para células não cancerígenas, diminuindo a ocorrência de efeitos colaterais.

Os resultados da viabilidade com NP-siHOXB7 (Figura 14) indicam que o sistema nanoestruturado não foi citotóxico para as células nas condições avaliadas. Ainda, a redução na viabilidade celular em ambos os tratamentos (Figuras 14 e 15) sugerem que o sistema nanoparticulado é eficiente na entrega das moléculas de siRNA ao citoplasma celular.

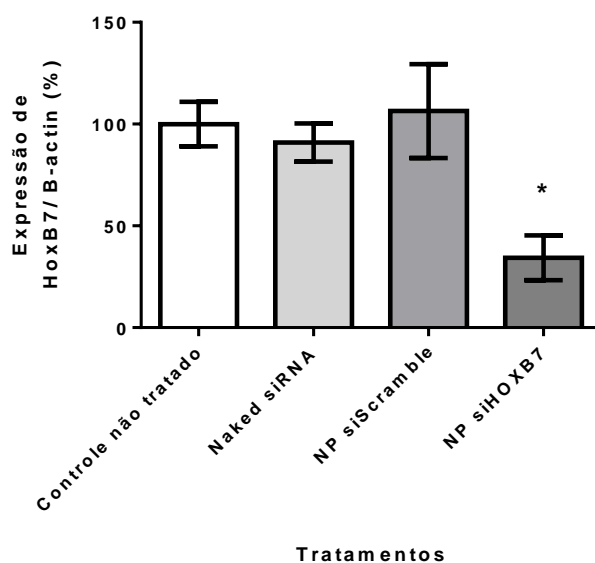


## 5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) foi utilizada para quantificar os níveis de RNA mensageiro em células de câncer de mama MCF7 no intuito de avaliar se o efeito biológico observado nos ensaios anteriores foram devido ao silenciamento gênico a partir do efeito de interferência por RNA (RNAi).

Após 20h do tratamento com NP-siHOXB7 na concentração final de siRNA de 150nM, o RNAm total das células cancerígenas MCF7 foi extraído e logo em seguida o DNAC correspondente foi obtido para prosseguir com o qPCR.

A Figura 16 mostra que o tratamento das células de câncer de mama com as NP-siHOXB7 em 150nM resultou na expressão apenas 35% do gene HOXB7. A redução de 65% na expressão do gene HOXB7 quando comparado ao controle não-tratado mostra que as sequências de siRNA desenhadas foram eficientes em gerar o silenciamento gênico.



**Figura 16.** Expressão do gene HOXB7 em células de câncer de mama MCF7 após tratamento com NP-siHOXB7. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; \* $p < 0.05$  (ANOVA seguido de Tukey).

É importante ressaltar que em condições normais o efeito de RNAi vai começar quando o siRNA é liberado no citoplasma, e que tal liberação depende do agente de transfecção utilizado. O sistema nanoestruturado foi eficaz na transfecção de células de câncer de mama MCF7, como já tinha sido

observado por Mello Jr e colaboradores (2017), assim como em promover o escape endossomal *in vitro* e liberar o siRNA no citosol, onde irá agir no silenciamento gênico a partir da degradação do respectivo RNAm.

É importante destacar que a expressão do gene da  $\beta$ -actina permaneceu constante (dado não mostrado), independente do tratamento aplicado. Assim, pode-se confirmar que o sistema nanoestruturado ou siRNA *naked* não promovem danos citotóxicos às células tratadas.

A taxa de silenciamento expressiva está relacionada à produção eficiente do sistema nanoestruturado, assim como sua alta taxa de encapsulação observada, devido à baixa concentração de polímero utilizada. Ainda, sugere que as NPs são eficientes em adentrar nas células e escapar dos endossomos antes que os mesmos as degradem. Esses resultados estão de acordo com aqueles observados pelo MTT com o co-tratamento (Figura 15A), já que foi observado diferença estatística entre o co-tratamento e o tratamento com TAM puro já em 15h, o que sugeria silenciamento gênico e que foi confirmado pelo qPCR em 20h.

