JORGE LUIS MARÍA RUIZ

**Caracterização de uma nanopartícula lipídica
semelhante à LDL (LDE) como vetor para RNA de
interferência**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ruiz, Jorge Luis Maria

Caracterização de uma nanopartícula lipídica semelhante à LDL (LDE) como vetor para RNA de interferência / Jorge Luis Maria Ruiz. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski

Descritores: 1.Terapia de genes 2.Vetores genéticos 3.Lipídeos
4.Interferência de RNA 5.Resistência a múltiplos medicamentos 6.Neoplasias

USP/FM/DBD-042/11

*Dedico este trabalho a minha
mãe **Eva** pelo apoio e
compreensão incondicionais.
Para você, minha eterna
gratidão.*

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski por me receber com as portas abertas do laboratório quando cheguei ao Brasil, pela oportunidade e confiança que sempre depositou em mim, pelos ensinamentos e amizade que sempre me mostrou.

À Luciana Ferreira Morganti Maselli, por ser como uma irmã para mim, sempre me ajudando em todo e principalmente por seus bons conselhos que levarei sempre comigo.

Agradeço imensamente a Débora Levy por ser minha mestra de bancada, de quem aprendi muito do que sei. Mas, principalmente pela amizade que nos une, pelos momentos compartilhados juntos e por sempre se preocupar por mim.

À Cleide Appolonio, pelo carinho e atenção em todos os momentos e pela revisão de português deste trabalho.

Ao Felipe de Lara Janz, pela amizade, pelos projetos em conjunto, pelas discussões de meu trabalho e pelo apoio em todo momento.

À Linah, pela amizade e bom humor, pelo treinamento em Real Time e pela ajuda com tudo.

À Carolina Martinez Romão, pela amizade, pela camaradagem no trabalho dia a dia e por estar sempre me dando ânimos.

À Graciela, por me ajudar com as técnicas de citometria de fluxo disponibilizando-me o pouco tempo que tem e pela sua amizade.

À Andrea Turbuck Celestino, pela amizade, e a ajuda sempre que necessitei.

Ao Kleber, pela ajuda com os animais, por os trabalhos em conjunto e pela amizade.

Ao Antonio Carlos Magnanelli, a Regina Gil e aos Doutores Raúl Maranhão, Dr. Durvanei Maria, Dr. Fábio Marques, Dr. Cristiano Oliveira, Dra. Silvia Carneiro, Dr. Iberé, Dra. Nélida, Alexandre, Adriano, Monik e Carol, pela ajuda com a realização deste trabalho e os ensinamentos sobre diversas áreas.

À Débora Deus, pela preparação da LDE, pelas discussões e transmissão de conhecimentos na área de lipídios. Por sempre me atender gentilmente quando precisei realizar técnicas no InCor.

À Cristina, pela ajuda com o tamanho da LDE e alguns dados da LDE.

À Vanessa e Rian, por ter me acompanhado na ultima etapa deste trabalho convertendo-se em minha família e dando-me apoio.

Aos meus amigos de sempre, Silvina pela eterna amizade e ajuda com materiais sempre que solicitei; a Santiago e Emília pela amizade e por sempre estarem perto.

À Nair, pelas opiniões sobre meu trabalho e pela amizade.

À Dra. Adriana Debes por me transmitir muito conhecimento.

Às colegas de pós-graduação, Natália, Pâmela, Viviane, Joel, Bruno, Carolina e Karoline pelas dificuldades que passamos juntas.

A meus colegas do LIM-31, Denise, Rosangela, Joel, Nany, André, Bruna, Natalia, Carolina, Victor, pela colaboração, coleguismo e respeito.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, especialmente Angélica e Rose, pela atenção e dedicação dispensada em todos os momentos, durante o curso de pós-graduação.

Enfim, a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, a minha formação como pesquisador e ser humano, meus sinceros agradecimentos.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nanopartículas utilizadas em terapia gênica.....	1
1.2 Nanotecnologia e terapia gênica.....	2
1.3 Nanopartículas poliméricas.....	6
1.4 Lipossomos.....	8
1.5 Emulsão lipídica semelhante à lipoproteína.....	9
1.6 Terapia gênica e RNA de interferência.....	12
1.7 Vetores para RNAi.....	15
1.8 Vetores lipídicos para RNA de interferência.....	17
1.9 Inibição do gene mdr-1 por RNAi.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
3. MÉTODOS.....	22
3.1 Preparo de LDE.....	22

3.2 Preparo de HDL plasmáticas humanas como doadora de apoE.....	23
3.3 Preparo de soro deficiente de lipoproteína (LPDS).....	24
3.4 Cultura de células de sarcoma uterino resistente a quimioterápicos.	25
3.5 RNAi.....	25
3.6 Teste de citotoxicidade dos RNAi e da LDE.....	26
3.7 Análise de ligação dos RNAi com a LDE.....	27
3.8 Análise do tamanho da emulsão lipídica (LDE) e do potencial Z.....	28
3.9 SAXS.....	29
3.10 Microscopia eletrônica de transmissão.....	29
3.11 Análise de internalização celular dos RNAi.....	30
3.12 Marcação de RNAis com Tc-99m.....	31
3.12.1 Presença intracelular de RNAi.....	32
3.12.2 Biodistribuição dos RNAi radiomarcados (^{99m}Tc RNAi/LDE)	
em camundongos.....	33
3.13 Análise da expressão do gene <i>mdr-1</i>	34
3.13.1 Extração de RNA total.....	34
3.13.2 PCR em tempo real.....	34
3.14 Verificação de reversão do fenótipo de resistência a múltiplas	
drogas.....	36
3.14.1 Verificação de alteração na expressão do gene <i>mdr-1</i>	36
3.14.2 Verificação da sensibilidade à doxorrubicina.....	36
3.14.3 Verificação da função da P-gp.....	36
3.15 Análise estatística.....	37

4. RESULTADOS.....	38
4.1.1 Teste de citotoxicidade dos RNAs.....	38
4.1.2 Teste de citotoxicidade da LDE.....	38
4.2 Análise de ligação dos RNAs com a LDE.....	39
4.3 Análise do tamanho da emulsão lipídica (LDE) e do potencial Z.....	42
4.4 SAXS.....	46
4.5 Microscopia eletrônica.....	48
4.6 Análise de internalização celular dos RNAs.....	50
4.7 Marcação de RNAs com Tc-99m.....	52
4.8 Cinética de acumulação celular.....	53
4.9 Biodistribuição dos RNAi radiomarcados (^{99m}Tc RNAi/LDE) em camundongos.....	54
4.10 Padronização da PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão do gene mdr-1.....	56
4.11 Verificação da reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas.....	59
4.12 Verificação da sensibilidade à doxorubicina.....	59
4.13 Verificação da função da P-gp.....	62
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76
8. ANEXOS.....	86

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

β_2 MG	β_2 -microglobulina
μ Ci	Microcurie
Apo	Apolipoproteína
ABCB1	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>
Abs	Absorbância
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
RNAi	RNA de interferência
RNA _m	RNA mensageiro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
cpm	Contas por minuto
col-RNAi	RNA de interferência associado a colesterol
CT	<i>Cycle of Threshold</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido
Dox	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Em	Emissão
Ex	Excitação
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
ID	Dose injetada
K _b	Constante de ligação

Kd	Constante de dissociação
KDa	KiloDalton
LDE	Emulsão de baixa densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPDS	Soro deficiente de lipoproteínas
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MTT	<i>Methyl Thiazolyl Blue</i>
mW	Miliwatt
PBS	Tampão fosfato salina
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	P-glicoproteína
PM	Padrão de peso molecular
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
RISC	Complexo multi-proteico de silenciamento induzido pelo RNA
rpm	Rotações por minuto
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	<i>Short harpin RNA</i>
Tm	Temperatura de anelamento
TRITC	Isotiocianato de rodamina
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Volt

Lista de Figuras

Figura 1: Tipos de nanopartículas para entrega de drogas.....	6
Figura 2: Lipoproteína.....	9
Figura 3: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão.....	10
Figura 4: Mecanismo de ação dos ARN de interferência.....	14
Figura 5: Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de RNAs em células MES-SA DX após 72 horas de incubação, determinado pelo método de MTT.....	38
Figura 6: Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de LDE em células MES-SA DX após 72 horas de incubação, determinado pelo método de MTT.....	39
Figura 7: Retardo dos RNAs em gel de agarose 1%.....	40
Figura 8: Regressão não linear da concentração dos RNAi retidos no gel de agarose.....	40
Figura 9: Espectrofluorimetria do RNAi titulado com LDE.....	41
Figura 10: Máxima emissão de fluorescência do RNAi associado à LDE..	42
Figura 11: Função de autocorrelação apresentando os tamanhos de LDE em função do tempo.....	44
Figura 12: Distribuição de tamanhos da LDE.....	45
Figura 13: Dados experimentais obtidos por SAXS para a LDE e para a RNAi/LDE.....	47
Figura 14: Resultado do modelo de deconvolução por raiz quadrado.....	48
Figura 15: Microfotografia de microscopia eletrônica de transmissão.....	49
Figura 16: Representação do análise morfométrico.....	50
Figura 17: Células MES-SA-Dx incubadas com col-RNAi (A,B e C) e col-RNAi/LDE (D, E e F) por 24 horas.....	51
Figura 18: Células MES-SA-Dx incubadas com col-RNAi (A, B e C) e col-RNAi/LDE (D, E e F) por 48 horas.....	51

Figura 19: Microscopia confocal de células MES-SA-Dx incubadas com col-RNAi (A, B, C e D) e col-RNAi/LDE (E, F, G e H) por 24 horas.....	52
Figura 20: Radiocromatograma dos ^{99m}Tc -RNAi purificados por HPLC....	53
Figura 21: Captação celular de ^{99m}Tc -RNAi.....	54
Figura 22: Biodistribuição de ^{99m}Tc RNAi e ^{99m}Tc RNAi/LDE em camundongos.....	55
Figura 23: Curva de dissociação do gene MDR.....	56
Figura 24: Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene MDR.....	57
Figura 25: Curva de dissociação do gene $\beta 2$ -microglobulina.....	58
Figura 26: Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene $\beta_2\text{MG}$	58
Figura 27: Inibição do gene <i>mdr-1</i>	59
Figuras 28: Viabilidade celular de células MES-SA e MES-SA/Dx5 tratadas com RNAi para <i>mdr-1</i> e doxorubicina.....	61
Figura 29: Comparação dos IC50 das células MES-SA e MES-SA/Dx5 tratadas com RNAi para <i>mdr-1</i> e doxorubicina.....	62
Figura 30: Captação celular de doxorubicina analisado por citometria de fluxo.....	63
Figura 31: Captação celular de doxorubicina analisado por microscopia confocal.....	64

Lista de Tabelas

Tabela 1. Nanopartículas que têm sido utilizadas para entrega de RNAi..	17
Tabela 2. Sequências dos RNAi.....	26
Tabela 3. Valores de IC50 das células MES-SA/DX5 tratadas com RNAi para MDR1 e doxorrubicina.....	61

Resumo

RUIZ, JLM. *Caracterização de uma nanopartícula lipídica semelhante à LDL (LDE) como vetor para RNA de interferência* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011.

As nanopartículas são consideradas promissores vetores para a liberação eficaz e segura de ácidos nucleicos para tipos específicos de célula ou tecido, proporcionando uma alternativa aos vetores virais para terapia gênica.

No entanto, com a maioria destes sistemas não torna possível a entrega de oligonucleotídeos nas células *in vivo* de forma específica. O uso de uma nanoemulsão funcionalmente semelhante à lipoproteína de baixa densidade poderia resolver esse problema, pois esta partícula é capaz de direcionar o transporte das moléculas para a internalização celular através de receptores de LDL.

Aqui, descreve-se um sistema lipídico semelhante à lipoproteína de baixa densidade, LDE, capaz de direcionar e liberar RNA de interferência (RNAi) para as células tumorais *in vitro* e *in vivo* em um modelo celular que expressa resistência a múltiplas drogas (células de sarcoma uterino; MES-SA/Dx5). Estudou-se também as características de captação do complexo LDE-RNAi e a regulação específica do gene *mdr-1*. Os resultados sugerem que a LDE é estável e liga-se com alta afinidade aos RNAs permitindo que eles entrem nas células tumorais, com localização citoplasmática. Em conclusão, a LDE, por direcionar o RNAi a receptores de LDL favorece o silenciamento do gene *mdr-1* por RNAi nas células MES-SA/Dx5 aumentando sua sensibilidade a quimioterápicos.

Descritores: terapia de genes, vetores genéticos, lipídeos, interferência de RNA, resistência a múltiplos medicamentos, neoplasias.

Summary

RUIZ, JLM. Characterization of an lipid nanoparticle resembles LDL (LDE) with vector for interference RNA [Thesis]. São Paulo Medical School, University of São Paulo, 2011.

Nanoparticles are considered promising vectors for efficient and safe delivery of nucleic acids to specific types of cell or tissue, providing an alternative to viral vectors for gene therapy.

However, most of these systems cannot target and deliver oligonucleotides to specific cells in vivo. The use of nanoemulsion functionally resemble low density emulsion could solve this problem, once particle is capable of direct the molecules transport to the cell through internalization in LDL receptors.

Here, we describe a lipid system similar to low density lipoprotein, LDE, capable of targeting and release small interfering RNA (siRNA) to tumor cells in vitro and in vivo in a cell model that expresses multidrug resistance (sarcoma uterine cell line; MES-SA/Dx5). Were also studied the characteristics of uptake of the complex LDE-siRNA, as well as the downregulation of *mdr-1* gene.