O silenciamento gênico de HOXB7 também foi observado *in vitro* por Wu e colaboradores que utilizaram a Lipofectamina como agente de transfecção (WU *et al.*, 2006). Entende-se que tal agente de transfecção seja tóxico para as células, uma vez que o tratamento não é contínuo e demanda mudança de meio. Além disso, muitos trabalhos utilizam plasmídeos para o silenciamento gênico, o que constitui via intracelular distinta para a entrega e para eficiência, já que o mesmo deve ser entregue ao núcleo para ser transcrito e, posteriormente, traduzido (HYMAN *et al.*, 2002; MECCIA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2015).

A amplificação e superexpressão de HOXB7 em câncer de mama está associado a pobre prognóstico (HYMAN *et al.*, 2002). Isso é devido ao fato do gene HOXB7 estar relacionado a diversas vias metabólicas do câncer, e por isso, o seu silenciamento é relevante em vista de uma nova opção de tratamento por RNAi (JIN *et al.*, 2012).

Ainda, o subtipo Luminal de câncer de mama é receptor de hormônio positivo, e por isso, a hormonioterapia é o tratamento mais indicado para esse tipo de câncer, em conjunto ou não com a quimioterapia (EROLES *et al.*, 2012; SIERRA *et al.*, 2014). No entanto, a administração em altas doses de

tamoxifeno, principal droga utilizada na terapia hormonal, promove a resistência a esta droga em alguns casos. Assim, o silenciamento do gene HOXB7 permite a sensibilização das células e a utilização de doses sub-tóxicas do fármaco, reduzindo as chances de resistência ao tamoxifeno nesse subtipo de tumor.

## 5.7 INTERNALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

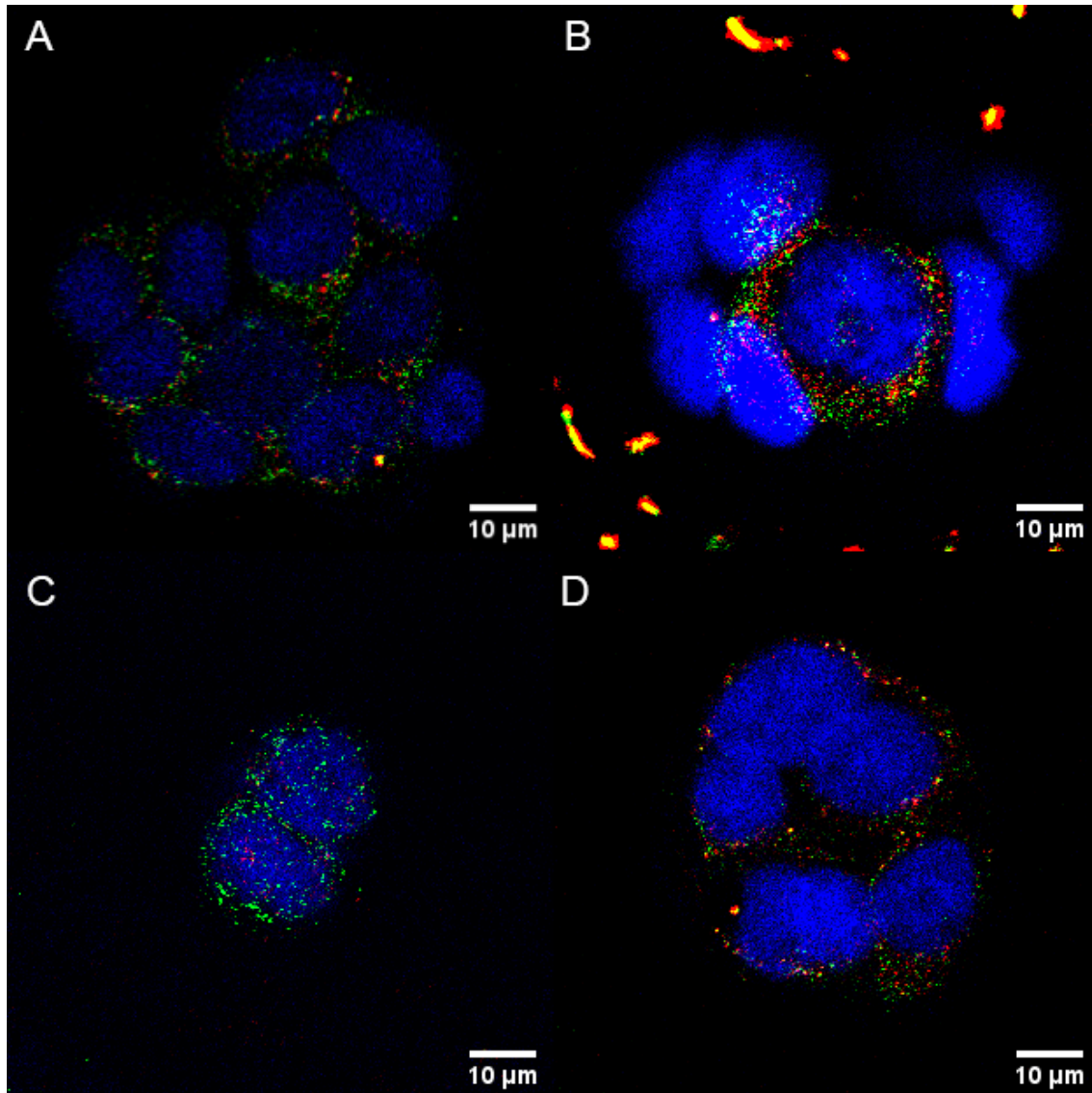
Sabe-se que a rota de internalização das NPs híbridas de fosfato de cálcio é através da endocitose, que levará a degradação do material, ao ser entregue aos lisossomas. Por isso, o escape endossomal é um passo importante para que o siRNA seja entregue de forma eficaz ao citosol, onde irá promover o silenciamento gênico (KAKIZAWA *et al.*, 2004b).

As células MCF7 tratadas com NPs encapsulando siRNA marcado com cianina 5 (NP-siRNA-Cy5) e com siRNA marcado com cianina 5 (siRNA-Cy5) não encapsulado na concentração de 150nM foram observadas por microscopia confocal (Figura 17). Os núcleos, siRNA-Cy5 e endossomas/lisossomas são observados nas cores azul, vermelho e verde, respectivamente. As imagens individuais foram obtidas e unidas, resultando em uma figura com as três fluorescências. Os pixels amarelos são resultantes da fusão de pixels vermelhos e verdes. Essa fusão indica a colocalização de siRNA-Cy5 com endossomas/lisossomas.

Em quatro horas o tratamento com siRNA-Cy5 não encapsulado mostrou diversos pontos amarelos, indicando que o siRNA foi englobado pelos endossomas/lisossomas e irá ser posteriormente degradado, o que foi confirmado pelas imagens de 24h de tratamento, já que o coeficiente de Pearson se manteve constante em aproximadamente 0,4 de correlação entre os pixels verdes e vermelhos.

Já o tratamento com NP-siRNA-Cy5 mostrou uma maior quantidade de pixels vermelhos espalhados pelo citosol e menor quantidade de pixels amarelos em 4h ( $r=0,18$ ) e em 24h ( $r=0,22$ ), quando comparado ao seu controle (siRNA-Cy5). Os pixels vermelhos indicam disponibilidade de siRNA-Cy5 no citoplasma, assim o sistema nanoparticulado foi eficaz em promover o escape

endossomal e liberar as moléculas de siRNA que poderão agir no silenciamento do gene, ao contrário do seu controle, onde pixels amarelos foram superiores em ambos tempos. Resultados semelhantes foram observados por Kakizawa e colaboradores (2004b) e Souza (2016).



**Figura 17.** Localização intracelular das nanopartículas híbridas. (A) Naked 4h, (B) NP-siRNA-Cy5 4h, (C) Naked 24h e (D) NP-siRNA-Cy5 24h. NP-siRNA-Cy5 (vermelho), endossomos/lisossomos (verde), núcleos (azul).

O escape endossomal acontece provavelmente devido à alta concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  das nanopartículas, ocorrendo alto influxo de íons e água para dentro do endossomo, promovendo o rompimento da membrana do

mesmo (KAKIZAWA *et al.*, 2004b). Devido a isso, é provável que a disponibilidade de siRNA seja possível apenas em condições de pH ácido.