The results suggest that LDE is stable and bind with high affinity to siRNAs allowing them to enter tumor cells, with cytoplasmic localization enhanced.

In conclusion, LDE, binds to siRNA through LDL receptors, and promotes *mdr-1* silenciament by RNAi in MES-sa/Dx5 cells, increasing their sensitivity to chemotherapeutics agents.

Descriptors: gene therapy, genetic vectors, lipids, interference RNA, multiple drug resistance, neoplasm.

1. Introdução

1.1 Nanopartículas utilizadas em terapia gênica

O sucesso na cura do câncer está associado a um diagnóstico precoce da doença, assim como a uma terapia eficiente. Nos últimos anos, novas formas de diagnósticos e terapias de combate ao câncer têm sido desenvolvidas, aumentando as chances de diagnósticos em estágios iniciais da doença, potencializando as chances de cura. Nesse sentido, a nanotecnologia tem proporcionado uma verdadeira revolução na medicina, a ponto de ser utilizado o termo “nanomedicina” para esta nova abordagem que utiliza sistemas ou partículas de tamanhos nanométricos.

Nanomedicina é a subdisciplina da nanotecnologia que se empenha para usar essa tecnologia para melhorar as terapêuticas existentes ou criar novas. Muitos cientistas estão desenvolvendo novas formas de combater o câncer, por exemplo, através da criação de nanoestruturas com exclusivas propriedades de internalização celular. Estas técnicas também podem ser estendidas às terapias existentes e a produtos que estão já regulamentados: como drogas, dispositivos e produtos biológicos, bem como combinação de produtos.

Em termos gerais, uma partícula é considerada nanométrica quando apresenta um tamanho inferior a 100 nm (1 nm corresponde a bilionésima parte do metro); no entanto, para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, a

faixa de tamanho adotada é de 5 – 1000 nm (FARAJI e WIPF, 2009; HAMIDI *et al.*, 2008).

A evolução nos métodos de síntese e no entendimento das propriedades das nanopartículas tem possibilitado o desenvolvimento de sistemas exatos de diagnósticos e de terapia do câncer, como a entrega da droga diretamente na célula cancerosa (sistemas de entrega de drogas ou vetores), diminuindo os efeitos colaterais e potencializando a ação do princípio ativo. Estima-se que os sistemas de entrega de drogas utilizem uma quantidade 100 vezes menor do agente ativo e sejam 100 vezes mais eficientes (JAIN, 2008). Os sistemas nanométricos oferecem como grande vantagem a redução ou eliminação dos efeitos colaterais das substâncias transportadas, pois atuam diretamente nas células cancerosas e não ficam livres na via sistêmica. A capacidade que as nanopartículas apresentam para diagnósticos em estágios iniciais de doenças e o transporte de drogas em forma precisa (no sentido de atingir um alvo desejado, no caso a célula do câncer) tem contribuído para o desenvolvimento da medicina personalizada, com o tratamento de cada paciente de forma individualizada (OZPOLAT *et al.*, 2009).

1.2 Nanotecnologia e terapia gênica

A nanotecnologia aplicada à terapia genética não viral se concentra no desenvolvimento de alternativas para vírus como veículos ou vetores para a entrega de genes, para aumentar a segurança e eficiência (AZZAZY *et al.*, 2006). Vetores virais envolvem riscos que o vetor comporta

patogenicamente e isto restringe a dose ou quantidade de vírus que podem ser administrados (YEH *et. al.*, 2005). Além disso, os vetores virais podem sofrer mutagênese insercional, que limita a sua utilização em ambientes clínicos (KAM *et. al.*, 2005). Os investigadores estão tentando desenvolver alternativas não virais para a terapia gênica que possam superar as limitações e os perigos dos vetores virais (AAGAARD e ROSSI, 2007). Os vetores não-virais oferecem diversas vantagens (em relação aos sistemas virais), incluindo o aumento da segurança biológica, baixa imunogenicidade, capacidade de entregar genes de grande porte, bem como a possibilidade de produção em grande escala a um custo razoável (SCHROEDER *et al.*, 2009). No entanto, os vetores não-virais em geral não demonstram a alta eficiência da transfecção viral.

Classicamente, os tratamentos envolvendo os vetores não-virais podem ser divididos em duas categorias: passivo e ativo (WOLF *et al.*, 2009). No tratamento passivo o agente terapêutico é incorporado dentro de uma macromolécula ou de uma nanopartícula (podendo receber também o nome de nanocápsula), que circulam na corrente sanguínea e são acumuladas dentro do tumor através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, ou EPR, MAEDA *et al.*, 2000). Para que as nanopartículas possam circular tempo suficiente dentro do organismo elas devem ser biocompatíveis, ou seja, elas não podem ser reconhecidas como um corpo estranho. Uma das técnicas mais utilizadas para aumentar o tempo de circulação no corpo é recobrir as nanopartículas com polietilenoglicol, técnica chamada de PEGlação.

Alternativamente, cateteres podem ser utilizados para injetar as nanopartículas contendo o agente terapêutico diretamente no tumor.

Já no tratamento ativo, o agente terapêutico é conjugado com uma nanopartícula que possui um ligante (anticorpo) que reconhece especificamente os antígenos relacionados às células do câncer (SINGH e LILLAR, 2009; SHEKHAR, 2009). A liberação da droga no alvo específico ocorre em resposta a certos estímulos, que podem ser biológicos ou externos. Exemplos destes estímulos são as variações de pH e de temperatura. O pH extracelular e intracelular em sistemas biológicos é extremamente afetado por doenças. Assim o pH extracelular em um tumor sólido tende a ser mais ácido (6,5) do que o pH do sangue (7,4) a 37°C. Em vista disso, vetores que sejam sensíveis às variações de pH podem ser utilizados para transporte e liberação de drogas no local específico. A temperatura é outro agente que pode ser utilizado para a liberação da carga em um local específico, uma vez que podem ser desenvolvidas nanopartículas que liberem o agente terapêutico apenas em temperaturas superiores a 37°C. A droga encapsulada estará circulando na via sistêmica; no entanto, a aplicação do estímulo hipertérmico irá ocorrer apenas na área do tumor, causando a liberação apenas nesta região.

Outros possíveis estímulos externos são os campos magnéticos e o ultrassom. Esses estímulos podem ser utilizados, respectivamente, em nanopartículas magnéticas transportadoras que podem ser direcionadas para locais específicos com o auxílio de um campo magnético, e em micelas

encapsuladoras que, depois de injetadas em um tumor, podem ser submetidas à sonicação, permitindo a liberação do agente terapêutico (GANTA *et al.*, 2008).

A incorporação dos agentes terapêuticos nas nanopartículas pode ocorrer por diversos métodos, que em muitos casos utilizam mecanismos de auto-organização. Os agentes terapêuticos podem, por exemplo, ser dispersos em uma matriz polimérica, encapsuladas no núcleo ou adsorvidas na superfície das nanopartículas (HANS e LOWMAN, 2009).

Vários tipos de nanopartículas têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do câncer, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas), nanopartículas poliméricas (micelas, quitosana), nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, assim como os conjugados envolvendo essas nanopartículas. A Figura 1 apresenta algumas nanopartículas que podem ser utilizadas em terapias químicas (CHO *et. al.*, 2008).

Figura 1: Tipos de nanopartículas para entrega de drogas. A, nanopartículas poliméricas em que as drogas são conjugadas ou encapsuladas num polímero. B, micelas poliméricas, blocos anfífilos de polímeros com o centro hidrofóbico que permite que o polímero seja solúvel em água. C, dendrímeros: macromoléculas poliméricas sintéticas de dimensões nanométricas, que são compostas de vários monômeros altamente ramificados que emergem radialmente a partir do núcleo central. D, lipossomos: estruturas de automontagem compostas de bicamadas lipídicas nas quais um volume aquoso é totalmente cercado por uma bicamada lipídica membranosa. E, nanopartículas baseadas em vírus: na estrutura geral, são as gaiolas de proteínas. F, nanotubos de carbono: cilindros de carbono composto de anéis de benzeno (Modificado de CHO *et. al.*,2008)

1.3 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas apresentam um grande potencial como agente transportador de agentes terapêuticos, pois a sua superfície pode ser modificada quimicamente, possibilitando a incorporação de genes, de agentes para imagem por ressonância magnética, de ligantes (anticorpos) que reconheçam de forma específica as células do câncer (FARAJI e WIPF, 2009; FRÉCHET, 2002), e de sinalizadores de morte

celular, possibilitando a construção de verdadeiros dispositivos multifuncionais. Outra característica muito interessante das nanopartículas poliméricas, em especial os dendrímeros, é a sua elevada razão de tamanho, ou seja, apresentam uma elevada área superficial por volume. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), também chamadas de lipoesferas ou nanoesferas lipídicas sólidas, apresentam um tamanho entre 50 e 1000 nm, e são preparadas usando uma grande variedade de ácidos lipídicos, mono-, di- ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos ou ceras, que são estabilizados por surfactantes biocompatíveis aniônicos ou catiônicos (WONG *et. al.*, 2007).

Essas nanopartículas apresentam elevada estabilidade no meio biológico, uma vez que possuem um núcleo rígido que é sólido nas temperaturas ambiente e corporal, o qual é rodeado por uma camada de fosfolipídios. As NLS podem ser utilizadas para encapsular e transportar substâncias lipofílicas, como por exemplo, a doxorrubicina e o paclitaxel. A liberação da carga pode ocorrer seletivamente através de hipertermia (FARAJI e WIPF, 2009), que provoca o rompimento da camada de fosfolipídios e a liberação do agente terapêutico. As nanopartículas lipídicas sólidas utilizam o sistema de entrega passivo, ou seja, utiliza o efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) para se acumularem no tumor.

1.4 Lipossomos

Os lipossomos são vesículas concêntricas bilamelares que possuem uma membrana fosfolipídica na parte externa. Essas nanopartículas podem ser utilizadas para transportar drogas hidrofílicas no seu núcleo hidrofílico ou drogas hidrofóbicas em sua camada fosfolipídica (FARAJI e WIPF, 2009). A natureza anfifílica, a facilidade de modificação superficial, como por exemplo, o revestimento com polietilenoglicol e a boa biocompatibilidade, possibilitam a utilização dessas nanopartículas como carregadores de drogas em terapias, tanto que a primeira droga baseada em nanopartículas aprovada pelo FDA. Trata-se de uma formação lipossomal contendo o agente terapêutico doxorrubicina (Doxil[®]), utilizado no tratamento de AIDS e do sarcoma de Kaposi (CHAN *et al.*, 2009).

O enorme potencial para diagnósticos e para quimioterapias apresentado pelas nanopartículas tem-se refletido no crescimento exponencial do número de publicações envolvendo nanopartículas e sistemas de entrega de drogas. Dentro deste contexto, fica clara a importância que as nanopartículas desempenham no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e terapias do câncer, que potencializem os efeitos dos agentes terapêuticos e minimizem os efeitos colaterais.

FELGNER *et al.* (1987), descreveram pela primeira vez a utilização de moléculas lipídicas com uma cabeça de grupo carregado positivamente para a transfecção de genes em células cultivadas. A eficiência da transferência de genes foi facilitada através da inclusão de uma molécula

lipídica neutra, como a dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) na formulação. O método é comparável em eficiência com a maioria das outras abordagens não-virais para a transferência de genes *in vitro*, e tem sido eficaz na maioria dos tipos de células estudadas.

1.5 Emulsão lipídica semelhante à lipoproteína

Em 1993, MARANHÃO et. al., apresentaram um sistema lipídico em forma de emulsão (LDE), constituído por nanopartículas de, em média, 30 nm, funcionalmente semelhantes à lipoproteína de baixa densidade (LDL, figura 2 e 3). Estas nanopartículas são compostas de lipídios (fosfatidilcolina, triglicérides, colesterol e ésteres de colesterol) em proporções conhecidas, e com um rendimento de produção de 50%. A facilidade de produção aumenta a viabilidade de fabricação em grande escala preservando suas características.

Figura 2: Lipoproteína. Representação esquemática da LDL mostrando os seus componentes (modificado de *Encyclopaedia Britannica*, Inc)

Figura 3: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. LDL isolada por ultracentrifugação diferencial. (A) LDL nativa, (B) LDL oxidada com cobre, (C) LDL oxidada com ferro e (D) detalhe a LDL oxidada com cobre, as setas indicam o lugar de pontes entre as nanopartículas. Modificado de GOMEZ *et. al.*, 2010

A LDE possui a mesma composição lipídica que a LDL, porém falta a porção proteica que pode ser obtida mediante interação com as lipoproteínas plasmáticas. *In vitro*, ela pode obter a apo-lipoproteína E (Apo-E) transferida da lipoproteína de alta densidade (HDL). A Apo-E é uma molécula com maior afinidade pelo receptor de LDL do que a apo-B da LDL e, por este motivo, a LDE apresenta uma internalização mais eficiente que a LDL (MARANHÃO *et. al.*, 1993).

Assim, a LDE pode mimetizar a LDL e dada sua fabricação *in vitro*, é simples carregá-la com qualquer substância lipofílica para que, quando

injetada *in vivo*, seja transportada para células com alta expressão de receptores para LDL.