Esses resultados corroboram tanto com os resultados de ambos ensaios de MTT quanto da análise da expressão do gene HOXB7, que mostraram que o sistema nanoestruturado é eficaz em adentrar nas células, promover o escape endossomal e liberar as moléculas de siRNA no citosol, gerando o silenciamento gênico do gene HOXB7

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conforme os resultados obtidos, nanopartículas de fosfato de cálcio revestidas por polímero PEG-PGlu foram produzidas com êxito por auto associação. A nanopartícula apresentou características como tamanho, potencial Zeta e eficiência de encapsulação desejáveis para a aplicação terapêutica, assim como potencial para armazenamento. Além disso, o sistema nanoestruturado *per se* não apresentou indícios de citotoxicidade, provavelmente devido à utilização de materiais biocompatíveis como o fosfato de cálcio. Ainda, a internalização da nanopartícula assim como a eficiências das sequências de siRNA promoveram o silenciamento do gene HOXB7.

Assim, o sistema nanoparticulado é capaz de carrear siRNA para o interior da célula superando barreiras celulares *in vitro*, escapar de forma eficiente do endossomo e se desorganizar, liberando o siRNA para o citoplasma, aonde irão agir e produzir o efeito de interferência por RNA. Por isso, esse sistema demonstra ser adequado e eficiente na transfecção de células de câncer de mama MCF7 *in vitro*.

Dessa forma, as nanopartículas híbridas revestidas por PEG-PGlu carreando siRNA podem ser utilizadas como uma alternativa promissora de agente transfectante para células MCF7. Em adição a isso, a utilização do efeito de RNAi para o silenciamento de genes que agem em diversas vias metabólicas, como o HOXB7, pode ser uma opção de tratamento para o subtipo de tumor receptor de hormônio positivo, ainda mais quando ligado a utilização conjunta com o tamoxifeno.

Ademais, outros testes farmacológicos e toxicológicos devem ser realizados para garantir a eficácia e segurança das nanopartículas. Além disso, futuros experimentos *in vivo* serão realizados para avaliar o comportamento da mesma em condições fisiológicas.

## REFERÊNCIAS

- ACS. American Cancer Society. <https://www.cancer.org>. 2018a.
- ACS. American Cancer Society. Treatment types. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. 2018b.
- ALLEN, T; CULLIS, P. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. 303: 1818-1822. 2004
- ALMEIDA, R; ALLSHIRE, R. RNA silencing and genome regulation. **Trends in Cell Biology**. 15 (5): 251-258. 2005.
- ALNYLAM, 2018. Disponível em: <https://www.alnylam.com/alnylam-rnai-pipeline/>. Acesso em: 18 de dezembro de 2018.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J Mol Biol**. 13: 238-252. 1965
- BARROS A.; LEITE K. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Rev Bras Mastologia**. 25 (4): 146-155. 2015.
- BERNSTEIN, E. *et al.* Role for bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**. 409: 363-366. 2001.
- BHATIA, S. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In: **Natural Polymer Drug Delivery Systems**. 1 ed. Suíça: Springer International Publishing. 2016
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, 235, 337–351. 2016.
- BISHT, S. *et al.* pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: highly efficient non-viral vector for gene delivery. **International Journal of Pharmaceuticals**. 288: 157-168. 2005.
- BLAESE *et al.* lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years *Science* (New York, N.Y.). **Science**. 270: 475-48. 1995.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Detecção precoce. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/deteccao\\_precoce](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/deteccao_precoce). 2018c.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2018. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>. 2018a.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Fatores de Risco. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores\\_de\\_risco\\_1](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1). 2018b.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Perguntas e respostas sobre quimioterapia. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/8e973c004eb686f794f896f11fae00ee/perguntas\\_qt.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=8e973c004eb686f794f896f11fae00ee](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/8e973c004eb686f794f896f11fae00ee/perguntas_qt.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=8e973c004eb686f794f896f11fae00ee). 2018f.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Saúde Brasil: uma análise da situação de saúde e das causas externas. Ministério da Saúde. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_brasil\\_2014\\_analise\\_situacao.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2014_analise_situacao.pdf). 2015.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Tratamento. [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/d028e6804eb686f9950497f11fae00ee/perguntas\\_rx.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=d028e6804eb686f9950497f11fae00ee](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/d028e6804eb686f9950497f11fae00ee/perguntas_rx.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=d028e6804eb686f9950497f11fae00ee). 2018e.

BRAY *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A cancer Journal for Clinicians**. 68 (6): 394-424. 2018.