Além de usar a LDE para estudos de metabolismo da LDL, a mesma já foi testada no transporte de drogas quimioterápicas como paclitaxel, taxol, doxorubicina e vimblastina. Demonstrou-se que esta nanopartícula reduz eficazmente os efeitos colaterais do uso sistêmico de drogas e, ainda tem uma eficácia maior no efeito tóxico das substâncias carregadas (RODRIGUES *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Vista a capacidade apresentada pela LDE de entrar nas células via receptor de LDL e de fazer-lo em maior medida em células com alta expressão de receptores de LDL, foi demonstrado no nosso laboratório que a mesma é capaz de transportar oligonucleotídeos antissenso de forma específica para células tumorais (BYDLOWSKY *et al.*, 1995; LEVY, 2007). Desta forma, foi ampliado o campo de aplicabilidade da LDE.

O racional para o uso da LDE como vetor para a entrega de agentes terapêuticos reside no fato de que as células tumorais apresentam uma elevada taxa de internalização de LDL, mediada por receptores específicos, quando comparadas com os tecidos normais. Esta superexpressão de receptores, em especial os receptores de LDL, pode ser explicada pela alta demanda de lipídios necessários para o crescimento celular e por mecanismos diretamente relacionados à transformação celular. Por esta razão, estas células constituem um alvo interessante para utilizar a emulsão como vetor para agentes terapêuticos. Assim, poder-se-ia atingir genes

expressos só em células tumorais de forma específica, com um mínimo de efeito em células sadias.

1.6 Terapia gênica e RNA de interferência

O descobrimento do silenciamento gênico mediado por RNA de interferência centrou a atenção no silenciamento de oncogenes para a terapia do câncer. O processo de silenciamento por RNA consiste na degradação de um RNAm específico para uma proteína, a qual se quer regular, conseguido mediante a entrega celular de uma molécula curta de RNA de dupla fita. Estas moléculas, que formam parte do complexo sistema de regulação gênica, têm a capacidade de destruir um RNA mensageiro particular de forma específica e altamente potente (BUNCROT *et. al.*, 2006).

Os RNAs foram descritos há pouco tempo, em helmintos *Caenorhabditis elegans* como um mecanismo celular natural de silenciamento gênico pós-transcricional (TAKESHITA e OCHIYA, 2006). Logo se notou a possibilidade de inibir genes de interesse *in vitro* e utilizá-los como ferramenta de pesquisa.

Em pouco tempo, o RNAi transformou-se numa poderosa técnica para a supressão seletiva da expressão gênica em células de mamífero, através da degradação catalítica dos RNAm, iniciada pelos RNAs curtos de dupla fita, mediante um complexo citoplasmático multiprotéico (XU *et. al.*, 2004b).

Os RNAs são um método potente de silenciamento gênico, maior que as moléculas antissenso ou que as ribozimas, porque são tão curtos que evitam a resposta do interferon e, portanto, a resposta imune, e isto incrementa sua aplicabilidade em pesquisa e o seu potencial terapêutico (KUFE *et. al.*,2003).

O mecanismo da ação dos RNAs é o seguinte: quando os RNAs de dupla fita são introduzidos no citoplasma, esses são processados pela enzima DICER (uma RNase-III), que cliva os RNA compridos de dupla fita em curtos fragmentos de 21-28 nucleotídeos com um extremo 5' fosfato e um extremo 3' com grupos hidroxila. Estes RNAs são chamados de RNAs de interferência curtos, do inglês *short interfering RNA* (RNAi ou *siRNA*), e se associam a um Complexo Multiprotéico de Silenciamento Induzido pelo RNA (RISC) (RANA, 2007; PAI *et. al.*,2006).

O RNAi guia o RISC a um RNAm homólogo, produzindo a clivagem endonucleolítica por *Slicer* (Argonauta-2), uma enzima que se encontra dentro do complexo RISC. O RNAm alvo é clivado em um sítio simples no centro do duplex, formado pelo RNAm e o RNAi, resultando no silenciamento gênico. Este processo de silenciamento é altamente sequência específica e também muito eficiente, porque a cadeia antissenso do RNA de dupla fita fica protegida dentro do complexo RISC e, portanto, é conservado como um catalisador para degradar cópias adicionais de RNAm alvo (PAI *et. al.*,2006). O mecanismo pode ser mais bem entendido observando a figura 4.

Figura 4: Mecanismo de ação dos RNAs de interferência. O heterodímero Dcr-2/R2D2 se une ao RNAi que contém o dinucleotídeo sobressalente em 3'. Ago2, o componente central do RISC, desloca o Dcr-2/R2D2. Este transfere o RNAi de dupla fita para Ago-2 com o concomitante clivado da fita passageira. A fita guia é utilizada pelo RISC para clivar o RNAm alvo. As setas rosa representam a via do shRNA (A). As setas verdes representam a via para os RNAs longos de dupla (dsRNA)(B) e as setas amarelas representam as vias para os RNAs curtos (siRNA)(C), (Modificado de CHEN *et al.*, 2007)

Para construir os RNAs deve-se levar em consideração os seguintes parâmetros:

- 1) O baixo conteúdo de grupos G/C dentro da região do RNAm alvo.

Isto está relacionado com uma maior eficiência de silenciamento pelo RNAi.

É recomendada uma quantidade de 30-52% de G/C para a construção do RNAi (REYNOLDS *et. al.*,2004).

2) As sequências de RNAs que contém repetições inteRNAs ou palindrômicos podem formar estruturas inter-RNAs em forma de pregas. As estruturas similares a *harpin loops* podem existir em equilíbrio com as formas de dupla fita, reduzindo a concentração efetiva e o potencial de silenciamento do RNAi. A estabilidade relativa e a propensão a formar *hairpins* internos podem ser estimadas pela temperatura de anelamento pré-determinada (T_m). Sequências com altos valores de T_m podem favorecer estruturas de *harpin*, sendo sugerida uma T_m menor a 20°C (REYNOLDS *et. al.*,2004).

1.7 Vetores para RNAi

Existem várias formas em que se pode gerar o RNAi dentro da célula. Uma delas consiste da síntese química dos RNAs e a posterior entrega nas células-alvo. A outra é por vetores que produzem duas cadeias complementares de RNA separadas, ou produzindo um curto RNA em forma de grampo (shRNAs). Os shRNAs são processados *in vivo* pela *Dicer*, para gerar um RNAi ativo. O uso de plasmídeos ou vetores virais permitem a introdução de promotores sensíveis a drogas ou tecido-específico para limitar a expressão ao tecido-alvo ou a um período de tempo desejado (BARTEL *et. al.*,2004, DEVROE e SILVER, 2004).

Para construir RNAs tipo grampo (*harpin* RNAi), um pequeno inserto de DNA (aproximadamente 70bp) codificando o RNA *harpin* que tem por

alvo o gene de interesse, é clonado dentro de um vetor plasmídeo ou viral contendo um promotor (por exemplo, o promotor U6 ou H1). O vetor assim formado pode ser transferido para dentro da célula e esta passa a expressar um curto RNA *harpin*. Este é, então, rapidamente processado pela maquinaria celular em RNA de dupla fita, de 19-29 nucleotídeos de comprimento. Os RNAs baseados em vetor apresentam algumas vantagens sobre os RNAs sintéticos, pois permitem: (1) estabelecer linhagens celulares estáveis; (2) uma fácil manipulação e uma alta estabilidade; (3) estabelecer linhagens de animais transgênicos para RNAi; (4) estabelecer sistemas de expressão induzíveis; e (5) são mais econômicos (o plasmídeo de DNA pode ser facilmente regenerado) (WANG e MU, 2003).

Apesar destas vantagens, eles apresentam algumas desvantagens que inviabilizam seu uso com fins terapêuticos, como o alto custo de produção em quantidades suficientes de RNAs puros para uso em humanos, a atividade transitória *in vivo* e, em alguns casos, a distribuição dos RNAs a tecidos fora do alvo. Estas limitações podem ser superadas pelo uso de vetores lipídicos para RNAs sintéticos (WADHWA *et. al.*, 2004). Os vetores não virais podem ser adaptados para entrega sistêmica e específica a tecidos e são muito simples de trabalhar (BARTEL *et. al.*, 2004).

Na tabela 1 apresenta-se alguns tipos de nanopartículas utilizadas como vetores para RNAi.

Tabela 1: Nanopartículas que tem sido utilizadas para entrega de RNAi

Categoria de Nanopartículas	Tipo	Natural/Sintético	RNAi/shRNA
Complexos lipídicos	Lípides catiônicos	Sintético	RNAi
	Lipossomos neutrais (DOPC)	Sintético	RNAi
	Lipoplexos	Sintético	RNAi
	Partículas estáveis de lípides-ac. nucleicos	Sintético	RNAi
	Polímeros funcionais de peptídeos	Sintético	RNAi
Polímeros conjugados	moléculas lipofílicas poliméricas (ex: colesterol)	Sintético	RNAi
	Polímeros-PEG	Sintético	RNAi
Polímeros catiônicos	Quitosana	Natural	RNAi/shRNA
	Atelocolágeno	Natural	RNAi/shRNA
	PEG-laço	Sintético	RNAi/shRNA
	Ciclodextrina	Sintético	RNAi/shRNA
	Poli-L-Lisina	Sintético	RNAi/shRNA

Modificado de Ozpolat *et al.*, 2010

1.8 Vetores lipídicos para RNA de interferência

Os RNAs, por serem altamente hidrofílicos e apresentar átomos carregados, não conseguem atravessar as membranas celulares. Por isso, tem que ser usado algum método de entrega de RNAi às células *in vitro*, tais como lipídeos catiônicos, eletroporação ou, simplesmente, por modificações nos próprios RNAs tais como conjugação com colesterol para transformá-los em moléculas lipofílicas (LORENZ *et al.*, 2004; SOUTSCHEK *et al.*, 2004; ; WOLFRUM *et al.*, 2007; DE PAULA *et al.*, 2007). Porém, entregar RNAi *in vivo* é mais difícil, devido ao fato de terem que ser direcionados para o tecido-alvo, para conseguir uma ação terapêutica (CHIEN *et al.*, 2005).

Os vetores lipídicos conseguem transportar RNAs protegendo-os da degradação por enzimas plasmáticas, até atingir a célula-alvo, com a qual se funde liberando o material transportado e possibilitando a sua ação. Só não conseguem distinguir um alvo particular, mas isso é facilmente solucionado com modificações que conferem maior afinidade por certas células.

Muito rapidamente aparecem novos vetores lipídicos nanoparticulados que são modificados na sua composição, para dotá-los de afinidade por diferentes células-alvo. Nas moléculas antissenso, viu-se que estas podiam ser ligadas e transportadas quando tinham alguma modificação lipofílica, como uma molécula de colesterol. Muitos trabalhos demonstram que os oligonucleotídeos conseguem atravessar a membrana plasmática quando são ligeiramente lipofílicos (LORENZ *et. al.*, 2004; UENO *et. al.*, 2008).

In vivo, estas moléculas são carregadas pelas lipoproteínas que naturalmente atuam como transportadoras de colesterol (LDL e HDL) (HAMMEL *et al.*, 2003). Quando isoladas, a LDL e HDL podem ser utilizadas como vetores para moléculas lipofílicas (BUNGE *et. al.*, 2009; HAMMEL *et. al.*, 2003; KADER *et. al.*, 1998; KADER e PATER, 2002). Porém, a purificação destas lipoproteínas é complexa e isto inviabiliza sua utilização como vetores.

1.9 Inibição do gene *mdr-1* por RNAi

Um dos maiores problemas do tratamento do câncer é a perda do efeito antitumoral nos quimioterápicos depois de repetidas doses. A resistência a drogas pode ser definida como a habilidade das células neoplásicas de sobreviverem à exposição a agentes tóxicos em doses máximas toleradas por tecidos normais e refere-se à resistência simultânea a uma variedade de agentes citotóxicos que apresentam diferentes sítios de ação e estruturas químicas diversas (BELL *et al.*, 1985, FLETCHER *et al.*,

2010). Isto é devido principalmente à expressão de genes de resistência nas células tumorais.

O mais estudado destes genes é o ABCB1 ou *mdr-1*, que causa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas em pacientes tratados com quimioterápicos e codifica uma proteína de alto peso molecular, a P-glicoproteína (P-gp), a qual apresenta múltiplas isoformas codificadas por famílias do gene *mdr* (*mdr-1*, *mdr-2*, *mdr-3*) (MADDEN *et. al.*,1998). No entanto, a isoforma conhecida em seres humanos por conferir resistência a drogas é codificada pelo gene *mdr-1*.

Há muitos trabalhos que têm por alvo o gene *mdr-1* e que apresentam inibição parcial do mesmo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os principais métodos utilizados são oligonucleotídios antissenso (THIERRY *et. al.*,1993; ALAHARI *et. al.*,1996; MOTOMURA *et. al.*,1998), que são introduzidos nas células e assim bloqueiam o RNAm em diferentes níveis (JEKERLE *et al.*, 2005).

Mais recentemente, os RNA de interferência têm sido utilizados para bloquear a expressão do gene *mdr-1* em células de carcinoma de mama (XU *et. al.*, 2004a), hepatoma (CHEN *et. al.*,2006), células de leucemia eritroblástica (PENG *et. al.*, 2004), linhagem celular de carcinoma (STEGE *et. al.*, 2004), carcinoma pancreático (NIETH *et. al.*, 2003) e para produção de camundongos transgênicos (*knock out*) para o gene *mdr-1* (MATSUI *et. al.*, 2005).

Devido à potência de inibição dos RNAs e ao potencial do vetor LDE propusemos neste trabalho estudar um sistema de inibição da expressão do gene *mdr-1* e reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas, avaliando a capacidade da LDE de entrega *in vivo* de RNAi.