BUHLEIER, E.; WEHNER, W.; VÖGTLE F. 'Cascade'- and 'nonskidchain-like' syntheses of molecular cavity topologies. **Synthesis (Mass)**. 155-158. 1978.

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

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

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

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

CARE, A. *et al.* Transduction of the SkBr3 breast cancer carcinoma cell line with the HOXB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence. **Oncogene**. 16: 3285-3289. 1998.

CHAMPION, J.; MITRAGOTRI, S. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles. **Pharm Res**. 26 (1): 244-249. 2009.

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

CHEN *et al.* Co-delivery of paclitaxel and anti-survivin siRNA via redox-sensitive oligopeptide liposomes for the synergistic treatment of breast cancer and metastasis. **International Journal of Pharmaceutics**. 529: 102-115. 2017.

CHENDRIMADA, T. *et al.* TRBP recruits the dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**. 436 (7051): 740-744. 2005.

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

CHITHRANI, B.; CHAN, W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. **Nano Letters**. 7 (6): 154201550. 2007.



- CHITHRANI, B.; GHAZANI, A.; CHAN, W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**. 6 (4): 662-668. 2006.
- CHOI, H. *et al.* Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**. 25 (10):1165-1170. 2007.
- CITRATO DE TAMOXIFENO. Paraná: Sandoz do Brasil Industria Farmacêutica Ltda., 2014. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7986232014&pldAnexo=2216291](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=7986232014&pldAnexo=2216291). Bula de remédio.
- CLEMONS, M.; DANSON, S.; HOWELL, A. Tamoxifen ('Nolvadex'): a review. **Cancer Treatment Reviews**. 28: 165-180. 2002.
- DAI, Y. *et al.* Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**. 16:939-946. 2007.
- DESTRO *et al.* Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. **International Journal of Oncology**. 36: 141-149. 2009
- DONG *et al.* Combination of survivin siRNA with neoadjuvant chemotherapy enhances apoptosis and reverses drug resistance in breast cancer MCF-7 cells. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**. 11 (4): 717-722. 2015
- DU, Y. *et al.* COX-2 silencing enhances tamoxifen antitumor activity in breast cancer *in vivo* and *in vitro*. **International Journal of Oncology**. 44: 1385-1393. 2014.
- ELBASHIR, S. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**. 411: 494-498. 2001a.
- ELBASHIR, S.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes & Development**. 15: 188-200. 2001b.
- EROLE, P. *et al.* Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews**. 38: 698-707. 2012.
- ESMAELLI *et al.* Combination of siRNA-directed gene silencing with epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reverses drug resistance in human breast cancer cells. **J Chem Biol**. 9: 41-52. 2016.
- EVANS, R.; NAPPER, D. Steric Stabilization I. **Kolloid-Z U. Z-Polymere**. 251:409-414. 1973.
- FAVIER, B.; DOLLE, P. Developmental functions of mammalian *Hox genes*. **Molecular Human Reproduction**. 3 (2): 115-131. 1997.
- FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.
- FIRE, A. RNA-triggered gene silencing. **TIG**. 15 (9): 358-363. 1999.
- FRESHNEY, R. **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. New York: 1987.
- GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the

- primary therapy of early breast cancer 2011. **Annals of Oncology**. 22: 1736-1747. 2011.
- GREEN *et al.* Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. **Ann Oncol**. 17: 1263-1268. 2006.
- GONG *et al.* Co-delivery of autophagy inhibitor ATG7 siRNA and docetaxel for breast cancer treatment. **Journal of Controlled Release**. 266: 272-286. 2017.
- GUO, J. *et al.* Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**. 29: 402-417. 2011.
- HARVEY, J. *et al.* Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**. 17 (5): 1474-1481. 1999.
- HE, X. *et al.* HOXB7 overexpression promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in gastric cancer patients by inducing expression of both AKT and MARKs. **Oncotarget**. 8 (1): 1247-1261. 2017.
- HEIDEMAN, M.; FREI, A.; HYNES, N. Targeting a novel ER/HOXB7 signaling loop in tamoxifen-resistant breast cancer. **Cancer Discovery**. 909-911. 2015.
- HOEFNAGEL, L. *et al.* Prognostic value of estrogen receptor  $\alpha$  and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. **Cancer**. 2012.
- HOLLIDAY, D.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**. 13: 215-222. 2011.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – a review (part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 12 (2): 265-273. 2013.
- HOSSEN *et al.* Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review . **Journal of Advanced Research**. 15. 2019
- HOWELL, A. *et al.* ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, pure antiestrogen. **Cancer**. 89 (4): 817-825. 2000.
- HSIAO, KC. *et al.* Surface alpha-enolase promotes extracellular matrix degradation and tumor metastasis and represents a new therapeutic target. **PLoS One**. 8 (7): e69354. 2013.
- HUAN *et al.* HOXB7 accelerates the malignant progression of hepatocellular carcinoma by promoting stemness and epithelial-mesenchymal transition . **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**. 36: 86-100. 2017
- HUBBARD, S. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. **Curr Opin Struct Biol**. 12 (6): 735-741. 2002.
- HUR *et al.* Analysis of HOX gene expression patterns in human breast cancer. **Mol Biotechnol**. 56: 64-71. 2014.