2. Objetivos

Aprofundar o estudo dos mecanismos de silenciamento gênico, através de RNA de interferência, aprimorando novas ferramentas para a sua utilização *in vivo*, no caso uma nanoemulsão lipídica capaz de ligar a receptores B/E.

Caracterizar a ligação de colesterol-RNAi a uma nanoemulsão lipídica (LDE).

Verificar as propriedades de inibição da expressão do gene *mdr-1* em células tumorais pelo complexo colesterol-RNAi complexado ou não à emulsão lipídica.

3. Métodos

3.1 Preparo de LDE

Foi preparada uma mistura contendo 40 mg de fosfatidilcolina, 20 mg de oleato de colesterol, 1 mg de trioleína, 0,5 mg de colesterol livre e 65 μ Ci de [3H] colesteriloleil éter (atividade específica, 30-60 Ci/mmol). Os lipídeos foram dissolvidos em etanol, que foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e incubado por 14-16 horas em dessecador a 4°C para a completa eliminação do solvente. Os lipídeos foram então ressuspensos em 10 ml de tampão (10 mM Tris.HCl, pH 8.0 e 100 mM KCl), e sonicados continuamente por 180 minutos sob fluxo de nitrogênio e temperatura abaixo de 52°C. A suspensão de lipídeos emulsificada foi então separada por ultracentrifugação em ultracentrífuga Beckman® a 49.000 x g por 24 horas a 4°C em rotor 80Ti. A LDE purificada pela ultracentrifugação foi dialisada para eliminação do KBr e esterilizada por passagem em filtro com diâmetro de poro de 0,22 μ m (Millex-HA) (MARANHÃO et. al.,1993).

A concentração da LDE foi calculada com base na concentração de seu maior componente, a fosfatidilcolina (PC), sabendo que a produção de LDE tem rendimento de 50%.

3.2 Preparo de HDL plasmáticas humanas como doadora de apoE

A preparação de LDL e HDL nativa foi feita a partir de plasma humano, obtido de doadores de sangue saudáveis, após fracionamento do sangue de acordo com o método de HAVEL (1955). Adicionou-se ao plasma benzamidina, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), nas concentrações finais de 2mM, 1mM e 1mg/ml, respectivamente. A densidade do plasma foi ajustada inicialmente de 1,006 g/ml (densidade normal do plasma) para 1,063 g/ml com brometo de potássio (KBr), na quantidade calculada de acordo com a fórmula de RADDING e STEINBERG (1960). Após homogeneização, as amostras foram ultracentrifugadas como descrito anteriormente para o preparo de LDE. Após ultracentrifugação, o material de cor alaranjada (LDL) contido na porção superior do tubo (densidade inferior a 1,063 g/ml) foi aspirado; desprezou-se a porção incolor intermediária, e a porção esverdeada presente no fundo do tubo foi também aspirada. A densidade do material que contém a LDL foi determinada e ajustada para 1,006g/ml com solução salina. Este material foi novamente ultracentrifugado nas mesmas condições descritas acima. A fração de densidade superior a 1,006g/ml foi coletada e dialisada extensivamente contra tampão de 150mM de cloreto de sódio (NaCl) por 48 a 72h. A densidade do material que contém a HDL foi ajustada para 1,215g/ml com KBr. Este material foi novamente ultracentrifugado nas mesmas condições descritas acima. A porção amarela correspondente a HDL foi coletada e dialisada contra tampão de 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) por 72 h. A concentração de proteína, tanto da LDL como da HDL

purificadas, foi determinada pelo método de LOWRY *et al.*, (1951). O material foi esterilizado por passagem em filtro de 0,22 µm e armazenado a 4°C sob atmosfera de nitrogênio até o momento de sua utilização (HAVEL *et al.*, 1955).

3.3 Preparo de soro deficiente de lipoproteína (LPDS)

O plasma total colhido com EDTA como anticoagulante (densidade inicial de 1,006 g/ml) foi ajustado para uma densidade final de 1,215 g/ml com KBr, de acordo com a fórmula de RADDING e STEINBERG (1960). Centrifugou-se a 60.000 rpm por 36 horas a 4°C em rotor 80Ti. Após ultracentrifugação, duas fases foram observadas: a porção superior, correspondente às lipoproteínas, e a porção inferior, correspondente ao plasma LPDS. Coletou-se cuidadosamente a porção inferior e dialisou-se extensivamente contra cerca de 20 litros de 150 mM NaCl por 48 a 72 horas (quatro trocas de tampão de diálise de 5 litros cada). Após a diálise, o plasma deficiente de lipoproteína foi convertido em soro deficiente de lipoproteína pela adição de trombina [10 US (NIH) unidades/ml] e incubado a 4°C por 24 horas. O coágulo resultante foi removido por centrifugação a 18.000 rpm por duas horas a 4°C. O soro foi esterilizado por filtração em filtros de 0,45 µm (Millex-HA). Mediu-se a concentração de proteína pelo método de LOWRY (1951), e ajustou-se para 50 mg/ml com 150 mM NaCl estéril. O LPDS foi aliquoteado esterilmente e mantido congelado a -70°C até o momento de sua utilização (GOLDSTEIN *et al.*, 1983).

3.4 Cultura de células de sarcoma uterino resistentes a quimioterápicos

Células de sarcoma uterino humano MES-SA/Dx5 (ATCC CRL- 1977) (WESOŁOWSKA *et al.*, 2005), resistentes à doxorubicina, foram cultivadas em meio McCoy's 5A (Sigma-Aldrich, EUA) contendo SFB 10% (Gibco, EUA), 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 26,4 mM bicarbonato de sódio (HARKER *et al.*, 1983; HARKER e SIKIC, 1985). Estas células cresceram em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A não ser quando especificado, estas células foram sempre mantidas neste ambiente. As células resistentes foram cultivadas em seus respectivo meios de cultura, acrescidos de 4 mM doxorubicina (Cloridrato de Doxorubicina, Eurofarma) para a manutenção do fenótipo MDR. O fármaco somente foi retirado do meio durante a realização dos experimentos.

3.5 RNAi

Foram usadas duas seqüências diferentes de RNAi: MDR-A, que tem por alvo os nucleotídeos 504 até o 524 do gene *mdr 1* (número de acesso no Gene Bank: M14758) e MDR-B, do nucleotídeo 3050 até o 3070, que foram previamente descritos por WU *et al.* (2003) e NIETH *et al.* (2003) respectivamente, e cujas seqüências são descritas na tabela 1. Também foi utilizada uma seqüência *scrambled* (MDR-S), sem homologia com RNAm de mamíferos. Os RNAi possuíam uma molécula de colesterol em 3' para torná-los lipofílicos. Os RNAi foram ou não complexados com a nanoemulsão lipídica (LDE), empregando-se o mesmo método anteriormente descrito para oligonucleotídios (BYDŁOWSKI *et al.*, 1995; LEVY, 2007). O MDR-A2

corresponde à sequência do MDR-A contendo uma extremidade com um grupo amina em lugar de FITC. As sequências são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos RNAi

Nome	Sequência 5'-3'	Modificação 5'	Modificação 3'
MDR1-A senso	GGA*AAAgAAACCAAC*UGU*CdTdT	FITC	colesterol
MDR1-A antisenso	GACAGUUGGUUUUUUCCdTdT		
MDR1-B senso	AAA*AUGUUGUCUGGA*CA*AGCAdTdT	FITC	colesterol
MDR1-B antisenso	UgCUUgUCCAgACAACAUUUUdTdT		
scrambled-MDR1 senso	UCG*ACAGCUAACAAG*AA*GAdTdT	FITC	colesterol
scrambled-MDR1 antisenso	UCUUCUUGUUAGCUGUCGAdTdT		
MDR1-A2 senso	GGA*AAAgAAACCAAC*UGU*CdTdT	6-Amino	colesterol
MDR1-A2 antisenso	GACAGUUGGUUUUUUCCdTdT		

* indica bases modificadas com ligação fosforotioato

3.6 Teste de citotoxicidade dos RNAi e da LDE

Para determinar o grau de toxicidade que os compostos apresentam em cultivos celulares, foi realizado um ensaio de viabilidade celular. Células de sarcoma uterino resistentes foram cultivadas em meio de cultura McCoy's 5A, semeadas em placas de 96 poços (Corning, EUA) com 1×10^4 células por poço, em triplicata. As células foram incubadas com diferentes concentrações de RNAi (de 0,01 nM a 100 nM) por 3 dias consecutivos. Após 72 horas foi feita a quantificação de células viáveis pelo método MTT (CARMICHAEL, 1987).

Em outros experimentos, as células foram incubadas com diferentes concentrações de LDE (de 2,64 nM até 2,64 mM) por 3 dias consecutivos (CUCCO e CALABRETTA, 1996). Ao final do experimento, a viabilidade foi examinada pelo método de MTT.

3.7 Análise de ligação dos RNAi com a LDE

Para averiguar se os RNAis estavam se ligando à LDE e determinar as concentrações ótimas de ligação, foi feito um ensaio de retardo da migração dos RNAis em gel de agarose. Para isto, os RNAis foram incubados com diferentes proporções com a LDE e depois submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, seguido de corrida a voltagem constante por 45 minutos.

Para estabelecer a constante de ligação entre os RNAis e a LDE foi realizada titulação dos RNAis com LDE. A presença do FITC nos RNAis permitiu a utilização do fluorímetro para detectar a ligação entre RNAi e LDE. Estes experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biologia Estrutural da Faculdade de Química da Universidade de São Paulo, com a colaboração da Profa. Dra. Shirley Schreier. Utilizou-se um espectrofluorômetro Hitachi F4500 (Tokyo, Japan). Como comprimento de onda de excitação utilizou-se 488 nm. Os parâmetros de leitura foram: voltagem de leitura 700 V; split (Ex/Em) de 5 nm/5 nm; velocidade de leitura de 60 nm/min e duas leituras por amostra. Utilizou-se concentração fixa de RNAi e titulou-se LDE até se encontrar o ponto de saturação. Obtiveram-se diferentes espectros de emulsão; conforme aumentava a concentração de LDE, mais fluorescência era emitida, até chegar ao ponto em que não ocorria mais aumento da fluorescência (SCHREIER *et. al.*, 2000).

Tendo-se o espectro da LDE e do complexo RNAi/LDE, foi realizada a subtração dos espectros do complexo RNAi/LDE com os respectivos

espectros da LDE, para assim evitar que o espalhamento de luz, que a LDE promove, causasse erro na análise dos dados. Calculou-se a concentração molar de PC existente em cada titulação, sendo os dados expressos em função da concentração de PC da LDE.

Para determinar a constante de ligação (K_b), os resultados foram analisados de forma análoga à cinética enzimática michaeliana. A K_b foi calculada utilizando-se a média entre o valor médio de fluorescência na saturação do RNAi/LDE e o valor do RNAi sozinho. O valor de fluorescência obtido foi, então, projetado no eixo X. Desta forma, foi obtido um valor da concentração de PC. A constante foi determinada dividindo-se 1 pelo valor obtido de PC.

3.8 Análise do tamanho da emulsão lipídica (LDE) e do potencial Z

O tamanho das nanopartículas em emulsões de diferentes lotes usados nos experimentos foi determinado por *dynamic laser light scattering* ou DLS (Zeta Pals, EUA). Este equipamento contém laser de estado sólido de 15 mW, com coeficiente de difusão de 10^{-6} a 10^{-9} cm^2/s , e ângulo fixo de 90° , e é capaz de medir a variação de tamanho de 2 nm até 3 μm . Para realizar as medições, diluíram-se as emulsões em Tris 0,1N com posterior análise por espalhamento de luz. Também foi determinado se o RNAi complexado na LDE modificou o tamanho desta.

Para analisar a estabilidade de tamanho na LDE foram realizadas medições de diferentes lotes da LDE em diferentes tempos de preparação.

Foram utilizadas emulsões com 1 dia e 1, 3, 4, 5 e 6 meses após a produção.

As medições de potencial Z foram realizadas num *Zeta Potential Analyser* (Zeta Pals, EUA) da mesma forma descrita para as medições de tamanho, porém, utilizando uma cuba com eletrodo de paládio (ZHANG *et al.*, 2008).

3.9 SAXS

Mediante espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) foi estudada a ligação da LDE com os RNAi para posterior formulação de um modelo do complexo RNAi/LDE.

Os experimentos foram realizados no equipamento NANOSTAR™ (Bruker) localizado no Laboratório de Física da Universidade de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr. Cristiano Oliveira. As amostras líquidas foram expostas a raios X usando capilares de quartzo, utilizando como branco os tampões das amostras. Os dados foram obtidos após várias exposições de 3600 s cada uma. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o software SUPERSAXS (OLIVEIRA e PEDERSEN, não publicado).

3.10 Microscopia eletrônica de transmissão

Para observar e mensurar as nanopartículas, foi utilizado microscópio eletrônico de transmissão com o auxílio da Dra. Silvia Carneiro do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. Foram aplicadas

alíquotas de 15 uL LDE e RNAi/LDE sobre uma grade revestida de parlodium/carbono por 2 minutos e, em seguida, o excesso de líquido foi retirado deixando uma pequena quantidade para evitar que secasse.

A coloração negativa foi realizada com 2% de ácido fosfotúngstico, pH 7,2 por 10 s e depois foi secado em temperatura ambiente. As grades foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906E (Zeiss, Alemanha) a 80kV de tensão de aceleração (GÓMEZ *et al.*, 2010). As imagens foram adquiridas mediante câmera TV VarioCam, através do programa KS 300 e salvas em extensão TIF. As imagens foram analisadas com o software ImageJA 1.43h (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.11 Análise de internalização celular dos RNAi

Para demonstrar a entrada dos RNAs nas células e determinar a capacidade da LDE no seu transporte, foram realizadas imagens em microscopia de fluorescência e em microscopia confocal de células incubadas com RNAi e RNAi/LDE por 24 e 48 horas. A aquisição das imagens foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX51 System Microscope (Olympus) e a microscopia confocal foi feita em microscópio confocal Fluoview FV10i (Olympus). As imagens foram processadas e analisadas mediante o software Zeiss LDM Image Browser V3.2.0.115 (CarlsZeiss®).

3.12 Marcação de RNAs com Tc-99m

Para poder quantificar os RNAs em relação à captação celular *in vitro* e à biodistribuição *in vivo*, foi necessária a modificação dos RNAs com um radiomarcador. Isto foi realizado no Laboratório de Marcadores Tumorais do Instituto de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o auxílio do Dr. Fábio Marques. Nestes experimentos foram utilizados RNAs com uma molécula de colesterol na extremidade 3' e um grupo 6-amino na extremidade 5' da fita senso. A fita senso do RNAi foi dissolvida em água livre de RNase a uma concentração de 1 µg/µL e foi misturada com um volume igual de tampão bicarbonato de sódio 0,5 M (pH 8,5). Logo foi acrescentada uma solução fresca de DTPA (ácido difenilodietilenodiamínico) anidro em dimetilformamida (DMF, 10mg/ml) gota a gota, até atingir uma proporção molar de 20:1 (DTPA:iRNA).

Após 60 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi purificada por cromatografia de gel filtração em coluna Sep-Pak C18 mediante eluição com 10 ml de acetonitrilo de grau HPLC e lavada com uma alíquota de 20 ml de água estéril filtrada. A mistura de reação foi diluída a 1 ml com água, e a amostra completa foi aplicada na coluna. A coluna foi lavada com as seguintes soluções: 10 ml de bicarbonato de amônia 25 mM (pH 8,5), 10 ml de bicarbonato de amônia 25 mM/5% de acetonitrilo e duas vezes com 10 ml de água/5% acetonitrilo. O RNAi foi eluído com 4 lavagens de 1ml de água/30% acetonitrilo. Foram coletadas frações de 1 ml e quantificadas a 260 nm em espectrofotômetro. As frações contendo o RNAi foram colocadas

em tubos de 1,5 ml na concentração de 1µg/ml, secas em evaporador centrífugo SpeedVac (Savant AES 1010 SpeedVac®) e estocados a -20 °C até o uso (ZHANG *et. al.*,2000).

O DTPA-RNAi sólido (10 µg) foi dissolvido em 60 µl de acetato de amônio 0,25 M, pH 5,2 e foram adicionados 12 µl de bicarbonato de sódio 0,5 M, 0,25 M de acetato de amônio, 0,175 M de hidróxido de amônio (pH 9,2) para atingir pH final de 7,6. Após a adição de 74-111 MBq de ^{99m}Tc-pertecnetato, foram acrescentados 3-4 µl de uma solução fresca de SnCl₂.2H₂O (1 mg/ml em 10 mM de HCl). A solução foi incubada à temperatura ambiente por 30-60 min. O RNAi marcado foi purificado em coluna P4 com 50 mM PBS, pH 7.2. Após purificação por P4, os RNAis radiomarcados foram analisados por HPLC por exclusão de tamanho usando um coluna Superose-12 1 × 30 cm (Pharmacia, Piscataway, NJ) em linha com um detector UV e detector de radioatividade (Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, Software ProFSA, PerkinElmer, USA) usando fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 como eluente.

3.12.1 Presença intracelular de RNAi

A presença dos RNAis radiomarcados nas células MES-SA/Dx5 foi analisada como descrito a seguir. Foram plaqueadas 1x10⁴ células/poço em placas de 96 poços e mantidas em estufa a 37°C por 24 h. No dia seguinte foram adicionados os ^{99m}Tc-RNAis e ^{99m}Tc-RNAi/LDE aos poços, na concentração final de 5 nM de RNAi. Para realizar a cinética de acúmulo, o tempo de adição foi graduado (36, 24, 16, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0,15 e 0 h), de

forma tal que o final de cada tempo coincidisse e, desta maneira, que a coleta ocorresse simultaneamente no final do estudo de captação. Na coleta, o meio radioativo foi aspirado e estocado; cada poço foi, então, lavado duas vezes com 1 ml de PBS. As células foram lisadas com 1 ml de hidróxido de sódio 0,2 N e 1% de dodecil sulfato sódico de modo a garantir uma completa recuperação da radioatividade. A radioatividade associada às células foi expressa em função do tempo de incubação.

3.12.2 Biodistribuição dos RNAi radiomarcados (^{99m}Tc RNAi/LDE) em camundongos

A entrega *in vivo* de RNAis marcados com tecnécio foi testada em camundongos C57BL6 com xenoenxertos de tumores de melanoma de células B16F10 (JACOB *et. al.*, 2004). Foram utilizados 8 camundongos fêmeas (variação de peso corporal, 25-30 g) que receberam 1×10^6 células B16F10 em 0,1 ml por via subcutânea na coxa direita. Após 14 dias, quando os tumores apresentavam não mais que 1 cm em qualquer dimensão, 100 μCi de ^{99m}Tc RNAi foi administrado por injeção na veia da cauda. Quatro animais receberam ^{99m}Tc RNAi, enquanto outros 4 receberam ^{99m}Tc RNAi /LDE. Em diferentes tempos (1, 2, 12 e 24 horas) os animais foram sacrificados, e os órgãos foram removidos e pesados. A radioatividade presente em cada órgão foi contada em um contador gama (NaI TI), junto com amostras de sangue de volume conhecido e uma alíquota do material injetado. A biodistribuição de radioatividade foi expressa em percentagem da dose injetada por grama (% ID).

3.13 Análise da expressão do gene *mdr-1*

3.13.1 Extração de RNA total

Células de sarcoma uterino resistentes foram contadas e coletadas por centrifugação a 1.850 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foi adicionado 1 ml de TRIzol (Invitrogen, EUA) para cerca de $5-10 \times 10^6$ células e homogeneizou-se bem com uma pipeta. Incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µl de clorofórmio e agitou-se vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo previamente esterilizado. Adicionou-se 500µl de isopropanol e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e homogeneizou-se em vórtex, suavemente, por 15 segundos. Centrifugou-se a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi colocado para secar por 15 minutos à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µL de água tratada com DEPC (CHOMCZYNSKI E SACCHII, 1987; SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.13.2 PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi utilizado para a análise da expressão gênica do gene MDR, através da metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (LEE

et. al.,1996;. LEE *et. al.*,1997) A expressão de cada mRNA foi normalizada em relação à expressão do gene da β_2 -micro-globulina. De acordo com instruções do fabricante do aparelho “Rotor-Gene RG 3000” (Cobertt Research), os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de CT entre as duplicatas não ultrapassaram 0,5. Todos os ensaios utilizaram amostra-referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionado amostra. Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados utilizando-se 500 ng de RNA e o SuperScript III Platinum SYBER Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen), em volume final de 12,5 μ l. A condição usual de programação dos ciclos foi 50°C por cinco minutos para síntese de cDNA, 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Foi realizada curva de dissociação no intervalo de variação de temperatura 50 a 99 °C, sendo 1°C por etapa de 30 segundos.

Os primers utilizados foram:

B2MG-S: 5'- ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA – 3'

B2MG-AS: 5'- ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG – 3'

MDR1-S: 5'- CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG – 3'

MDR1-AS: 5'- GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA – 3'

Para calcular a quantificação relativa foi utilizado o método $\Delta\Delta C_T$, que usa a seguinte fórmula: $\Delta C_T = C_T \text{ gene alvo} - C_T \text{ gene endógeno}$, $\Delta\Delta C_T =$

ΔC_T do gene alvo - ΔC_T do gene endógeno. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK *et. al.*,2001).

3.14 Verificação de reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas

3.14.1 Verificação da alteração na expressão do gene *mdr1*

A reversão do fenótipo MDR foi verificada através da análise de alterações na expressão de P-glicoproteína utilizando a técnicas de RT-PCR, como descrito anteriormente, comparando-se os resultados com os obtidos com as células não tratadas com RNAi e com o complexo RNAi/LDE.

3.14.2 Verificação da sensibilidade à doxorrubicina

Cerca de 5×10^3 células (MES-SA-Dx5 resistentes e tratadas) foram incubadas com diferentes concentrações de doxorrubicina por 72 horas em estufa de CO₂ a 37 °C em meio de cultura com LPDS 10%. Após o tempo de cultura, foi determinada a viabilidade celular mediante o método de MTT comparando com um controle de células que não foram expostas à doxorrubicina. Verificou-se o índice de sobrevivência e determinou-se o IC50 para cada tratamento.

3.14.3 Verificação da função da P-gp

Para estimar a funcionalidade da P-gp após tratamento com RNAi e RNAi/LDE, 1×10^5 células MES-SA-Dx5 foram semeadas em placas de 6 poços contendo uma lamínula circular de 13 mm. Às 24 horas foram tratadas

com 5 nM de RNAi e RNAi/LDE e 48 depois foram incubadas por 1 hora com 1 μ M de doxorrubicina. Após o tratamento, foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio de cultura por 3 horas para permitir a extrusão da doxorrubicina. No final, as lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 0,4% por 20 min e montadas em lâminas usando glicerina tamponada. As lâminas assim preparadas foram observadas em microscópio confocal e as imagens analisadas mediante software Zeiss LDM Image Browser V3.2.0.115 (CarlsZeiss[®]).

Para quantificar a extrusão de doxorrubicina, 1 x 10⁵ células MES-SA-Dx5 foram semeadas em placas de 6 poços, as 24 horas foram tratadas com 5 nM de RNAi e RNAi/LDE e 48 horas depois, foram incubadas por 1 hora com 1 μ M de doxorrubicina. Após o tratamento, foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio de cultura por 3 horas para permitir a extrusão da doxorrubicina. Ao termino, as células foram soltas mediante EDTA e foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, CA, EEUU).

3.15 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o software GraphPad Prism V5 (©GraphPad Software Inc.). Foi realizada a estatística descritiva e os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Quando foram comparados tratamentos foi realizado o teste de ANOVA considerando $p < 0,5$ como significativo e para a análise dos dados de expressão gênica foi utilizado o teste não paramétrico de Crustal-Wallis.

4. Resultados

4.1.1 Teste de citotoxicidade dos RNAs.

Os RNAs mostraram-se inócuos para as células após 72 horas de incubação em todas as concentrações estudadas (figura 5). Sendo as concentrações de uso de 5 e 10 nM podemos afirmar que os RNAs não foram tóxicos para as células.

Figura 5: Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de RNAs em células MES-SA/DX5 após 72 horas de incubação, determinado pelo método de MTT

4.1.2 Teste de citotoxicidade da LDE

A LDE apresentou uma toxicidade baixa, com um IC 50 de 120 μ M. Determinou-se, então, que a LDE seria usada em concentrações de 66 μ M.

Nestas concentrações a LDE torna-se saturada de RNAi e permanece com baixa toxicidade (figura 6).

Figura 6: Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de LDE em células MES-SA/DX5 após 72 horas de incubação, determinado pelo método de MTT

4.2 Análise de ligação dos RNAs com a LDE

Como se pode verificar na fotografia do gel de agarose (figura 7), foi possível determinar que os RNAs ligam-se à emulsão, já que ao aumentar a razão de emulsão misturada com RNAi, é observado que mais RNAi permanece retido no início do gel e não apresenta migração, devido ao fato de a emulsão ter um tamanho que a impede de migrar. Mediante análise de densitometria do gel de agarose foi determinada a constante de ligação entre o RNAi e a LDE (figura 8).

Figura 7: Retardo dos RNAs em gel de agarose 1%. Proporções crescentes de LDE conjugada com RNAi em gel de agarose 1% corrido por 30 min à voltagem constante de 90V; corante: brometo de etídio

Figura 8: Regressão não linear da concentração dos RNAi retidos no gel de agarose. Concentração de RNAi associado à LDE em função da concentração de PC presente na LDE. O cálculo da regressão não linear em relação à PC permitiu determinar o $K_b = 1,61 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (linha cinza)

Uma vez estabelecido isto, foi determinada a constante de ligação dos RNAs e a LDE utilizando uma metodologia mais acurada, para assim obter e confirmar a relação molar de união. Através de espectrofluorimetria foi calculado o ponto de saturação, mediante titulação com incrementos na concentração da LDE, mantendo constante a do RNAi (figura 9).

Figura 9: Espectrofluorimetria do RNAi titulado com LDE. Varredura de fluorescência desde 500 nm ate 650 nm de 0,41 μM de RNAi com quantidades crescentes de LDE

Com estes dados, através de regressão não linear, determinou-se que o K_b é igual a $4,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (figura 10). Esta constante expressa a força de ligação entre o RNAi e a LDE.

Figura 10: Máxima emissão de fluorescência do RNAi associado à LDE. Máxima emissão de fluorescência em função da concentração de fosfatidilcolina (PC) na LDE. O cálculo da regressão não linear em relação à PC (linha cinza) permitiu determinar o $K_b = 4,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

4.3 Análise do tamanho da emulsão lipídica (LDE) e do potencial Z

O espalhamento dinâmico de luz (também conhecido como DLS ou espectroscopia de correlação de fótons) é uma técnica que permite mensurar o perfil de distribuição de tamanho de pequenas partículas que estão em suspensão.