- HYMAN *et al.* Impact of DNA Amplification on Gene Expression Patterns in Breast Cancer . **Cancer Research**. 62: 6240-6245. 2002
- IORIO *et al.* MicroRNA signatures in human ovarian cancer. **Cancer Res**. 67 (18): 8699-8707. 2007.
- ISO – International Organization for Standardization. **ISO/TC 229 – Nanotechnologies**. Genebra, 2008.
- JAMES *et al.* Liposomal doxorubicin (Doxil): An effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 6: 294-296. 1994.
- JHAVERI, A.; DESHPANDE, P.; TORCHILIN, V. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy . **Journal of Controlled Release**. 2014
- JIN *et al.* HOXB7 is an ER $\alpha$  cofactor in the activation of HER2 and multiple ER target genes leading to endocrine resistance. **Cancer Discov**. 5 (9): 944-959. 2015.
- JIN *et al.* The HOXB7 protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway. **PNAS**. 109 (8): 2736-2741. 2012.
- JIN, K.; SUKUMAR, S. A pivotal role for HOXB7 protein in endocrine resistant breast cancer. **Oncoscience**. 2 (11): 917-919. 2015.
- JORDAN, V. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. **Eur J Cancer**. 44 (1): 30-38. 2007.
- JOSELSON *et al.* ESR1 mutations as a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. **Nat Rev Clin Oncol**. 12 (10): 573-583. 2015.
- JUDGE *et al.* Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. **Nature Biotechnology**. 23 (4): 457-462. 2005
- KAISER, 2018. Disponível em:  
<https://www.sciencemag.org/news/2017/08/modified-t-cells-attack-leukemia-become-first-gene-therapy-approved-united-states>. Acesso em: 18 de dezembro de 2018.
- KAKIZAWA *et al.* Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**. 97: 345-356. 2004b.
- KAKIZAWA *et al.* Size-controlled formation of a calcium phosphate-based organix-inorganic hybrid vector for gene delivery using poly(ethylene glycol)-block-poly(aspartic acid). **Advanced Materials**. 16 (8): 699-702. 2004a.
- KAKIZAWA, Y. KATAOKA, K. Block copolymer self-assembly into monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate. **Langmuir**. 18 (12): 4539-4543. 2002.
- KAMALY *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development and clinical translation. **Chem Soc Rev**. 41: 2971-3010. 2012.
- KANWAR, J.; MAHIDHARA, G.; KANWAR, R. Foundation review: antiangiogenic therapy using nanotechnological-based delivery system. **Drug Discovery Today**. 16 (5/6). 2011.