Para a análise dos dados obtidos por DLS, foi utilizada uma função de autocorrelação gerada mediante a transformação invertida de Laplace. (GLATTER e HOFER, 1988). Este método, conhecido como análise de

CONTIN, permitiu separar as populações de partículas de tamanhos diferentes como é mostrado na figura 11, onde pode ser visto que os dados ajustam-se perfeitamente na curva da função CONTIM.

O diâmetro médio e a polidispersão LDE usada nos experimentos foi estimada por *laser light scattering* em $40 \pm 0,3$ nm de diâmetro com variações não significativas entre as diferentes preparações. A ligação com o RNAi modifica não significativamente o tamanho médio da LDE em cerca de 10%, sendo de $45 \pm 0,5$ nm. A polidispersão foi de $0,250 \pm 0,050$ para a LDE, permanecendo constante quando esta foi combinada com o RNAi.

Para a análise de emulsões após diferentes tempos de produção, foi estudada a distribuição de tamanhos com relação ao número de partículas, ao volume destas e a intensidade; estes dados são apresentados na figura 12.

Figura 11: Função de autocorrelação apresentando os tamanhos de LDE em função do tempo. Em vermelho se apresenta a curva de regressão CONTIN que permite ajustar os dados

Figura 12: Distribuição de tamanhos da LDE. Observa-se a distribuição de tamanhos de LDE com diferente tempo de produzida, indicado pelas variáveis: numero (A), volume (B) e intensidade (C) em função do radio

O potencial Z das nanopartículas foi de $-46 \pm 3,61$ mV, sem ser modificado pelas interações com o RNAi, o que indica que a nanopartícula permanece estável.

4.4 SAXS

Os resultados são apresentados como Intensidade $I(q)$ versus transferência de momento q . onde $q=(4\pi/\lambda)\sin\theta$, λ é a longitude de onda da radiação e 2θ é a, o ângulo de espalhamento (Figura 13). Os dados foram normalizados a uma escala absoluta, usando água como padrão primário. A transformação de Fourier indireta foi realizada utilizando o método de Glatter (GLATTER, 1979, 1980).

Os resultados preliminares indicam que o RNAi é incorporado dentro da LDE, o que conduz a mudanças no perfil de densidade eletrônica da nanopartícula.

Figura 13: Dados experimentais obtidos por SAXS para a LDE (A) e para a RNAi/LDE (B)

Para obter informação adicional foi aplicado um procedimento de modelagem introduzido por GLATTER (1980), a abordagem de desconvolução por raiz quadrada. Neste procedimento é assumida uma simetria bem definida e um perfil de densidade eletrônica com simetria central, que permite um melhor ajuste da função $p(r)$. O perfil de densidade eletrônica é construído por camadas concêntricas com uma densidade de elétrons certa. O gráfico da função $p(r)$ e os perfis de densidade eletrônica obtidos são apresentados na figura 14.

Figura 14: Resultado do modelo de desconvolução por raiz quadrada. Densidade eletrônica através do diâmetro da LDE (A) e da LDE combinada com o RNAi (B). Modelo simples da diferença de densidade eletrônica entre a LDE e a LDE combinada ao RNAi em função do raio (C)

4.5 Microscopia eletrônica

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão foram processadas e analisadas para determinar a distribuição de tamanho por morfometria. O resultado foi uma média de $31,7 \pm 11,35$ nm para a LDE e de $28,45 \pm 11,69$ nm para a LDE associada ao RNAi (figura 16).

Nas microfotografias pode-se perceber o caráter polidisperso da LDE (figura 15).

Figura 15: Microfotografia de microscopia eletrônica de transmissão. Em A e B, observa-se diferentes campos de microfotografias da LDE. Em C e D, pode ser observada a morfologia da LDE associada ao RNAi. Na parte superior de D pode-se observar em destaque um aumento de uma preparação de RNAi/LDE com partículas semelhantes a lipossomos multilamelares

Figura 16: Representação do análise morfométrico. Uma microfotografia de LDE com varias partículas cujos diâmetros foram avaliados. Do lado da imagem, os resultados em coluna indicam o diâmetro mensurado para cada nanopartículas em nanômetros

4.6 Análise de internalização celular dos RNAis.

Na figura 17 pode-se observar que tanto o RNAi sem vetor quanto o RNAi/LDE penetram nas células após 24 horas de incubação.

Figura 17: Células MES-SA-Dx incubadas com col-RNAi (A,B e C) e col-RNAi/LDE (D, E e F) por 24 horas. Microscopia de fluorescência com coloração de DAPI para núcleo, Faloidina-TRITC para actina e o col-RNAi conjugado com FITC. O aumento é de 40X

A figura 18 apresenta os resultados após 48 horas de incubação. As células com RNAi apresentam uma diminuição da fluorescência quando comparadas com aquelas tratadas com RNAi/LDE.

Figura 18: Células MES-SA-Dx incubadas com col-RNAi (A, B e C) e col-RNAi/LDE (D, E e F) por 48 horas. Microscopia de fluorescência com coloração de DAPI para núcleo, Faloidina-TRITC para actina e o col-RNAi conjugado com FITC. O aumento é 40X

Através de microscopia confocal foi possível determinar que o RNAi apresenta distribuição tanto nuclear quanto citoplasmática. Também através de microscopia confocal foi determinada a colocalização dos col-RNAis quando se usa a LDE como vetor (figura 19, H).

Figura 19: Microscopia confocal de células MES-SA-Dx incubadas com col-RNAi (A, B, C e D) e col-RNAi/LDE (E, F, G e H) por 24 horas. Coloração de DAPI para núcleo, Faloidina-TRITC para actina e o col-RNAi conjugado com FITC. Em D e H, pode-se observar a superposição das três imagens de cada tratamento

4.7 Marcação de RNAs com Tc-99m

Para poder realizar determinações quantitativas de biodistribuição, os RNAs com uma extremidade 6-amino foram marcados com 99m-Tecnécio. Foi obtido um rendimento de 10 a 15 % nas diferentes preparações. Estas foram purificadas e analisadas por HPLC e o radiocromatograma é apresentado na figura 20.

Figura 20: Radiocromatograma dos ^{99m}Tc -RNAi purificados por HPLC. Radioatividade dos produtos marcados em função do tempo de retenção que, em média, foi de 30 minutos

4.8 Cinética de acumulação celular

A acumulação celular dos ^{99m}Tc -RNAis mostrou-se similar à relatada na literatura para RNAi (LIU *et. al.*, 2007) (figura 21).

Figura 21: Captação celular de ^{99m}Tc -RNAi. Células MES-SA/Dx5 foram incubadas por 36 horas com ^{99m}Tc -RNAi e ^{99m}Tc -RNAi/LDE. As células foram lisadas e quantificadas em vários intervalos de tempo

4.9 Biodistribuição dos RNAi radiomarcados (^{99m}Tc RNAi/LDE) em camundongos

Na figura 22 podemos observar a biodistribuição dos ^{99m}Tc RNAi e ^{99m}Tc RNAi/LDE nos tempos de 1, 2, 12 e 24 horas.

Figura 22: Biodistribuição de ^{99m}Tc RNAi e ^{99m}Tc RNAi/LDE em camundongos. Gráficos com o porcentagem de captação de ^{99m}Tc RNAi em cada órgão em vários tempos

O conteúdo de ^{99m}Tc RNAi em sangue diminui rapidamente, e sugestivamente de forma maior quando utilizada a LDE. Como já é sabido, não se distribuem para o cérebro e apresentam uma leve acumulação em tumor.

A maior acumulação apresenta-se nos rins e no fígado, porém nas 24 hs, a quantidade encontrada nos rins supera a quantidade no fígado.

4.10 Padronização da PCR em tempo real para quantificação relativa da expressão do gene *mdr-1*.

Foi verificada a especificidade da reação de RT-PCR realizando-se a curva de dissociação. A reação foi específica para o produto de PCR analisado, ocorrendo a presença de apenas um pico (figura 23).

Figura 23: Curva de dissociação do gene MDR. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência

A figura 24 demonstra a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de mRNA. A eficiência foi calculada através da fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. Desta forma, a eficiência de amplificação do gene MDR foi 102%.

Figura 24: Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene MDR

Como gene endógeno foi utilizada a β_2 -microglobulina. Para análise de especificidade, foram realizadas diluições seriadas do mRNA das células de sarcoma uterino resistentes à doxorrubicina nas concentrações de 31,2, 62,5, 125, 250 e 500ng. As amostras foram amplificadas em duplicata. Realizou-se a curva de dissociação e a reação foi específica para o produto de PCR analisado, havendo a presença de apenas um pico (figura 25).

Figura 25: Curva de dissociação do gene $\beta 2$ -microglobulina. Na abscissa observa-se a temperatura em graus Celsius e na ordenada observa-se a intensidade de fluorescência

A figura 26 demonstra a regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de mRNA. A eficiência de amplificação do gene β_2 MG foi de 90%.

Figura 26: Regressão linear semi-log do valor do C_T em comparação ao log da quantidade inicial de RNAm para o gene β_2 MG

4.11 Verificação da reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas

Através de PCR em tempo real foi confirmado que os RNAs inibem a expressão do gene MDR-1 por atuação no RNA mensageiro (figura 27). A expressão do gene foi diminuída em até 60%. Porém, o vetor LDE não teve nenhuma influência na expressão do gene.

Figura 27: Inibição do gene *mdr-1*. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *mdr-1* em células MES-SA/Dx5 tratadas com RNAi para duas sequências diferentes (MDR-A e MDR-B), usando o RNAi isoladamente ou acoplado ao vetor LDE

4.12 Verificação da sensibilidade à doxorrubicina

O aumento da sensibilidade celular à doxorrubicina é um indicativo da falta ou inatividade de proteínas que atuam como bombas

transportadoras de drogas tais como a P-gp. Assim, permite inferir o efeito dos RNAs.

Para calcular os valores de sobrevivência celular foi utilizada a seguinte formula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs das células tratadas}}{\text{Abs das células não tratadas}} \times 100$$

A figura 28 apresenta as curvas de viabilidade celular após 72 horas de incubação das células MES-SA/DX5 com diluições seriais de doxorubicina. A concentração inibitória (IC50) foi determinada das curvas de sobrevivência celular em função da concentração de droga mediante regressão não linear para cada tratamento.

Figuras 28: Viabilidade celular de células MES-SA e MES-SA/Dx5 tratadas com RNAi para *mdr-1* e doxorubicina. As células foram pré-incubadas com RNAi por 24 horas e tratadas por 48 horas com doxorubicina

Na figura 29 e na tabela 3 são mostrados os valores de IC₅₀ das células MES-SA/DX5 sem tratamento e das células após incubação com RNAi. Também é apresentado o IC₅₀ das células MES-SA que são sensíveis à doxorubicina.

Tabela 3. Valores de IC₅₀ das células MES-AS e MES-AS/Dx5 tratadas com RNAi para MDR1 e doxorubicina

Tratamento	IC ₅₀ (nM)	DP
MES-SA	30	5,65
MES-SA/DX5	647,5	113,8
MES-SA/DX5 + MDR-A	633	248,9
MES-SA/DX5 + MDR-A/LDE	452,5	37,48
MES-SA/DX5 + MDR-B	597,5	229,8
MES-SA/DX5 + MDR-B/LDE	277	2,83

Figura 29: Comparação dos IC50 das células MES-SA e MES-SA/Dx5 tratadas com RNAi para *mdr-1* e doxorubicina. As células foram pré-incubadas com RNAi por 24 horas e tratadas por 48 horas com doxorubicina

4.13 Verificação da função da P-gp

Como é apresentado na figura 30, a função da P-glicoproteína avaliada por citometria de fluxo apresentou um aumento do índice médio de fluorescência naquelas células que foram tratadas com o RNAi associado à LDE, sendo o esperado, dado que o efeito do RNAi é diminuir a P-gp e, portanto, propiciar o aumento da concentração intracelular de doxorubicina.

Figura 30: Captação celular de doxorubicina analisada por citometria de fluxo. Em A, população analisada de células MES-AS/Dx5. Em B, células controles sem incubação com doxorubicina. Em C, células incubadas com doxorubicina por 3 horas. Em D e E as células foram pré-incubadas por 24 horas com RNAi e RNAi/LDE respectivamente. Em C, D e E é indicado o índice médio de fluorescência (IMF) corrigido pelo número de eventos adquiridos

Mediante microscopia confocal confirmamos os resultados obtidos por citometria, podendo avaliar que a doxorubicina apresenta uma acumulação nuclear e o RNAi consegue aumentar a concentração da droga dentro da célula, como pode ser notado na figura 31, C e E.

Figura 31: Captação celular de doxorubicina analisado por microscopia confocal. Em A e B, células MES-AS/Dx5 controles tratadas com doxorubicina. Em C e D, células pré-incubadas com RNAi para MDR-1 incubadas com doxorubicina. Em E e F, células pré-incubadas com RNAi/LDE e tratadas com doxorubicina. Em B, D e F as imagens tem sobreposição do DIC

5. Discussão

O descobrimento relativamente recente dos RNAs de interferência (Fire *et al.*, 1998) revolucionou a área da biologia e, em seguida, a da medicina, devido ao potencial terapêutico para o tratamento de doenças causadas pela desregulação gênica. Somado ao uso de nanopartículas, os RNAs são uma poderosa arma para o combate ao câncer (OZPOLAT *et al.*, 2010; KHURANA *et al.*, 2010).

De fato, esta ferramenta de pesquisa agora está mostrando que possui amplas aplicações médicas. O principal problema na aplicação dos RNAi é a falta de vetores, o que dificulta sua utilização em humanos, já que eles apresentam uma limitada biodistribuição e uma curta meia-vida quando em contato com o plasma (AAGAARD e ROSSI, 2007). Uma forma de melhorar suas propriedades na circulação sanguínea é torná-los lipofílicos mediante conjugação com moléculas de colesterol ou similares que permita a associação com lipoproteínas plasmáticas que os protejam da degradação (AAGAARD e ROSSI, 2007).

SOUTSCHEK *et al.* (2004) demonstraram que RNAs modificados com grupos lipídicos conseguem atingir tecidos com alto requerimento de colesterol, como o fígado. Além disso, os RNAs com colesterol são transportados por lipoproteínas plasmáticas quando injetados em camundongos, tendo como alvo primário o fígado. E, recentemente, foi demonstrado que é possível obter um aumento na inibição *in vitro* do gene

mdr-1 utilizando RNAs modificados com colesterol (KRUGLOVA *et al.*, 2010).

Assim, os RNAs modificados com colesterol tem todo o potencial para se converter rapidamente em produtos terapêuticos. Sabe-se que entre as principais lipoproteínas carregadoras de colesterol encontra-se a lipoproteína de baixa densidade (LDL), que o transporta aos tecidos (GOLDSTEIN *et al.*, 1983). A LDL direciona o colesterol para aquelas células com altos requerimentos de biomembranas e com uma taxa metabólica elevada, que possuem uma grande expressão de receptores de LDL (LDLr). Por este motivo, quando o alvo são as células tumorais, a LDL é a lipoproteína mais indicada para transportar substâncias a estas células de forma específica (HAMMEL *et al.*, 2003).

Embora, a LDL tenha grande potencial como transportadora de RNAi, é difícil isolá-la em grandes quantidades. Assim, moléculas sintéticas similares podem, em tese, substituí-la como vetores para o transporte de RNAs lipofílicos específicos para células tumorais. Existem poucos trabalhos que tentam utilizar lipoproteínas plasmáticas como vetores devido às dificuldades acima mencionadas; por isto, os pesquisadores estão direcionando os esforços ao estudo de materiais sintéticos (KADER e PATER, 2002).

Nosso laboratório já tem bastante experiência trabalhando com uma emulsão lipídica semelhante à LDL, a LDE. Esta já é utilizada para o

transporte de drogas quimioterápicas. Nosso laboratório estuda sua aplicabilidade na terapia gênica (BYDLOWSKI *et al.*, 1995; LEVY, 2007).

Neste trabalho, encontramos que a LDE apresenta uma toxicidade leve, tendo um IC50 de 120 μM em cultura de células de sarcoma uterino. O uso da LDE pode ser realizado em concentrações de escala nanomolar, assim evitando qualquer toxicidade, sem perda da eficiência. Dado que os RNAs não são tóxicos em nenhuma concentração e sua principal vantagem é a alta eficiência a baixas concentrações, não deveria existir nenhum efeito de saturação do vetor, dado que a LDE pode ser sempre utilizada em excesso.

A LDE foi capaz de se ligar aos RNAs que possuem colesterol covalentemente unido, como demonstrado mediante a retenção dos RNAs no gel de agarose após incubação com diferentes razões de LDE. Mediante densitometria, as bandas obtidas no gel foram quantificadas e foi realizada uma regressão não linear para determinar a constante de ligação. Esta foi de $1,61 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Devido à densitometria ser uma técnica semiquantitativa, realizamos uma titulação em fluorímetro para poder obter uma constante de ligação com maior acurácia. Este novo experimento resultou num K_b de $4,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. As duas constantes têm a mesma ordem de magnitude e indicam uma interação forte entre a LDE e os RNAs.

A LDE, e a sua união aos RNAs, foram caracterizadas por outras técnicas como o DLS, que mostrou que a LDE possui um tamanho de $40 \pm 0,3 \text{ nm}$, sendo que a ligação do RNA não modifica significativamente seu

tamanho, apresentando a média de $45 \pm 0,5$ nm. As partículas deste tamanho têm a vantagem de atravessar os capilares sanguíneos e se distribuir em todos os órgãos; porém, ainda não conseguem atravessar as barreiras dos órgãos imunologicamente privilegiados (FARAJI e WIPF, 2009).

A LDE, quando mantida a 4°C , modifica sua distribuição de tamanho em função do tempo, sendo que depois de 6 meses apresenta formação de partículas grandes, da magnitude de microns (figura 12), como possível consequência da perda de estabilidade entre as nanopartículas e fusão das mesmas. Em relação a este resultado, é importante ressaltar que a LDE mantém partículas de tamanho menor passados até vários meses após sua produção, o que demonstra a sua estabilidade e vantagens frente a outras preparações que tem meia-vida de semanas. Esta é uma vantagem muito importante para um produto com potencial de comercialização.

Estes dados, referentes ao tamanho da LDE, foram também constatados semiquantitativamente por análises morfométricas de microfotografias eletrônicas, como pode ser observado na figura 16, que resultou em $31,7 \pm 11,35$ nm para a LDE e de $28,45 \pm 11,69$ nm para a LDE associada ao RNAi. Assim, apesar da diferença não ser significativa com os outros métodos, a microscopia permitiu observar que trabalhamos com partículas discretas e polidispersas.

Alem deste método, uma informação complementar obtida por SAXS confirma que o tamanho da LDE é em media de 40 nm e a ligação com o RNAi não modifica seu tamanho.

Outro dado importante é o potencial zeta, que indica o grau de estabilidade de uma dispersão; quanto mais longe do valor 0, mais estável é considerada uma substância que se encontra dispersa, devido a que as forças eletrostáticas tendem a manter as partículas afastadas. No caso da LDE, a nanoemulsão apresentou um potencial Z de $-46 \pm 3,61$ mV, indicando uma alta estabilidade e um caráter geral negativo na sua parte externa. Isto nos permite supor que o RNAi esteja incorporado dentro da nanoemulsão e não na sua superfície. Esta hipótese é embasada pelo fato da ligação com o RNAi não ter modificado o valor do potencial Z, o que também permite afirmar que não existe desestabilização na LDE quando ela interage com os RNAis.

Para conhecer a nível molecular como é a ligação entre a LDE e os RNAis, realizamos medições de dispersão de raios X a baixos ângulos e podemos afirmar que a ligação dos RNAis afeta a densidade eletrônica da LDE, mantém o tamanho da LDE e confirma a ligação entre as duas substancias.

Estes resultados preliminares estão sendo utilizados para o desenvolvimento de um modelo mais detalhado e versátil da distribuição do RNAi na LDE, que possa incluir características extras como, por exemplo, polidispersão, interfaces não esféricas e espalhamentos entre as camadas

concêntricas da LDE. Estas são metas possíveis, já que temos como base os conhecimentos referentes a modelos de LDL humana (HEVONOJA *et al.*, 2000).

Na microscopia eletrônica podemos observar as partículas discretas da LDE e que podem ser comparadas às imagens da LDL da figura 3. Podemos ver que as partículas exibem características similares de morfologia e tamanho, sendo evidente que a LDE é mais polidispersa que a LDL. Outra observação interessante das imagens é a formação similar a lipossomos que encontramos em algumas preparações contendo RNAi/LDE. Podemos presumir que são lipossomos formados pelos RNAs livres, como consequência da extremidade contendo colesterol.

As moléculas de RNAi com colesterol possuem uma extremidade altamente hidrofóbica e a outra hidrofílica, o que lhes proporciona novas características físico-químicas e assemelha suas propriedades às de moléculas capazes de formar estruturas em forma de camada que, em um meio polar, tendem a esconder a porção hidrofóbica no interior, interagindo com outras partes com mesmas características. Assim, formam-se lipossomos (figura 15D) multilamelares que apresentam morfologia similar à microscopia eletrônica. Para podermos afirmar, porém, que isto é uma propriedade dos RNAs, temos que realizar uma preparação de microscopia eletrônica com RNAi (BIBI *et al.*, 2010)

Portanto, todos os resultados analisados até o momento permitiram-nos caracterizar a LDE como um vetor capaz de carregar RNAs sem perda de estabilidade nem de características.

Assim, fizemos ensaios de captação celular em células de sarcoma uterino em 24 e 48 horas e analisamos as células por microscopia de fluorescência e confocal. Pudemos observar que os RNAs entram na célula sem necessidade de vetor e em 24 hs não parece existir diferenças entre as imagens obtidas no grupo RNAi e complexo RNAi-LDE. Dado que não é possível fazer uma análise não subjetiva, só podemos presumir que em ambos os casos o RNAi entrou na célula. Já em 48 hs podemos presumir que existe uma diferença entre os tratamentos. Quando é utilizada a LDE, talvez como consequência da presença de RNases no meio de cultura, pode estar havendo degradação dos RNAs, e a LDE exerceria um efeito protetor, permitindo a possibilidade dos RNAs entrarem na célula por um tempo mais prolongado.

Nas imagens de microscopia confocal podemos localizar os RNAs com uma distribuição nuclear e citoplasmática tanto quando é utilizada a LDE e quando não é utilizada.

Dado que as imagens de microscopia não permitem quantificar a captação celular de RNAi, procedemos à marcação dos mesmos com material radioativo e, neste caso, utilizamos ^{99m}Tecnécio. Mediante a conjugação de DTPA com a extremidade 6-amino da fita senso do RNAi,

conseguimos marcá-los com um rendimento do 10 a 15 % livre de impurezas, como pode ser visto na figura 20.

Os ^{99m}Tc -RNAis foram utilizados *in vitro* para quantificar a captação celular. Assim, não encontramos diferenças significativas na internalização dos ^{99m}Tc -RNAis quando utilizamos LDE. Porém, após 20 horas, encontramos um aumento na quantidade intracelular do ^{99m}Tc -RNAi que foi associado à LDE, sugerindo uma estabilidade maior deste produto.

A captação de ^{99m}Tc -RNAi encontrado na literatura é similar à encontrada em nossos experimentos (LIU *et. al.*, 2007); porém, não encontramos dados com as mesmas linhagens celulares por nós estudadas.

Estudamos também a biodistribuição dos ^{99m}Tc -RNAis *in vivo* em camundongos. Encontramos que, após a injeção, a concentração plasmática diminui rapidamente, sendo mínima após 24 h, mostrando a rápida depuração plasmática. Aparentemente, a distribuição se dá primariamente no fígado, sendo esta uma provável via de eliminação, dado que o colesterol do ^{99m}Tc -RNAi pode ser transportado pelas lipoproteínas plasmáticas, e a LDE, igualmente às LDL, encontra receptores no fígado. O acúmulo do RNAi nos rins indica que existe uma via de eliminação secundária; a mesma via é descrita na literatura como via de eliminação de RNAis (ZHANG *et al.*, 2000).

No caso dos colesterol-RNAi, seria de esperar que a eliminação fosse via fígado, devido às vias metabólicas de retirada de colesterol do plasma. O resultado, assim, pode ser indicativo de que os ^{99m}Tc -RNAis

estão sendo degradados no plasma e perdendo o colesterol, conduzindo à sua eliminação via rins.

Houve uma tendência, não significativa, do acúmulo do RNAi no tumor ser maior quando utilizada a LDE, na primeira hora pós-administração. (RODRIGUES *et al.*, 2002, TEIXEIRA *et al.*, 2008).

O efeito sobre a expressão gênica do gene *mdr-1* foi estudada mediante PCR em tempo real; a padronização desta técnica é apresentada nas figuras 24 a 26.

Foi encontrada uma redução de até 60% na expressão do gene *mdr-1* quando utilizado o RNAi *mdr-1 B* por 24 horas (figura 27). Não encontramos diferença na redução da expressão gênica com o uso da nanoemulsão. Este dado indica que o RNAi tem efeito sobre a expressão do gene estudado e, principalmente, que a LDE não afeta a funcionalidade do RNAi. Importante para determinar a estabilidade do efeito inibitório será futuramente realizar um estudo de inibição em relação ao tempo, para verificar possíveis diferenças quanto ao tempo que dura a inibição.

Quanto ao efeito sobre a proteína, estudamos indiretamente a função da P-gp mediante a resistência das células à doxorrubicina e na extrusão de droga.

Determinamos o IC₅₀ a partir de curvas de viabilidade celular (figura 28) para vários tratamentos e encontramos que a utilização da LDE leva a uma redução do IC₅₀ da doxorrubicina nas células MES-SA-Dx5. Houve

redução sempre que o RNAi foi utilizado, e foi maior quando complexo com a LDE. Encontramos maior efetividade do RNAi *mdr-1B*, em concordância com os resultados de expressão gênica. Porém, como estes tratamentos foram realizados por 48 horas, podemos supor que o RNAi reduz eficientemente a expressão da P-gp. Mas, no caso do RNAi sem o vetor LDE, a ação do RNAi é rapidamente perdida e a expressão normal é recuperada. Nossa hipótese é que esta redução significativa seja consequência da possível proteção que a LDE promoveria em relação à degradação dos RNAi no meio de cultura, permitindo que eles continuem entrando na célula, aumentando o seu tempo de ação. Isto pode estar relacionado aos resultados encontrados em outros experimentos, como os de internalização.

Mediante a citometria de fluxo determinamos a existência do acúmulo de doxorrubicina nas células tratadas com RNAi/LDE, indicado pelo aumento do índice médio de fluorescência (IMF, figura 30). Isto é confirmado na microscopia confocal (figura 31) onde pode ser observado que existe uma maior fluorescência nuclear naquelas células tratadas com RNAi/LDE, além de apresentar células com morfologia necrótica, como consequência da alta dose de doxorrubicina, que é citotóxica e causa morte celular.