- KHALED *et al.* Controlable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology. **Nano Lett.** 5 (9): 1797-1808. 2005.
- KIM *et al.* PEG-detachable cationic polyaspartamide derivatives bearing stearyl moieties for systemic siRNA delivery toward subcutaneous BxPC3 pancreatic tumor. **Journal of Drug Targeting.** 20 (1): 33-42. 2011.
- KIM *et al.* Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 104, 61–77. 2016.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature.** 256: 495-497. 1975.
- KREUTER, J. Nanoparticles—a historical perspective . **International Journal of Pharmaceutics.** 331. 2007.
- LANGER, R.; FOLKMAN, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. **Nature**, 263(5580), 797–800. 1976.
- LEE, A.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. MCF-7 cells – changing the course of breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 107 (7): 073. 2015.
- LEE, H. *et al.* MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features. **World Journal of Surgical Oncology**, 10 (174). 2012.
- LEITE *et al.* Mulheres com diagnóstico de cancer de mama em tratamento com tamoxifeno: perfil sociodemográfico e clínico. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 57 (1): 15-21. 2012.
- LI *et al.* HOXB7 Promotes Malignant Progression by Activating the TGF $\beta$  Signaling Pathway . **Cancer Research.** 75 (4):: 709-719. 2015
- LIAO *et al.* HOXB7 as a Prognostic Factor and Mediator of Colorectal Cancer Progression. **Human Cancer Biology.** 17 (11): 3569-3578. 2011
- LIU *et al.* HOXB7 promotes malignant progression by activating the TGF $\beta$  signaling pathway. **Cancer Research.** 75 (4): 709-719. 2015.
- LOURENCO, C. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. **International Journal of Pharmaceutics.** 138(1), 1–12. 1996.
- LU *et al.* Effect of particle shape on phagocytosis of CdTe quantum dot-cystine composites. **Med Cham Comm.** 1: 84-86. 2010.
- MAEDA *et al.* Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. **Macromolecular Rapid Communications.** 35: 1211-1215. 2014.
- MALHOTRA *et al.* Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biology & Therapy.** 10 (10): 955-960. 2010.
- MALVERN. Zetasizer: User manual. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/user-manuals/MAN0485EN.html>. Acesso em: 13 de maio de 2018.
- MATSUMARA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research.** 46:6387-6392. 1986.

- MATZKE *et al.* RNA-based silencing strategies in plants. **Curr Opin Genet Dev.** 11 (2):221-227. 2001
- MECCIA *et al.* HOXB7 expression is regulated by the transcription factors NF-Y, YY1, Sp1 and USF-1. **Biochimica et Biophysica Acta.** 16: 26. 2003
- MELLO JR, L. J. *et al.* Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. **Nanotechnology.** 2017.
- MENCK, C. F. M. A nova grande promessa da inovação em fármacos: RNA interferência saindo do laboratório para a clínica. **Estudos avançados.** 24 (70): 99-108. 2010.
- MG *et al.* History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and nanotechnological Progress. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology,** 6 (6). 2015.
- MITTAL; BANERJEE. Current status and future prospects of nanobiomaterials in drug delivery. In: **Nanobiomaterials in Drug Delivery: Applications of Nanobiomaterials.** 618 p. 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** 65: 55-63. 1983.
- MULLER, R.; HENEMANN, S. Fat emulsions for parenteral nutrition. I: Evaluation of microscopic and laser light scattering methods for the determination of the physical stability. **Clinical Nutrition.** 11: 223-236. 1992.
- MUSGROVE, E.; SUTHERLAND, R. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. **Nature Reviews.** 9: 631-643. 2009
- NAM *et al.* Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 65: 622-648. 2013.
- NANGIA, S.; SURESHKUMAR, R. Effects of nanoparticle charge and shape anisotropy on translocation through cell membranes. **Langmuir.** 28:17666-27671. 2012.
- NAORA *et al.* A serologically identified tumor antigen encoded by a homeobox gene promotes growth of ovarian epithelial cells. **PNAS.** 98 (7): 4060-4065. 2001
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 13 de março de 2018.
- NEWBY *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. **Clinical Cancer Research.** 3:1643-1651. 1997.
- NICHOLSON *et al.* Growth factor signaling networks in breast cancer and resistance to endocrine agents: new therapeutic strategies. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.** 93: 257-262. 2005.
- NIETH *et al.* Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). **Febs Letters.** 545: 144-150. 2003.
- NIH. Chemotherapy to treat cancer. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/chemotherapy>. 2015a.

- NIH. Hormone therapy to treat cancer. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy>. 2015b.
- NIH. Radiation therapy to treat câncer. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy>. 2017.
- NORTHFELT *et al.* Doxorubicin Encapsulated in Liposomes Containing Surface-Bound Polyethylene Glycol: Pharmacokinetics, Tumor Localization, and Safety in Patients with AIDS-Related Kaposi's Sarcoma. **The Journal of Clinical Pharmacology**, 36(1), 55–63. 1996.
- ONPATTRO. Disponível em: <https://www.onpattro.com/wp-content/uploads/2018/08/ONPATTRO-Patient-Brochure.pdf>. Acesso em: 18 de dezembro de 2018.
- PATHAK, P.; NAGARSENKER, M. Formulation and evaluation of lidocaine lipid nanosystems for dermal delivery. **AAPS Pharm Sci Tech**. 10 (3): 985-992. 2009.
- PELAZ *et al.* Surface functionalization of nanoparticles with polyethylene glycol: effects on protein adsorption and cellular uptake. **ACS Nano**. 9 (7): 6996-7008. 2015.
- PERRAULT *et al.* Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. **Nano Letters**. 9 (5): 1909-1915. 2009.
- PIERCE, B. **Genética: um enfoque conceitual**. 5 ed. Guanabara Koogan, 2016.
- PITTELLA *et al.* Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**. 32: 3106-3114. 2011.
- PITTELLA *et al.* Pancreatic câncer therapy by sistemic administration of VEGF siRNA contains in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. 161: 868-874. 2012.
- PITTELLA *et al.* Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. **Journal of Controlled Release**. 178: 18-24. 2014.
- RAHA *et al.* Combined histone deacetylase inhibition and tamoxifen induces apoptosis in tamoxifen-resistant breast cancer models, by reversing Bcl-2 overexpression. **Breast Cancer Research**. 17: 26. 2015.
- RAND, T. A. *et al.* Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 101 (40): 14385–14389. 2004.
- RAND, T.A. *et al.* Argonaute2 cleavesthe anti-guide strand of siRNA during RISC activatio. **Cell**. 123: 621-629. 2005.
- REYNOLDS *et al.* Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**. 22 (3): 326-330. 2004.
- RIVAS, F. V. *et al.* Purified Argonaute2 and na siRNA form recombinant human RISC. **Nature structural and molecular biology**. 12 (4): 340-349. 2005.

- RUBIN *et al.* A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. **Cancer Research**. 67 (4): 1527-1235. 2007.
- SHAH, N.; SUKUMAR, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. **Nature Reviews**. 10: 361-371. 2010.
- SIАFAKA *et al.* Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses. **International Journal of Molecular Sciences**. 17: 1440-1480. 2016.
- SIERRA *et al.* The new classification of breast cancers: finding the luminal A. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 36 (12): 575-580. 2014.
- SOUSA FILHO, P.; SERRA, O. Metodologia de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. **Quim Nova**. 38 (5): 679-696. 2015.
- SOUTSCHEK *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. **Nature**. 432: 173-178. 2004.
- SOUZA, G. **Desenvolvimento de nanopartículas híbridas para terapia por RNA interferência: silenciamento de genes-chave na sobrevivência celular em câncer de mama**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2016.
- STATEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophys Ver**. 8:409-427. 2016.
- STORTI *et al.* HOXB7 expression by myeloma cells regulates their pro-angiogenic properties in multiple myeloma patients. **Nature**. 25: 527-537. 2011
- SVINGEN, T.; TONISSEN, K. Altered HOX gene expression in human skin and breast cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**. 2 (5): 518-523. 2003.
- TABARA *et al.* The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**. 99: 123-132. 1999.
- TATUR, S. *et al.* Effect of Functionalized Gold Nanoparticles on Floating Lipid Bilayers. **Langmuir**. 29 (22): 6606–6614. 2013.
- TENLLADO, F; DIAZ-RUIZ, J. R. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. **Journal of Virology**. 75 (24): 12288-12297. 2001.
- TOMANIN, R.; SCARPA, M. Why do we need new gene therapy viral vectors? Characteristics, limitations and future perspectives of viral vectors transduction. **Current Gene Therapy**. 4: 357-372. 2004.
- USKOKOVI, V.; USKOKOVI, D. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphate: chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. **Journal of Biomedical Materials Research B: applied biomaterials**. 96B (1):153-191. 2010.
- VIEIRA, D.; GAMARRA, L. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. **Einstein**. 14 (1): 99-103. 2016.
- Whitehead siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. Bingbing Yuan, Robert Latek, Markus Hossbach, Thomas Tuschl, and Fran Lewitter. **Nucl. Acids. Res**. 2004.

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

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

World Health Organization. Cancer: key facts. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 15 de dezembro de 2018.

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

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

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