6. Conclusão

O colesterol-RNAi se liga à LDE, conservando as propriedades da nanoemulsão, tais como o tamanho em média de 40 nm, o potencial Z de -30 mV e a estabilidade.

A constante de ligação RNAi/LDE é de $4,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ PC}$.

Existem fortes evidências de que o RNAi encontra-se no interior da LDE.

A LDE protege os RNAi, prolongando seu efeito inibitório sobre o gene *mdr-1* a nível de RNA mensageiro.

A LDE melhora o efeito inibitório apresentado pelos RNAis livres sobre o gene *mdr-1*, verificado pelo aumento do efeito da doxorubicina em cultura de células resistentes a quimioterápicos.

A LDE é um vetor eficiente para RNAi lipofílicos.

7. Referências Bibliográficas

Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2007;59:75–86.

Alahari SK, Dean NM, Fisher MH, Delong R, Manoharan M, Tivel KL, Juliano RL. Inhibition of expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein by phosphorothioate and 5'-cholesterol-conjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol.* 1996;50: 808-19.

Azzazy H M, Mansour M, Kazmierczak S C. Nanodiagnostics: A New Frontier for Clinical Laboratory Medicine. *Clin. Chem.* 2006;52(7):1238-1246.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281-97.

Bell DR, Gerlach JH, Kartner N, Buick RN, Ling V. Detection of P-glycoprotein in ovarian cancer: a molecular marker associated with multidrug resistance. *J Clin Oncol.* 3:311-5, 1985.

Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil SE, Wilkhu J, Lattmann E, Christensen D, Mohammed AR, Perrie Y. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *Int J Pharm.* 2010.

Buncrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah D. RNAi therapeutics: a potencial new class of pharmaceutical drugs. *Nature Chem. Biol.* 2:711-9, 2006.

Bunge A, Loew M, Pescador P, Arbuzova A, Brodersen N, Kang J, Dähne L, Liebscher J, Herrmann A, Stengel G, Huster D. Lipid Membranes Carrying Lipophilic Cholesterol-Based Oligonucleotides: Characterization and Application on Layer-by-Layer Coated Particles. *J Phys Chem B.* 2009; 24;113(51):16425-34.

Bydlowski SP, Vinagre CG, Bravo LM, Debes AA, Maranhao RC. Synthetic oligonucleotide does not bind to lipid emulsion resembling low-density lipoprotein. *Ann. NY Acad. Sci.* 1995;772: 252-4.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1987;47:943-6.

Chan J M, Zhang L, Yuet K P, Liao G, Rhee J, Langer R, Farokhzad O C. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials.* 2009;30:1627-1634.

Chen XP, Wang Q, Guan J, Huang ZY, Zhang WG, Zhang BX. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR-1 gene in human hepatoma cells. *World J. Gastroenterol.* 2006;12:3332-7.

Chen Y, Cheng G, Mahato RI. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharmaceutical Research.* 2007;25(1):72-86.

Chien PY, Wang J, Carbonaro D, Lei S, Miller B, Sheikh S, Ali SM, Ahmad MU, Ahmad I. Novel cationic cardiolipin analogue-based liposome for efficient DNA and small interfering RNA delivery in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2005;12:321-8.

Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(5):1310-6.

Chomczynski, P, Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-9.

Cucco C, Calabretta B. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance in a human leukemia-resistant cell line by mdr-1 antisense oligodeoxynucleotides. *Cancer Re.* 1996;56:4332-7.

Devroe E, Silver PA. Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004;4:319-327.

De Paula D, Bentley MV, Mahato RI. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. *RNA.* 2007;4:431-56.

Faraji A H, Wipf P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorgan. Med. Chem.* 2009;17:2950-2962.

Felgner P L , Gadek T R, Holm M, Roman R, Chan H W, Wenz M, Northrop J P, Ringold G M, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987;84:7413–17.

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):147-56.

Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391: 806–811.

Fréchet J M. Dendrimers and supramolecular chemistry. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;8:4782-4787.

Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-response nanocarriers for drug and gene delivery. *J. Control. Release.* 2008;126:187-204.

Glatter O. The interpretation of real-space information from small-angle scattering experiments. *J. Appl. Cryst.* 1979;12:166-175.

Glatter O. Evaluation of small-angle scattering data from lamellar and cylindrical particles by the indirect transformation method. *J. Appl. Cryst.* 1980;13:577-584.

Glatter O, Hofer M. Interpretation of Elastic Light Scattering Data: Determination of Size Distributions of Polydisperse Systems. *Journal of Colloid and Interface Science.* 1988;122(2):496-506.

Gómez SL, Monteiro AM, Rabbani SR, Bloise AC, Carneiro SM, Alves S, Gidlund M, Abdalla DSP, Figueiredo Neto AM. Cu and Fe metallic ions-mediated oxidation of low-density lipoproteins studied by NMR, TEM and Z-scan technique. *Chem e Phys of Lipids*. 2010;163:545–551.

Goldstein JL, Basu SK, Brown MS. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol*. 1983;98: 241-60.

Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008,14;60(15):1638-49.

Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Materials Sci*. 2002;6: 319-327.

Harker WG, MacKintosh FR, Sikic BI. Development and characterization of a human sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs. *Cancer Res*. 1983;43:4943-50.

Harker WG, Sikic BI. Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. *Cancer Res*. 1985;45:4091-6.

Hammel M, Laggner P, Prassl R. Structural characterisation of nucleoside loaded low density lipoprotein as a main criterion for the applicability as drug delivery system. *Chem Phys Lipids*. 2003;123(2):193-207.

Havel RJ, Eder HÁ, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest*. 1955;34;1345-53.

Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488(3):189-210.

Jacob D, Davis J, Fang B. Xenograftic tumor models in mice for cancer research, a technical review. *Gene Ther Mol. Biol.* 2004;8:213-9.

Jain K K. Handbook of Nanomedicine. In :Nanomolar Diagnostic and Nano-Oncology. *Ed. Humana Press*. E.E.U.U. 2008,60:1638-1649.

Jekerle V, Kassack MU, Reilly RM, Wiese M, Piquette-Miller M. Functional comparison of single- and double-stranded *mdr-1* antisense oligodeoxynucleotides in human ovarian cancer cell lines. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2005;8:516-27.

Kam NW, Liu Z, Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *J Am Chem Soc.* 2005.127(36):12492-3.

Kader A, Davis PJ, Kara M, Liu H. Drug targeting using low density lipoprotein (LDL): physicochemical factors affecting drug loading into LDL particles. *J Control Release.* 1998 ;55(2-3):231-43.

Kader A, Pater A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little affect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells. *J Control Release.* 2002;80(1-3):29-44.

Khurana B, Goyal AK, Budhiraja A, Arora D, Vyas SP. siRNA Delivery Using Nanocarriers – An Efficient Tool for Gene Silencing. *Current Gene Therapy.* 2010;10:139-155.

Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast RJ, Gansler T, Holland J, Frei E. *Cancer Medicine*. Ed. Holland-Frei. 6th ed. 2003.

Kruglova IS, Meshchaninova MI, Ven'iaminova AG, Zenkova MA, Vlasov VV, Chernolovskaia EL. Cholesterol-modified anti-MDR1 small interfering RNA: uptake and biological activity. *Mol Biol (Mosk).* 2010;44(2):284-93.

Lee PD, Noble-Topham SE, Bell RS, Andrulis IL. Quantitative analysis of multidrug resistance gene expression in human osteosarcomas. *Br. J. Cancer*. 1996;74:1046-50.

Lee EH, Sitaraman K, Schuster D, Rashtchian A: A highly sensitive method for one-step amplification of RNA by polymerase chain reaction. *Focus*. 1997;19: 39-42.

Levy D. Reversão do fenótipo de resistência a múltiplas drogas em células de sarcoma uterino humano. Utilização de emulsão lipídica como veículo de oligonucleotídeos antissenso. Tese (doutorado), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Method*. 2001;25:402-8.

Liu N, Ding H, Vanderheyden JL, Zhu Z, Zhang Y. Radiolabeling small RNA with technetium-99m for visualizing cellular delivery and mouse biodistribution. *Nucl. Med. Biol*. 2007;34:399-404.

Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med. Chem. Lett*. 2004;14:4975-7.

Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951;193: 265-75.

Low-density lipoprotein. Art. Encyclopædia Britannica Online. Web. 10 Dez. 2010 <http://www.britannica.com/EBchecked/media/92254/Cutaway-view-of-a-low-density-lipoprotein-complex-The-LDL>

Madden MJ, Morrow CS, Nakagawa M, Goldsmith ME, Fairchild CR, Cowan KH. Identification of 5' and 3' sequences involved in the regulation of transcription of the human *mdr1* gene in vivo. *J. Biol. Chem*. 1993;268:8290-7.

Maeda H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjug Chem.* 2010;21(5):797-802.

Maranhão RC, Cesar TB, Pedroso-Mriani SR, Hirata MH, Mesquita CH. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. *Lipids.* 1993;28: 691-6.

Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Sequence-specific suppression of mdr1a/1b expression in mice via RNA interference. *Pharm. Res.* 2005;22:2091-8.

Motomura, S, Motoji T, Takahashi M, Wang YH, Shiozaki H, Sugawara I, Aikawa E, Tomida A, Tsuruo T, Kanda N, Mizoguchi M: Inhibition of P-glycoprotein and recovery of drug sensitivity of human acute leukemic blast cells by multidrug resistance gene (mdr1) antisense oligonucleotides. *Blood.* 1998;91: 3163-71.

Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Nanomedicine based approaches for the delivery of siRNA in cancer. *J. of Internal Medicine.* 2009;267:44–53.

Nieth C, Pribsch A, Stege A, Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi). *FEBS Lett.* 2003;545:144-50.

Pai SI, Lin YY, Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther.* 2006;13:464-77.

Peng Z, Xiao Z, Wang Y, Liu P, Cai Y, Lu S, Feng W, Han ZC. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:707-12.

Radding, CM, Steinberg, D. Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices. *J. Clin Invest.* 1960;39:1560-9.

Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:23-36.

Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2004;22:326-30.

Rodrigues DG, Covolan CC, Coradi ST, Barboza R, Maranhão RC. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:765-72.

Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 2.ed, 1989.

Schreier S, Malheiros SV, de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1508(1-2):210-34.

Schroeder A, Levins CG, Cortez C, Langer R, Anderson DG. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *J. of Internal Medicine.* 2009;267:9–21.

Shekhar C. Lean and mean: Nanoparticle-based delivery improves performance of cancer drugs. *Chem. Biol.* 2009;16:349-350.

Singh R, Lillard Jr J W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 2009;86:215-223.

Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, et al.. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 2004;432:173-8.

Steger A, Pribsch A, Nieth C, Lage H. Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:699-706.

Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* 2006;97:689-96.

Teixeira RS, Valduga CJ, Benvenutti LA, Schreier S, Maranhão RC. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 2008;60:1287-95.

Thierry AR, Rahman A, Dritschilo A. Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 1993;190:952-60.

Ueno Y, Kawada K, Naito T, Shibata A, Yoshikawa K, Kim HS, Wataya Y, Kitade Y. Synthesis and silencing properties of siRNAs possessing lipophilic groups at their 3'-termini. *Bioorg. Med. Chem.* 2008;16:7698-704.

Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K. Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy. *Mutat. Res.* 2004;567: 71-84.

Wang L, Mu FY. A web-based design center for vector-based siRNA and siRNA cassette. *Bioinformatics Applications Notes.* 2004;20:1818-20.

Wesolowska O, Paprocka M, Kozlak J, Motohashi N, Dus D, Michalak K. Human sarcoma cell lines MES-SA and MES-SA/Dx5 as a model for multidrug resistance modulators screening. *Anticancer Res.* 2005;25:383-9.

Wolf SM, Gupta R, Kohlhepp P. Gene therapy oversight: lessons for nanobiotechnology. *J Law Med Ethics.* 2009;37(4):659-84.

Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, Rajeev KG, Nakayama T, Charrise K, Ndungo EM, Zimmermann T, Koteliensky V, Manoharan M, Stoffel M. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 2007;25:1149-57.

Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Li Y, Wu XY. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007;59(6):491:504.

Wu H, Hait WN, Yang JM. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63:1515-9.

Xu D, Kang H, Fisher M, Juliano RL. Strategies for inhibition of MDR1 gene expression. *Mol. Pharmacol.* 2004b;66:268-75.

Xu Y, Linde A, Larsson O, Thormeyer D, Elmen J, Wahlestedt C, Liang Z. Functional comparison of single- and double-stranded siRNAs in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2004a;316:680-7.

Yeh H C, Ho Y P, Wang T H. Quantum dot-mediated biosensing assays for specific nucleic acid detection. *Nanomed-Nanotechnol.* 2005;1:115-121.

Zhang YM, Liu N, Zhu ZH, Rusckowski M, Hnatowich DJ. Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA. *Eur. J. Nucl. Med.* 2000;27:1700-7.

Zhang Y, Yang M, Portney NG, Cui D, Budak G, Ozbay E, Ozkan M, Ozkan CS. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomed Microdevices.* 2008;10:321–328.

8. Anexos

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 02/04/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0098/08**, intitulado: **"RNAs DE INTERFERÊNCIA MODIFICADOS PARA AUMENTAR A CAPTAÇÃO CELULAR IN VIVO. INIBIÇÃO DO GENE MDR1 EM TUMORES EM CAMUNDONGOS"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**

Pesquisador (a) Executante: **Jorge Luis María Ruiz**

CAPPesq, 04 de Abril de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa