UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele

Livia Neves Borgheti Cardoso

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Livia Neves Borgheti Cardoso

Orientadora: Prof. Dr. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Borgheti-Cardoso, Livia Neves
Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele, 2016.
121 P.; 30CM.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra

1. Cristal Líquido. 2. siRNA. 3. Câncer de pele.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Livia Neves Borgheti Cardoso

Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof. Dr. Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedicatória

Ao meu marido e grande amigo Pedro, pelo companheirismo e pelo carinho com que me acalma principalmente nos momentos de incerteza. É por todas as abdicações que fez em meu favor, por todo o incentivo, apoio incondicional, compreensão e amor que esta conquista foi possível. Obrigada por tornar minha vida mais feliz a cada dia.

Aos meus pais, Luiz Claudio e Maria Alice, por terem sido meus melhores exemplos de amor, honestidade, persistência e trabalho. É por tudo que fizeram em meu favor, por todos os ensinamentos e por me incentivarem sempre que esta conquista foi possível.

Ás minhas irmãs, Lais e Larissa, por me permitirem conhecer o amor de um irmão. Obrigada pelo carinho, ensinamentos, compreensão e alegria que trazem à minha vida.

Aos meus avós, José (*in memoriam*), Maria (*in memoriam)*, Benedito (*in memoriam)* e Iraci pelo amor, orações e por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Aos meus amigos Tais, Fabi, Raquel, Helder, Lenita, Fernanda, Pavla, Krijn e Sander por permitirem que esta etapa se realizasse de maneira mais fácil e feliz.

E a Deus, por sempre guiar meus caminhos e por ter colocado estas pessoas na minha vida.

Agradecimento

À minha orientadora, Profª. Drª. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, por me acolher em seu laboratório e me ensinar a fazer pesquisa, por todas as oportunidades que me proporcionou e pelo exemplo profissional e pessoal. Obrigada pela dedicação, confiança e amizade dispensadas na minha formação.

Ao Prof. Dr. Raymond M. Schiffelers por me acolher em seu grupo de pesquisa na University Medical Center Utrecht e pela excelente orientação.

À Profª. Drª. Enilza Maria Espreafico pela orientação na execução dos experimentos com células WM35 e MCF-7 e ao seu aluno Rui Milton Patrício da Silva Júnior pelo auxilio durante os experimentos.

À Profª. Drª. Márcia Carvalho de Abreu Fantini pela orientação na execução dos experimentos com SAXS. E especialmente pelo carinho que sempre me recebeu em seu laboratório e pelas muitas horas de dedicação me ajudando a interpretar os dados. Ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, Projeto Nanostar, que possibilitou a realização das análises de SAXS.

À Profª. Drª. Maria José Vieira Fonseca pela orientação na execução dos experimentos de esterilidade e ao funcionário José Roberto Jabor pelo auxílio na realização deste experimento.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman pelo empréstimo do equipamento SpectraMax para leitura da luminescência.

Ao Cell Microscopy Core, Department of Cell Biology, Centre of Molecular Medicine, UMC Utrecht, por permitir o uso do microscopio confocal Zeiss.

Ao Dr. Roy van der Meel pela orientação e auxilio nos experimentos realizados na University Medical Center Utrecht.

Ao Sander Kooijmans pelo auxilio com os experimentos de Firefly/Renilla luciferase e PCR e principalmente por todas as discussões cientificas durante meu doutorado sanduiche.

Ao Dr. Marcel Fens pelo auxílio com o experimento *in vivo*. Obrigada pela solicitude com que me auxiliou e por ter tornando o trabalho mais prazeroso.

Ao funcionário da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP Eduardo Tozatto, pelo auxílio na obtenção das imagens por microscopia confocal.

Aos funcionários do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, José Orestes, Henrique e Fabíola, pela dedicação ao laboratório e pela solicitude com que me ajudou nas mais diversas tarefas durante este trabalho.

Á Drª. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini pelas discussões científicas, por sempre me incentivar e pela amizade. Obrigada pela solicitude com que colaborou com este trabalho.

Á Profª. Drª. Tais Gratieri pela amizade, pelas colaborações, pelas discussões científicas e por acreditar em mim. Obrigada por ser uma inspiração constante.

Á Profª. Drª. Tais Gratieri, Profª. Drª. Marilisa Guimarães Lara, Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso e Prof. Dr. Marcílio Cunha Filho por acreditarem no meu trabalho e me proporcionarem colaborações que me ajudam a crescer como cientista.

Aos meus colegas de laboratório: Livia Depieri, Patrícia, Margarete, Marcelo, Larissa, Josimar, Fernando e Juliana pela convivência e colaboração prestada ao longo desse período.

Aos meus colegas de laboratório da University Medical Center Utrecht: Krijn, Roy, Sander, Marcel, Susan, Pieter, Xanne, Sabrina, Pauline e Renata pelo carinho com que me acolheram e pela colaboração durante o ano que passei na Holanda. Em especial a Pavla, pela sua amizade e dedicação, que tornou meus dias mais felizes.

Aos meus amigos Fernanda, Lenita, Paty, Helen, Raquel, Helder, Joana, Luis Eduardo, Cauhe e Carol pelos bons momentos compartilhados e pela amizade.

Aos meus sogros Raimundo e Vânia, aos meus cunhados Aline, Lucas, Gilberto, Mariana e Guilherme e aos meus tios e tias (Ademir, Airton, Iza, Bia, Nadir, João, José, Luzia, Lucia e Silvia) por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Aos meus sobrinhos João e Mateus por toda alegria que trazem a minha vida.

À coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Profª. Drª. Renata Fonseca Vianna Lopez, e aos funcionários Eleni, Rosana e Rafael pela eficiência, disponibilidade e dedicação nos serviços prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas concessões de bolsa de Doutorado no país e exterior e auxílio financeiro concedido a este projeto. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de Doutorado no país no início deste doutorado.

Success is to be measured not so much by the position that one has reached in life as by the obstacles which he has overcome while trying to succeed.

Booker T. Washington

RESUMO

BORGHETI-CARDOSO, L.N. **Sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* de administração intratumoral para liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele.** 2016. 121f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O mecanismo de interferência por RNA (RNAi) é um evento de silenciamento gênico através da degradação do RNA mensageiro. Desta forma, a administração de siRNA (molécula efetora do RNAi) é uma terapia promissora para o tratamento de diversas doenças como o câncer. Porém, para a sua efetiva aplicação terapêutica é necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação capazes de liberar o siRNA nas células alvo, promover a sua internalização celular e evitar a sua degradação. Dentre os sistemas de liberação, os de liberação localizada, como os sistemas de geleificação *in situ,* apresentam vantagens sobre administração sistêmica. Formulações fluidas precursoras (FFP) que formam sistemas líquido cristalinos viscosos *in situ* podem ser obtidas a partir de lipídeos anfifílicos que absorvem água do meio e se rearranjam. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o gel formado *in situ* a partir da FFP (G-FFP), composta por monoglicerídeos (MO), polietilenoimina (PEI), propilenoglicol (PG) e tampão tris, como sistema de liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele. Os resultados mostraram que o G-FFP é uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal. O G-FFP liberou o siRNA de maneira sustentada e complexado ao PEI. A FFP pode ser esterilizada por filtração em membrana e foi capaz de complexar altas concentrações de siRNA (15 mM) e de proteger o siRNA da degradação. A citotoxicidade foi dependente da concentração de FFP e esta quando complexada com siRNA teve a toxicidade diminuída. O siRNA liberado do G-FFP foi internalizado pelas células A431, FaDu, HeLa, A549, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP. Além disto, siRNAs específicos liberados pelo G-FFP foram capazes de reduzir a expressão da proteína Firefly luciferase em células HeLa e FaDu, pórem não foram capazes de reduzir a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) nas células A431, HeLa, A549 e FaDu. A redução da expressão de EGFR em células A549 foi observado quando a terapia com siRNA foi combinada com internalização fotoquímica. Destes resultados, pode-se inferir que a transfecção celular do siRNA e o silenciamento gênico promovido por ele foi dependente tanto do tipo de linhagem celular como do alvo desejado. Os estudos *in vivo* mostraram que ocorre a formação de gel intratumoral e após 3 dias da administração intratumoral da FFP contendo siRNA específico para EGFR houve redução de 30% no tamanho dos tumores comparados aos tumores tratados com FFP sem siRNA. Diante destes resultados, pode-se concluir que o sistema desenvolvido tem potencial como sistema de liberação localizada de siRNA quando aplicado subcutaneamente ou intratumoral, uma vez que complexa o siRNA, promove a sua internalização celular e o siRNA liberado no citoplasma das células pode reduzir a expressão de proteínas de interesse.

Palavras-chave: sistema de liberação líquido cristalino, gel *in situ*, siRNA, câncer de pele e EGFR

ABSTRACT

BORGHETI-CARDOSO, L.N. ***In situ* gelling liquid crystalline system for intratumoral and localized delivery of siRNA for skin cancer therapy.** 2016. 121f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

RNA interference (RNAi) is a mechanism in which small interfering RNA molecules (siRNA) inhibit gene expression, by causing the messenger RNA degradation. Thus, siRNA is a promising therapy for the treatment of several diseases such as cancer. However, the development of delivery systems able to protect the siRNA from degradation and promote its cell uptake is essential for therapeutic use of siRNA. Among the delivery systems, the localized delivery system such as *in situ* gelling delivery system, have advantages over systemic administration. Precursor fluid formulations (FFP), which forms *in situ* viscous liquid crystalline systems, can be obtained from amphiphilic lipids that absorb water from the environment and self-assembling. In this context, the present study aimed to evaluate the *in situ* gel formed from the FFP (G-FFP), composed of monoglycerides (MO), polyethyleneimine (PEI), propylene glycol (PG) and Tris buffer, as localized delivery system for siRNA in skin cancer therapy. The results showed that the G-FFP is a mixture of cubic and hexagonal phase. The G-FFP sustained release of siRNA and the siRNA is released complexed with PEI. The FFP can be sterilized by membrane filtration at 0.22 µm. FFP was able to complex high siRNA concentration (15 mM) and protect the siRNA from degradation. The cytotoxicity was dependent on the FFP concentration, when FFP was complexed with siRNA it was observed a decreased in toxicity. The siRNA released from G-FFP was uptake by A431, FaDu, HeLa, A549, WM35/DLC2-GFP and MCF-7/DLC2-GFP cells. In addition, specific siRNAs released from G-FFP were able to reduce the expression of Firefly luciferase in HeLa and FaDu cells, but they were unable to reduce the expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in A431, HeLa, A549 and FaDu cells. The reduction of expression of EGFR in A549 cells was observed when siRNA therapy was combined with photochemical internalization. From these results, can be inferred that the efficiency of siRNA transfection and knockdown was dependent on both the type of cell line and the desired target protein. *In vivo* studies showed that the gel was formed *in situ* after intratumoral injection. 3 days after intratumoral administration of FFP containing EGFR specific siRNA, 30% of reduction in the tumors size compared to tumors treated with FFP without siRNA was observed. Based on these results, could be concluded that the developed system is a potential siRNA delivery system when administered subcutaneously and intratumoral, because it was able to complex siRNA, promoted its cell uptake and the siRNA released into the cytoplasm of the cell may reduce the expression of target proteins.

Keywords: liquid crystalline delivery system, *in situ* gel, siRNA, skin cancer, EGFR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de interferência por RNA. Adaptado com autorização de (VICENTINI et al., 2013b). Copyright (2013) Springer. 4

Figura 2. Desafios da terapia com siRNA. 7

Figura 3. Estrutura química dos principais monoglicerídeos usados na obtenção de cristais líquidos: (A) monolinoleato de glicerila (monolinoleina) e (B) monoleato de glicerila (monoleína). 11

Figura 4. Fases líquido cristalinas: (A) fase lamear; (B) fase hexagonal; (C) fase hexagonal inversa; (D) fase cúbica bicontinua Im3m; (D) fase cúbica bicontinua Pn3m e (E) fase cúbica bicontinua Ia3d. Adaptada com autorização de (KOYNOVA; TENCHOV; MACDONALD, 2015). Copyright (2015) American Chemical Society....12

Figura 5. Relação entre o fator de empacotamento e as estruturas líquido cristalinas formadas. Adaptado de (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; LOPES, 2005). 14

Figura 6. Estrutura química do polímero catiônico polietilenoimina (PEI), 25 kDa, ramificado. 15

Figura 7. Representação esquemática da epiderme humana. Sob a exposição excessiva de radiação UVB pode ser desenvolvido o câncer de pele. Adaptado com autorização de (NYS; AGOSTINIS, 2012). Copyright (2012), com permissão de Elsevier.....18

Figura 8. Ativação do EGFR e sinal de transdução. A ligação do ligante ao EGFR resulta em fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio terminal carboxílico, recrutamento de proteínas de sinalização e, por último, a fosforilação de substratos intracelulares ativando várias vias de transdução de sinal. Estas vias transmitem o sinal para o núcleo e modulam a transcrição celular e a progressão do ciclo celular. Por fim, estes efeitos no núcleo são traduzidos em aumento da diferenciação, proliferação e resistência à apoptose. Além disso, invasão, migração e metástase das células são promovidas e angiogénese é estimulada. DAG: diacilglicerol, IP3: inositol trifosfato, MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos, MEK: quinase MAPK, PKC: proteína quinase C, PI3K: fosfatidilinositol-3-OH quinase, PLC: fosfolipase C, STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição. Adaptado com autorização de (OLIVEIRA et al., 2006). Copyright (2006) Taylor & Francis. 21

Figura 9. Estratégias para bloquear a transdução de sinais pelo EGFR pode ser feito em 3 diferentes níveis: (1) no domínio extracelular do EGFR interferindo na ligação do ligante com o receptor; (2) no domínio intracelular, inibindo a ativação da proteína tirosina quinase; (3) a nível de RNAm, pela inibição da tradução do RNAm. TKI: inibidor da tirosina quinase. Adaptado com autorização de (OLIVEIRA et al., 2006). Copyright (2006) Taylor & Francis.....22

Figura 10. (A) Fotomicrografia por microscopia de luz polarizada do gel obtido a partir da FFP (G-FFP). Aumento 200x. (B) SAXS do G-FFP com e sem siRNA**.** FFP:

MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p). G-FFP: Gel formado em excesso de água a partir da FFP. 47

Figura 11. (A) Gráfico da liberação do siRNA a partir do gel obtido da FFP e do controle. (B) Eletroforese das amostras obtidas no estudo de liberação e da curva-padrão (siRNA em água livre de RNAse em diferentes concentrações). Controle: siRNA em água livre de RNAse (10 µM). FFP: FFP + siRNA (10 µM). Hep: Heparina. CP: curva-padrão. Adaptado de (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015). Copyright (2015), com permissão de Elsevier. 49

Figura 12. Capacidade da FFP complexar siRNA. Eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, 20 min. 51

Figura 13: Avaliação da estabilidade do siRNA (10 e 100 µM) livre em água, complexado ao PEI, lipofectamina e FFP na presença de SFB (25%). Eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, 20 min. 52

Figura 14. (A) Viabilidade celular das células A431 tratadas com FFP (2 – 50 µL) (n=6) e (B) Viabilidade celular das células A431 tratadas com FFP (0,25 – 1,00 µL) e FFP complexada ao siRNA 0,25 pM (n=9). * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas. $^{++}$ $p < 0,05$ comparado as células tratadas com FFP sem siRNA. 53

Figura 15. Viabilidade celular das células A431 tratadas com diferentes porcentagens de PEI em tampão tris (n=4). * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas. 53

Figura 16. (A) Viabilidade celular das células WM35/DLC2-GFP tratadas com FFP e 0,65% de PEI em Tampão Tris (0,5 e 1,0 µL) e (B) Viabilidade celular das células WM35/DLC2-GFP tratadas com FFP e 0,65% de PEI em Tampão Tris (0,15 e 0,25 µL) e FFP e PEI em tampão tris complexada ao siRNA 20 µM. * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas. 54

Figura 17. Intensidade média da fluorescência (IMF) das células HeLa, FaDu e A549 determinada pela medida da fluorescência em lisados celulares. Os valores da fluorescência foram corrigidos pela quantidade de proteína. * $p < 0,05$ comparado as células não-tratadas. NT: células não tratadas, Lipof: Lipofectamina complexada ao Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), PEI: 0,65% de PEI em tampão tris complexado ao Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), FFP: FFP complexada ao Alexa488 siRNA (50 ou 200 pmol/1x10^5 células). O símbolo $^+$ na legenda do eixo x se refere a "/1x10^5 células". (n=3). 55

Figura 18. Intensidade média da fluorescência (IMF) das células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP determinada pela medida da fluorescência em lisados celulares. Os valores da fluorescência foram corrigidos pela quantidade de proteína. * $p < 0,05$ comparado as células não-tratadas. NT: células não tratadas, Lipof: Lipofectamina complexada a Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), PEI: 0,65% de PEI em tampão tris complexado ao Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), FFP: FFP complexada ao Alexa488 siRNA (50 ou 200 pmol/1x10^5 células). O símbolo $^+$ na legenda do eixo x se refere a "/1x10^5 células". (n=3). 56

Figura 19. Fotos representativas da microscopia confocal das células HeLa, FaDu e A549 tratadas com lipofectamina, PEI em tampão tris ou FFP complexado com

Alexa488 siRNA (verde) (50, 50 e 200 pmol siRNA/1x10^5 células). O núcleo das células foi corado com DAPI (azul). 57

Figura 20. Fotos representativas da microscopia confocal das células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP tratadas com lipofectamina, PEI em tampão tris ou FFP complexado com Alexa488 siRNA (verde) (50, 50 e 200 pmol siRNA/1x10^5 células). O núcleo das células foi corado com DAPI (azul). WM35: WM35/DLC2-GFP; MCF-7: MCF-7/DLC2-GFP.....58

Figura 21. Imagens representativas obtidas pelo vídeo realizado no BioStation IM-Q da Nikon após as células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP serem tratadas com siRNA complexado a FFP. WM35/DLC2-GFP: imagem A, B e C corresponde ao tempo zero, 10 h e 10 h e 20 min, respectivamente, aumento 400x. MCF-7/DLC2-GFP: imagem A, B e C corresponde ao tempo 4, 24 e 48 h, respectivamente, aumento 200x. 60

Figura 22. Porcentagem de inibição da atividade de Firefly luciferase normalizada por Renilla luciferase após tratamento das células HeLa, FaDu e A549 com siLuc e ns-siRNA (100 pmol/1x10^5 células) complexado com Lipofectamina (lipof) ou 0,65% de PEI em tampão tris (PEI) e, siLuc e ns-siRNA (400 pmol/1x10^5 células) complexados com FFP. * $p < 0,05$ comparado as células tratadas com ns-siRNA. $^{++}$ $p < 0,05$ comparado as células tratadas com complexo siLuc-lipofectamina (100 pmol/1x10^5 células). (n=3). 61

Figura 23. Representação das bandas obtidas no Western Blotting. NT: células não-tratadas. Lip: Lipofectamina. PEI: 0,65% de PEI em tampão tris. ns: ns-siRNA; EGFR: anti-EGFR siRNA. 62

Figura 24. % da expressão de EGFR (em relação as células não tratadas) nas células A549 determinado por Western Blotting após o tratamento por 48 h com EGFR siRNA complexado a FFP. Diferentes concentrações do fotosensibilizador ($(MEA)_2$TPPS2a) foi utilizado bem como 2 tempos de exposição à luz (60 e 75 s). As células com 0,0 µg/mL de $(MEA)_2$TPPS2a ou 0,0 (tempo) foram tratadas somente com EGFR siRNA complexado a FFP. 64

Figura 25. % da expressão de EGFR (em relação as células não tratadas) nas células A549 determinado por Western Blotting após o tratamento por 48 h com EGFR siRNA complexado a FFP. Com IFQ: células tratadas com 1,2 µg/mL de $(MEA)_2$TPPS2a e expostas à luz por 75 s. NT: células não tratadas com EGFR siRNA. * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas.....65

Figura 26. (A) Foto do tumor com gel após administração intratumoral de FFP. (B e C) Análise histológica do tumor corado com H&E. Tecido tumoral após 24 h da injeção da FFP, o gel corresponde a coloração rosa (Aumento 100x) e tecido tumoral com gel após 7 dias da injeção de FFP (Aumento 400x), respectivamente. 66

Figura 27. (A) Bandas obtidas no Western Blotting da expressão de EGFR em tumores tratados por 24 h, 7 e 14 dias com a FFP contendo ou não EGFR siRNA (2,5 mg). (B) Gráfico da expressão do EGFR em tumores tratados por 24 h, 7 e 14 dias com a FFP contendo ou não EGFR siRNA em função do tempo. 67

Figura 28. Detecção por RT-PCR de EGFR RNAm em tumores A431 tratados com injeção intratumoral de FFP ou FFP + siRNA. Todos os valores são relativos ao β-Actina RNAm (RNAm controle). Resultados estão apresentados como média ± desvio padrão (n mínimo de 5 e máximo de 7).....68

Figura 29. Cortes histológicos de 5 µm de espessura dos tumores de camundongos tratados por 24 h e 7 dias com FFP ou FFP + EGFR siRNA. Os tumores foram corados por H&E (Esquerda) e por IHQ (Direita) com marcação para EGFR. O aumento de cada imagem está mostrado na própria imagem. 69

Figura 30. Tamanho dos tumores após tratamento com FFP contendo ou não EGFR siRNA (2,5 mg). * p < 0.05 comparado aos tumores tratados com FFP.....70

Figura 31. Representação esquemática da participação da proteína DLC2 na apoptose (BORGES, 2012).....113

Figura 32. Imagens ilustrativas (microscopia de fluorescência) das células WM35/DLC2-GFP não-tratadas (NT), tratadas com FFP complexada com DLC2 siRNA (FFP DLC2-siRNA). Aumento 200 x.....113

Figura 33. Western Blotting das células tratadas com diferentes carreadores e DLC2 siRNA. NT: células não-tratadas. HiP: HiPerfect; Lip: Lipofectamina. PEI: 0,65% de PEI em tampão tris. ns siRNA: siRNA não específico; DLC2 siRNA: siRNA específico para DLC2.....115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições experimentais do tratamento das células A549 com EGFR siRNA combinado a IFQ. 42

Tabela 2. Vetor de espalhamento, distâncias interplanares, estruturas líquido cristalinas e parâmetros de rede determinados por SAXS dos géis obtidos a partir da FFP (MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p)) sem e com a adição de 10 e 100 µM de siRNA. 48

Tabela 3. Resultados do teste de diluição de 1 g das matérias-primas e FFP em 100 mL de diluente. 49

Tabela 4. Avaliação da qualidade microbiana das matérias-primas e FFP. 50

Tabela 5. Descrição das condições experimentais realizadas no estudo do silenciamento da expressão de EGFR e apresentação da % de silenciamento promovido pelo EGFR siRNA administrado por lipofectamina, 0,65% de PEI em tampão tris ou FFP. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MO	Monoglicerídeo
PEI	Polietilenoimina
PG	Propilenoglicol
RNAi	Interferência por RNA
siRNA	*Small interfering* RNA
RNAm	RNA mensageiro
dsRNA	Dupla-fita de RNA
miRNA	Micro-RNA
Pre-miRNA	Precursor micro-RNA
RISC	RNA *Induced silencing complex*
ns	não específico
siLuc	siRNA específico para Firefly luciferase
$(MEA)_2$TPPS2a	Di(monoetanolamina)meso-tetrafenil porfirina disulfonato (a=adjacente)
FL	Firefly luciferase
RL	Renilla luciferase
BSA	Albumina de soro bovino
MIP	Miristato de isopropila
UFC	Unidades formadoras de colônia
TCS	Triptona caseína soja
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tris-acetato-EDTA
K	Fator de empacotamento
Vh	Volume da cauda hidrocarbonada
Ao	Área da cabeça polar
Lc	Comprimento do anfifílico
SAXS	*Small Angle X-ray Scattering*
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
π	Pi
θ	Teta
λ	Lambda
™	Trademark
®	Marca Registrada
©	Copyright

SUMÁRIO

RESUMO i
ABSTRACT ii
LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS viii
LISTA DE SÍMBOLOS ix

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Terapia Gênica - Interferência por RNA (RNAi) 2
1.1.1. Terapia Gênica 2
1.1.2. Interferência por RNA (RNAi) 3
1.2. Sistemas de Liberação 6
1.2.1. Sistemas de liberação para administração de siRNA 6
1.2.2. Sistemas de liberação para administração localizada de siRNA 9
1.2.3. Sistemas líquido cristalinos 11
1.3. Câncer de pele 16
1.3.1. Epidemiologia, etiologia e tratamentos 16
1.3.2. Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) 19

2. OBJETIVOS 25
2.1. Objetivos específicos: 26

3. MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1. Material: 28
3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas: 28
3.1.2. Equipamentos e acessórios: 31
3.2. Métodos 32
3.2.1. Obtenção da formulação fluida precursora (FFP) 32
3.2.2. Avaliação da formação de gel *in vitro* e caracterização do gel formado em excesso de água 32
3.2.3. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro* 33
3.2.4. Determinação do processo de esterilização da FFP 34
3.2.5. Determinação da capacidade da FFP complexar siRNA 35
3.2.6. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a FFP 36
3.2.7. Experimentos *in vitro* – Linhagem, cultivo celular e considerações gerais 36
3.2.8. Avaliação da viabilidade celular 37
3.2.9. Avaliação da internalização celular do siRNA liberado do G-FFP por medida da fluorescência em lisado celular e microscopia confocal em células HeLa, FaDu, A549, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP 38
3.2.10. Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HeLa, FaDu e A549 pelo siLuc liberado do G-FFP 40
3.2.11. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR em células FaDu, A549, HeLa e A431 pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP 40
3.2.12. Avaliação de eficiência de silenciamento de EGFR pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP combinado com a Internalização Fotoquímica (IFQ) em células A549 41
3.2.13. Estudos *in vivo* 42

3.2.14. Avaliação da formação do gel intratumoral 43
3.2.15. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Western Blotting 43
3.2.16. Análise da expressão de EGFR RNAm nos tumores por RT-PCR 43
3.2.17. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Imunohistoquímica (IHQ) .44
3.2.18. Avaliação *in vivo* da redução do tumor.....45
3.2.19. Estatística.....45

4. RESULTADOS 46
4.1. Obtenção e caracterização da FFP e do gel formado em excesso de água 47
4.2. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro* 48
4.3. Determinação do processo de esterilização da FFP 49
4.4. Determinação da capacidade da FFP complexar siRNA 50
4.5. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a FFP.....51
4.6. Avaliação da viabilidade celular 52
4.7. Avaliação da internalização celular do siRNA liberado do G-FFP por medida da fluorescência em lisado celular e microscopia confocal em células HeLa, FaDu, A549, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP 54
4.8. Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HeLa, FaDu e A549 pelo siLuc liberado do G-FFP.....60
4.9. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR em células FaDu, A549, HeLa e A431 pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP 62
4.10. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP combinado com a Internalização Fotoquímica (IFQ) em células A549.....64
4.11. Estudos *in vivo* 65
4.12. Avaliação da formação do gel intratumoral 65
4.13. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Western Blotting 66
4.14. Análise da expressão de EGFR RNAm nos tumores por RT-PCR 68
4.15. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Imunohistoquímica (IHQ)....68
4.16. Avaliação *in vivo* da redução do tumor.....69

5. DISCUSSÃO 71

6. CONCLUSÃO.....93

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96

APÊNDICE.....110

ANEXO.....116

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Gênica - Interferência por RNA (RNAi)

1.1.1. Terapia Gênica

A terapia gênica tem o potencial de alterar profundamente a maneira de abordar e tratar doenças crônicas e adquiridas porque permite regular, reparar, substituir, adicionar, deletar ou silenciar uma sequência gênica que é identificada como benéfica ou prejudicial ao funcionamento adequado do organismo (NABEL, 2004; WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013). Mais de 1800 testes clínicos de terapia gênica aprovados foram ou estão sendo conduzidos (WIRTH; PARKER; YLA-HERTTUALA, 2013). Embora os desafios e riscos associados a esta terapia sejam maiores do que o previsto inicialmente, todo o conhecimento adquirido com estes estudos permitiu a proposição de terapias mais efetivas, dentre elas as que envolvem o silenciamento de genes têm atraído a atenção de muitos pesquisadores e pode ser alcançada por diferentes processos (NABEL, 2004).

O silenciamento de genes pode ser realizado no nível transcricional ou pós-transcricional. O silenciamento gênico transcricional é baseado na manipulação de sequências gênicas pela inserção de mutações em regiões específicas do gene, produzindo proteínas truncadas ou proteínas com domínios não funcionais. Já no silenciamento gênico pós-transcricional a repressão da expressão gênica é feita pela degradação do RNA mensageiro (RNAm) (CAPECCHI, 1989; SCHERER; ROSSI, 2003; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011).

O processo de silenciamento gênico pós-transcricional foi descrito pela primeira vez pelos grupos de Richard Jorgensen and Joseph Mol enquanto eles tentavam aumentar a expressão de genes em petúnias. Eles introduziram múltiplas cópias do gene envolvido na produção da pigmentação e, surpreendentemente, houve silenciamento tanto do gene exógeno quanto do gene endógeno, o que resultou em flores totalmente brancas ou irregularmente coloridas. A este processo foi dado o nome de co-supressão porque o gene endógeno e o exógeno promoveram o silenciamento um do outro (JORGENSEN et al., 1996; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011; VAN DER KROL et al., 1990). Ao mesmo tempo, Guo e Kemphues, ao investigar a função de genes no nemátodo *Caenorhabditis elegans,* administraram RNA antisense para bloquear a produção da proteína de interesse, obtendo o resultado esperado. Porém, eles observaram o mesmo efeito quando a fita sense do RNA foi injetada como controle negativo (GUO; KEMPHUES, 1995). Enquanto isto, o grupo de Andrew Fire and Craig Mello obtiveram resultados

similares aos de Guo e Kemphues ao injetar a fita sense e antisense separadamente no nemátodo. Mas, eles injetaram também a fita sense e antisense juntas e descobriram que a dupla-fita de RNA (dsRNA) foi muito mais efetiva em produzir a interferência do que cada fita isolada. Este processo foi denominado interferência por RNA (RNAi) (FIRE et al., 1998).

1.1.2. Interferência por RNA (RNAi)

RNAi é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional e desde a sua descoberta tem revolucionado as pesquisas das áreas das ciências biológicas e biomédicas (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007).

O mecanismo de RNAi (Figura 1) pode ser didaticamente dividido em duas fases: a fase de iniciação e a fase de execução. A fase de iniciação consiste na geração ou introdução de moléculas efetoras (*small interfering* (siRNA) e microRNA (miRNA)) no citoplasma das células. O siRNA é gerado no citoplasma pela clivagem de dsRNA pela enzima Dicer em pequenos nucleotídeos de aproximadamente 21-23 bases. A geração do miRNA inicia-se no núcleo onde os miRNA primários (pri-RNA) codificados endogenamente são processados em precursor miRNA (pre-miRNA). Estes pre-miRNA são transportados para o citoplasma onde são clivados pela Dicer. Na fase de execução, o siRNA e o miRNA são incorporados em complexos proteicos denominados RISC (RNA *Induced Silencing Complex)*. Uma helicase presente neste complexo abre a dupla-fita do siRNA, a fita antisense é usada como guia para reconhecer o RNAm alvo, que é clivado pelo complexo, degradando-o (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; ELBASHIR; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; VICENTINI et al., 2013b; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). O siRNA tem uma complementaridade perfeita com o RNAm alvo, enquanto o miRNA tem normalmente uma sequência imperfeita, o que leva o silenciamento gênico sem a degradação do RNAm (DAVID et al., 2010).

Desde a identificação do mecanismo de RNAi, siRNA tem sido muito usado como ferramenta na pesquisa da função de genes (ELBASHIR et al., 2002), identificação de potenciais genes causadores de doenças (CAMPOCHIARO, 2006) e como uma promissora abordagem no tratamento de doenças (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; MASIERO et al., 2007; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009), isto porque em princípio qualquer alvo pode ser inibido, o siRNA é especifico,

facilmente sintetizado e será sempre uma molécula com as mesmas características físico-químicas (BUMCROT et al., 2006; DAKA; PEER, 2012; XU; WANG, 2015).

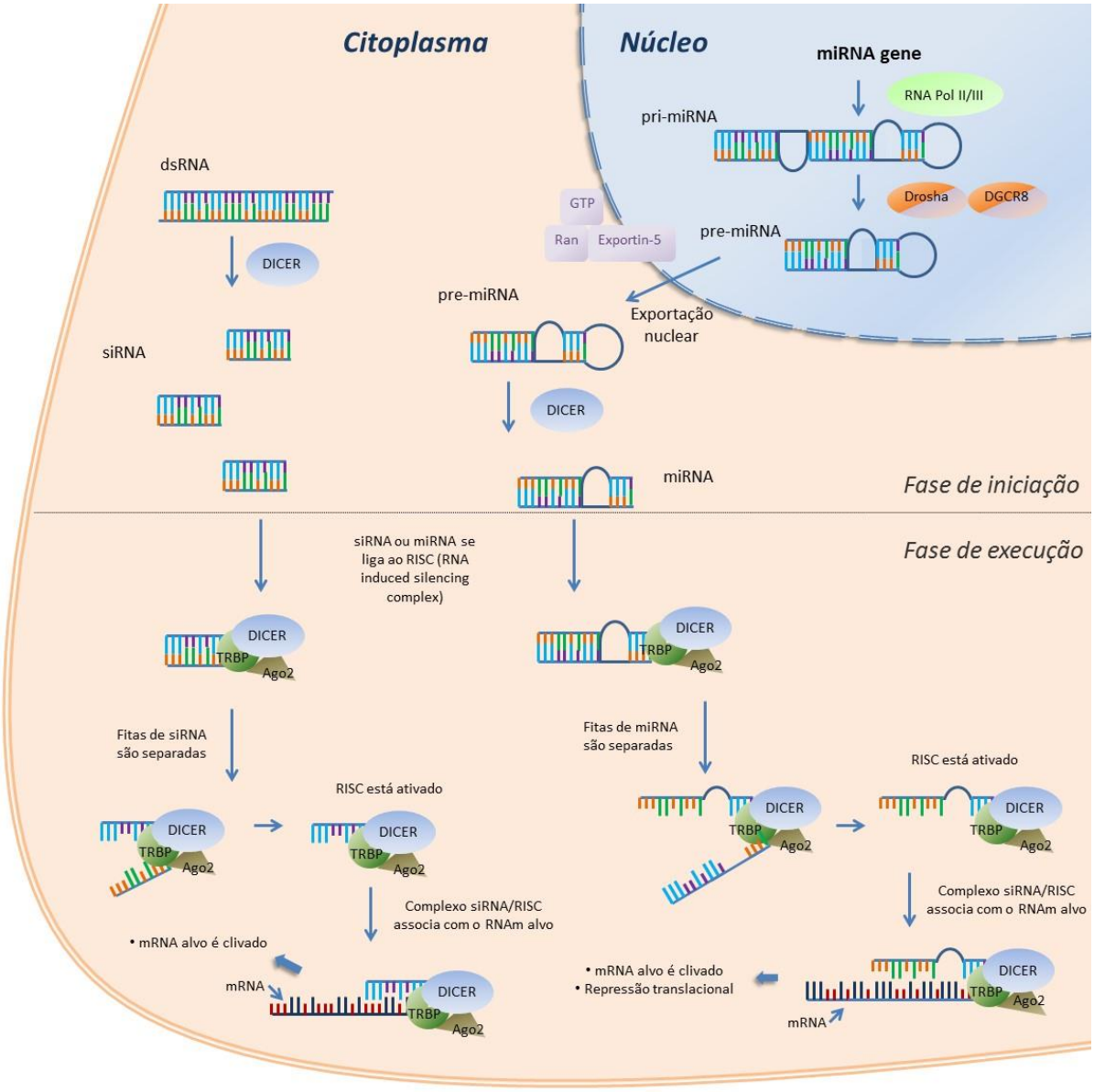

Figura 1. Mecanismo de interferência por RNA. Adaptado com autorização de (VICENTINI et al., 2013b). Copyright (2013) Springer.

RNAi tem mostrado potencial para tratar diversas doenças incluindo desordens da pele (JACOBSON et al., 2010; VICENTINI et al., 2013a), aterosclerose (LI et al., 2010), câncer (ABBASI et al., 2011; ARIMA et al., 2012; HSU et al., 2013; TARATULA et al., 2011) e infecções virais (ALVAREZ et al., 2009; BITKO et al., 2005; DEVINCENZO et al., 2008, 2010; LI et al., 2005; ZAMORA et al., 2011). Também tem mostrado potencial para regeneração de tecidos (MITTNACHT et al., 2010; NELSON et al., 2012; RUJITANAROJ et al., 2013). O RNAi apresenta várias vantagens sobre a

terapia convencional com fármacos, que envolve o uso de pequenas moléculas ou proteínas, e sobre a terapia gênica baseada em DNA. A principal vantagem do RNAi sobre a terapia convencional é que em princípio qualquer alvo pode ser inibido. RNAi pode silenciar proteínas que não são facilmente bloqueadas por fármacos convencionais por apresentarem conformações não acessíveis a estes fármacos. Além disto, o siRNA é especifico e consegue bloquear a expressão somente da proteína de interesse, já com o fármaco convencional, devido a similaridade estrutural entre algumas proteínas, o bloqueio não-específico pode acontecer. Outra vantagem do RNAi sobre fármacos convencionais é que a inibição da expressão gênica pode ser mais efetiva para o alcance do resultado terapêutico do que o bloqueio da proteína alvo, isto porque uma molécula de RNAm é traduzida em várias cópias de proteína e um siRNA pode silenciar múltiplas cópias de RNAm (BUMCROT et al., 2006; DAKA; PEER, 2012). O siRNA também tem a vantagem de ser uma molécula com aproximadamente as mesmas características físico-químicas e sua produção sintética ser relativamente fácil (BUMCROT et al., 2006). Possuir as mesmas características fisico-químicas é vantajoso pois facilita o desenvolvimento de formulação farmacêutica para a sua aplicação clínica, permitindo que, independentemente da sequência de siRNA usada, os mesmos requisitos para uma formulação ideal seja necessário. Porém, estas mesma características fisico-químicas são os principais desafios para a sua aplicação terapêutica, já que o siRNA precisa alcançar o citoplasma das células para ter ação. Embora isto seja um importante obstáculo a ser superado, é menos desafiador do que as terapias baseadas em DNA, que são moléculas maiores e precisam alcançar o núcleo (DAVID et al., 2010).

Embora os benefícios para usar RNAi na terapia são obvios, poucos siRNAs têm sido avaliados para aplicação clínica (ZHOU et al., 2013). Desde a descoberta do RNAi, houve pouco mais de 50 ensaios clínicos envolvendo 26 siRNAs diferentes (OZCAN et al., 2015). Os estudos clínicos iniciais foram feitos para o tratamento de doenças nas quais a administração localizada de siRNA era desejada como, por exemplo, degeneração macular, edema macular diabético, glaucoma e infecção pelo vírus sincicial respiratório. Na maioria destes estudos os siRNAs foram injetados ou aplicados topicamente na sua forma *naked*. No entanto, estes ensaios clínicos decepcionaram as elevadas expectativas da comunidade científica e médica. Problemas de segurança em relação ao siRNA (por exemplo, terapias baseadas em siRNA *naked* desencadearam respostas imunológicas) e baixa eficácia no tratamento

foram relatados, o que levou a finalização de muitos estudos antecipadamente (OZCAN et al., 2015; SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). Os estudos clínicos envolvendo administração sistêmica de siRNA tiveram como orgão alvo principalmente o fígado. Esta abordagem é motivada pela habilidade de explorar a função fisiológica do fígado como sistema de depuração e filtração. Usando esta estratégia, muitos siRNAs se mostraram eficazes em testes pre-clínicos e clínicos para silenciar genes hepáticos relevantes. Porém, a administração sistêmica de siRNA para outros tecidos além do fígado tem sido mais desafiador (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). Dos 12 testes clínicos administrando siRNA por injeção intravenosa que foram ou estão sendo realizados, 11 deles usaram ou usam sistemas de liberação (OZCAN et al., 2015). Estes estudos clínicos nos mostram que é fundamental desenvolver sistemas de liberação para administração localizada ou sistêmica de siRNA de forma segura e eficaz.

1.2. Sistemas de Liberação

1.2.1. Sistemas de liberação para administração de siRNA

A aplicação terapêutica do siRNA é um desafio, devido as suas características físico-químicas como apresentar carga negativa e ter alto peso molecular (~ 13 kDa). Os principais desafios para a aplicação clínica do siRNA são a instabilidade do siRNA no corpo, a ineficiente internalização celular e – até quando a internalização celular ocorre -, o difícil escape endossomal (Figura 2) (SCHROEDER et al., 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009). Portanto, é necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação para que estes desafios sejam superados e o siRNA seja liberado no citoplasma, incorporado ao RISC e ocorra o silenciamento gênico.

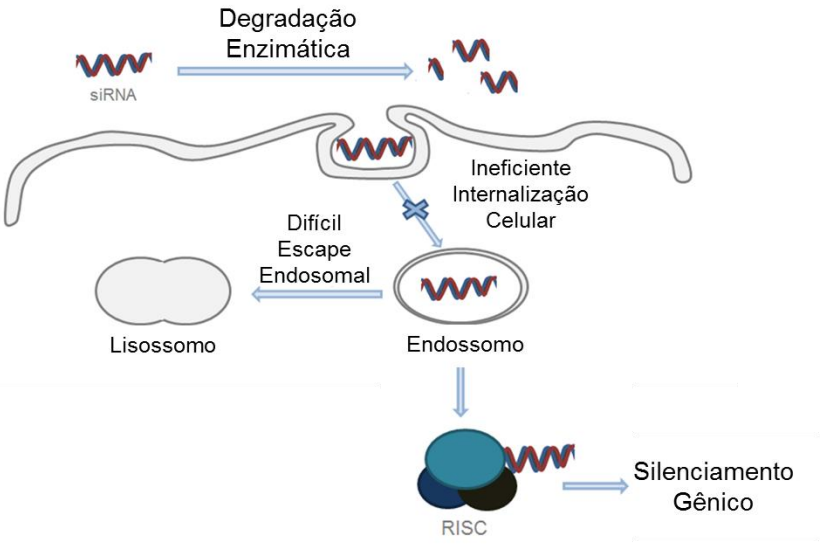

Figura 2. Desafios da terapia com siRNA.

Para um sistema de liberação de siRNA ser efetivo ele deve satisfazer dois requisitos contraditórios: complexar o siRNA de modo a protegê-lo das condições extracelulares e promover a sua internalização celular e, no ambiente intracelular, eficientemente liberar o siRNA no citoplasma. O equilíbrio entre a proteção e a liberação do siRNA no citoplasma celular tem sido o maior desafio dos sistemas de liberação não-virais (CONDE et al., 2015; KAPOOR; BURGESS, 2013; KIM; PARK; SONG, 2013; LIU et al., 2011) e muitas vezes isto justifica a menor eficiência de silenciamento por siRNAs veiculados por estes sistemas quando comparados aos sistemas virais. Os sistemas virais, embora tenham alta eficiência de transfecção, apresentam muitos riscos relacionados às reações imunes e tóxicas além de possível recombinação viral, assim, as questões de segurança são um obstáculo para seu uso (GHOSN et al., 2010; REISCHL; ZIMMER, 2009).

Os sistemas de liberação não-virais normalmente consistem de complexos formados entre polímeros ou lipídeos catiônicos e siRNA. Eles são bastante promissores devido a sua segurança, mas a supressão da expressão gênica mediada por estes carreadores ainda é baixa quando comparada aos vetores virais (REISCHL; ZIMMER, 2009) pelos motivos descritos acima. Os lipídeos e polímeros catiônicos formam complexos com siRNA através de interações eletrostáticas de sua carga positiva com a carga negativa do siRNA. As interações eletrostáticas devem ser suficientemente estáveis para sustentar a complexação do ácido nucléico com o lipídeo ou polímero catiônico durante o seu transporte até a célula alvo - protegendo-

o da degradação- e promover a sua internalização celular. A complexação siRNA/carreador catiônico evita os problemas de repulsão pela membrana celular que tem carga residual negativa e diminui o tamanho dos ácidos nucléicos devido à condensação da molécula (BEYERLE et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011; SCHROEDER et al., 2010; WONG; PELET; PUTNAM, 2007).

Os ácidos nucléicos podem ser internalizados nas células por diversas vias de entrada e a preferencialmente utilizada dependerá das características do seu sistema carreador (tamanho, carga superficial, conformação e presença de ligantes) e da linhagem celular (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; VERCAUTEREN et al., 2012). A principal via de entrada do siRNA na célula é por endocitose (SCHROEDER et al., 2010). A endocitose pode ser mediada por clatrina, via preferencial de lipoplexos, ou por caveolina, via de internalização efetiva de poliplexos (FERREIRA et al., 2014; REJMAN; CONESE; HOEKSTRA, 2006). O destino intracelular dos ácidos nucléicos está relacionado ao mecanismo de internalização celular e subsequente processamento intracelular (SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010; VERCAUTEREN et al., 2012), como por exemplo a endocitose mediada por clatrina pode levar a degradação lisossômica do siRNA (FERREIRA et al., 2014). Foi proposto que o escape endossomal de complexos internalizados pela endocitose mediada por clatrina ocorre pela desestabilização da membrana do endossoma pela presença dos lipídeos presentes nestes complexos. Caso esta desestabilização não ocorra, o conteúdo não será liberado no citoplasma e ocorrerá a degradação lisossomal. Na endocitose mediada por caveolina, o escape endossomal ocorre principalmente pela ruptura osmótica do endossomo num processo denominado “efeito esponja de prótons” (REJMAN; CONESE; HOEKSTRA, 2006). Assim, o complexo precisa ter características adequadas para que ocorra o escape endossomal (SCHROEDER et al., 2010).

A alta eficiência de transfecção de ácidos nucléicos promovida por polímeros catiônicos como por exemplo a polietilenoimina (PEI) se deve em grande parte à maneira como este facilita o escape endossomal pelo processo “efeito esponja de prótons” (GÜNTHER et al., 2011). Após a endocitose, o endossoma acidifica protonando as aminas dos polímeros e lipídeos catiônicos que tem pKa normalmente entre 7 e 5. Isto é seguido por um influxo de prótons adicionais bem como íons cloreto. A captação de íons gera um desequilíbrio osmótico, resultando em um influxo de água para alcançar o equilíbrio. O endossomo então se incha até o seu rompimento. A

ruptura do endossomo libera o conteúdo para o citoplasma (GÜNTHER et al., 2011; SCHROEDER et al., 2010). Uma vez no citoplasma, caso o complexo ainda não tenha sido dissociado, é necessário que as interações eletrostáticas permitam a dissociação do complexo para que o siRNA fique disponível para a maquinaria celular e exerça sua atividade terapêutica (SCHROEDER et al., 2010). Acredita-se que apenas 1-2% do siRNA liberado por nanopartículas lipídicas, por exemplo, são liberadas no citosol e estão disponíveis ao RISC (GILLERON et al., 2013).

Assim, em princípio, um sistema de liberação de siRNA ideal deve (SCHROEDER et al., 2010):

- proteger o siRNA da degradação enzimática,
- evitar a eliminação precoce,
- administrar o siRNA em tecidos alvos e evitar a toxicidade em outros tecidos,
- aumentar a internalização em células alvo,
- facilitar o escape endosomal e,
- liberar o siRNA no citoplasma.

As características necessárias para um sistema de liberação ser efetivo também irá depender da via de administração deste sistema e do tecido alvo. Uma apreciação do tecido ou fisiologia do órgão e análise da patologia envolvida é fundamental para projetar e otimizar o sistema de liberação.

1.2.2. Sistemas de liberação para administração localizada de siRNA

O siRNA pode ser administrado sistemica ou localmente. A administração sistêmica de siRNAs deve lidar com diversos desafios além dos inerentes da aplicação de siRNA, como interação dos siRNAs com componentes do sangue, a depuração renal e permeação dentro do tecido, além de problemas de toxicidade em tecidos não-alvo (PEER; LIEBERMAN, 2011; SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). A administração local pode superar estes desafios e apresenta várias vantagens como possibilita administração de doses menores, permite liberação local e sustentada e diminui a imunoestimulação (CONDE et al., 2015; GUZMAN-VILLANUEVA et al., 2012; VICENTINI et al., 2013b). A administração localizada de siRNA através do pulmão, vagina, pele, sistema nervoso, olho ou intratumoralmente tem mostrado benefícios em relação a administração sistêmica para o tratamento de patologias que acometem estes tecidos. Além de ser interessante na regeneração de tecidos (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015; VICENTINI et al., 2013b). Porém, em algumas

patologias como carcinomas metastáticos e infecções sistêmicas, a administração sistêmica é necessária (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015).

Entre os sistemas para administração localizada, os sistemas de geleificação *in situ* são uma interessante abordagem para a liberação de siRNA (BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015; HAN et al., 2011; KIM; PARK; SONG, 2012, 2013; KREBS; JEON; ALSBERG, 2009; NGUYEN; DANG; ALSBERG, 2013). Estes sistemas apresentam várias vantagens como serem minimamente invasivos e dolorosos quando comparados aos implantes porque eles podem ser injetados através de uma seringa no corpo e, após injeção, eles formam um gel localmente, que pode promover uma liberação sustentada do fármaco (HATEFI; AMSDEN, 2002; PACKHAEUSER et al., 2004).

Baseado no mecanismo de formação de gel *in situ* estes sistemas podem ser classificados em:

(i) Pastas termoplásticas, que são sistemas poliméricos injetados fundidos que formam gel quando resfriam no corpo;

(ii) Sistemas *crosslinked in situ*, que podem ser formados por vários mecanismos tais como foto-iniciação, interação iônica ou polimerização iniciada por radicais;

(iii) Sistemas obtidos por precipitação *in situ* de polímeros, os quais são formados por polímeros que ao serem injetados subcutânea ou intramuscularmente precipitam formando um implante sólido polimérico. Esta precipitação pode ser induzida por remoção de solvente, mudança na temperatura ou alteração de pH;

(iv) solidificação *in situ* de organogels, que são compostos de lipídeos polares ou outras anfifilas os quais intumescem na presença de água e formam vários tipos de cristais líquidos liotrópicos (BORGHETI-CARDOSO et al., 2013; HATEFI; AMSDEN, 2002; PACKHAEUSER; KISSEL, 2007).

Os primeiros sistemas de geleificação *in situ* para liberação de siRNA foram obtidos pelo método de *crosslinking in situ* ou precipitação (HAN et al., 2011; KREBS; JEON; ALSBERG, 2009). Embora estes sistemas tenham liberado o siRNA localmente, a liberação do siRNA a partir destes géis não foi controlada. Além disto, o siRNA foi liberado sem estar complexado ao carreador, o que pode resultar em curto tempo de meia-vida e baixa eficiência de transfecção (KIM; PARK; SONG, 2012; NGUYEN; DANG; ALSBERG, 2013). Além disto o método de *crosslinking* e precipitação podem ser prejudiciais ao tecido e ao siRNA (PACKHAEUSER et al., 2004). Por outro lado, os organogéis que se solificam *in situ* sob condições biológicas

no local de administração podem superar estes desafios. Os organogéis podem ser obtidos a partir de lipídeos anfifílicos tais como monoglicerídeos (MO) (Figura 3) que absorvem água do meio e se rearranjam em estruturas líquido cristalinas (AGARWAL; RUPENTHAL, 2013; CHANG; BODMEIER, 1997a, 1997b, 1998; HATEFI; AMSDEN, 2002; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005; RIZWAN et al., 2009; YAGHMUR; RAPPOLT; LARSEN, 2013).

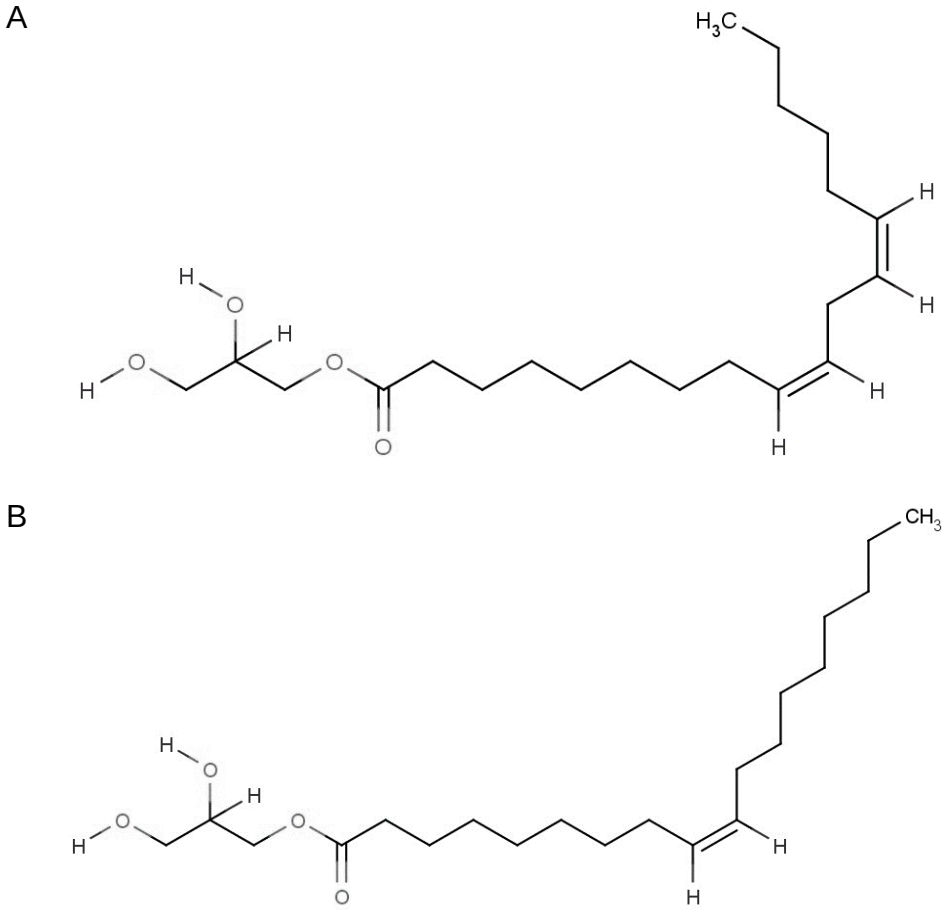

Figura 3. Estrutura química dos principais monoglicerídeos usados na obtenção de cristais líquidos: (A) monolinoleato de glicerila (monolinoleina) e (B) monoleato de glicerila (monoleína).

1.2.3. Sistemas líquido cristalinos

Os cristais líquidos são definidos como o estado da matéria cujas propriedades mecânicas e simétricas são intermediárias entre os sólidos cristalinos e os líquidos isotrópicos. A diferença entre os cristais sólidos e os líquidos isotrópicos é o estado de ordem. Nos cristais as moléculas estão altamente organizadas enquanto nos líquidos as moléculas se difundem livremente (SINGH, 2000). Eles podem ter diversos

tipos de estruturas moleculares, sendo classificados em termotrópicos ou liotrópicos. Os termotrópicos são os cristais líquidos obtidos por aumento da temperatura e os liotrópicos são aqueles no qual a sua obtenção é influenciada pela presença e proporção dos solventes (SINGH, 2000), sendo classificados em: fase lamelar, hexagonal e cúbica (SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001).

A fase lamelar (Figura 4A) consiste de estruturas lineares de bicamadas lipídicas alternadas entre canais de água e pode ser usada para obter a fase cúbica devido a sua habilidade de absorver excesso de água dos fluidos biológicos. A fase cúbica (Figura 4D, E e F) consiste de bicamadas lipídicas curvas em três dimensões separadas por canais de água, é formada com o aumento de água e é altamente viscosa e fisicamente estável, podendo ter a conformação Im3m, Pn3m e Ia3d (LARSSON, 1989). A fase hexagonal (Figura 4B e C) é caracterizada por longas estruturas cilíndricas bidimensionais, podendo existir na forma de fase reversa, a qual as cabeças polares da anfifila ficam na região interna dos cilindros e a porção apolar fica localizada ao redor dos cilindros; e na forma de fase normal, onde as cabeças polares da anfifila localizam-se na região externa dos cilindros (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001).

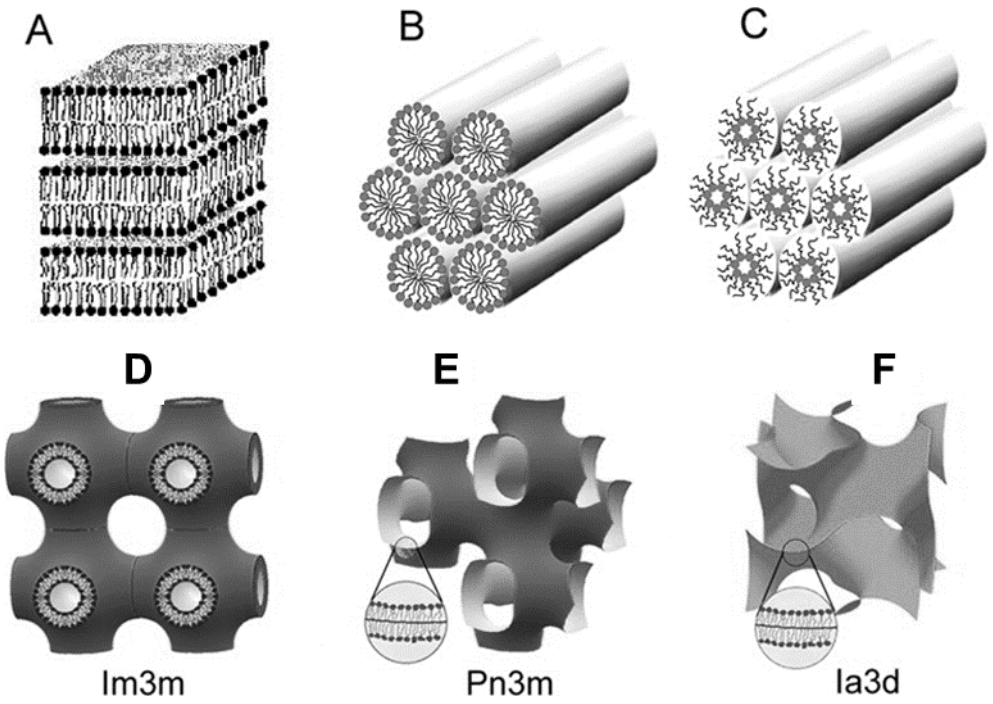

Figura 4. Fases líquido cristalinas: (A) fase lamear; (B) fase hexagonal; (C) fase hexagonal inversa; (D) fase cúbica bicontinua Im3m; (D) fase cúbica bicontinua Pn3m e (E) fase cúbica bicontinua Ia3d. Adaptada com autorização de (KOYNOVA; TENCHOV; MACDONALD, 2015). Copyright (2015) American Chemical Society.

A mudança de uma fase menos viscosa, como por exemplo a fase lamelar, em estrutura bicontinua cúbica ou fase hexagonal reversa pode ser explicada pelo fator de empacotamento (*K*). O fator de empacotamento relaciona a forma da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado. Portanto, o fator de empacotamento é um parametro muito útil para predizer a mesofase que é preferencialmente formada por uma anfifila e pode ser calculada pela equação 1 (MITCHELL; NINHAM, 1981):

$$k = \frac{Vh}{Ao.Lc}$$ (Equação 1)

onde *K* representa o fator de empacotamento, *Vh* relaciona-se ao volume da cauda hidrocarbonada, *Ao* a área da cabeça polar e *Lc* ao comprimento do anfifílico (MITCHELL; NINHAM, 1981).

Os valores do fator de empacotamento são normalmente ~1 para fase lamelar (ENGSTROM; ENGSTROM, 1992), ~1,3 para fase cúbica bicontinua e ~1,7 para fase hexagonal reserva (LARSSON, 1989). A Figura 5 relaciona o fator de empacotamento com os tipos de fases formadas.

O aumento do conteúdo de água permite que os grupos das cabeças polares do MO se movam mais livremente em uma direção perpendicular relativa ao plano da camada de água. Estes movimentos promovem desordem da cadeia hidrofóbica do MO, aumentando assim *Vh*. Como a interação dos grupos da cabeça polar são fortes, devido a pontes de hidrogênio, a sua seção transversal tende a ser constante. Assim, o fator de empacotamento aumento porque *Vh* aumenta, enquanto *Ao* e *Lc* permanecem constante, facilitando a transformação de fase lamelar para fase cúbica (AMAR-YULI; GARTI, 2005).

O tipo de sistema líquido cristalino formado irá depender das propriedades estruturais dos lipídeos, temperatura, característica dos componentes incorporados e quantidade de água no sistema devido estes fatores alterarem o fator de empacotamento dos lipídeos anfifílicos (CHANG; BODMEIER, 1998; FONG; HANLEY; BOYD, 2009).

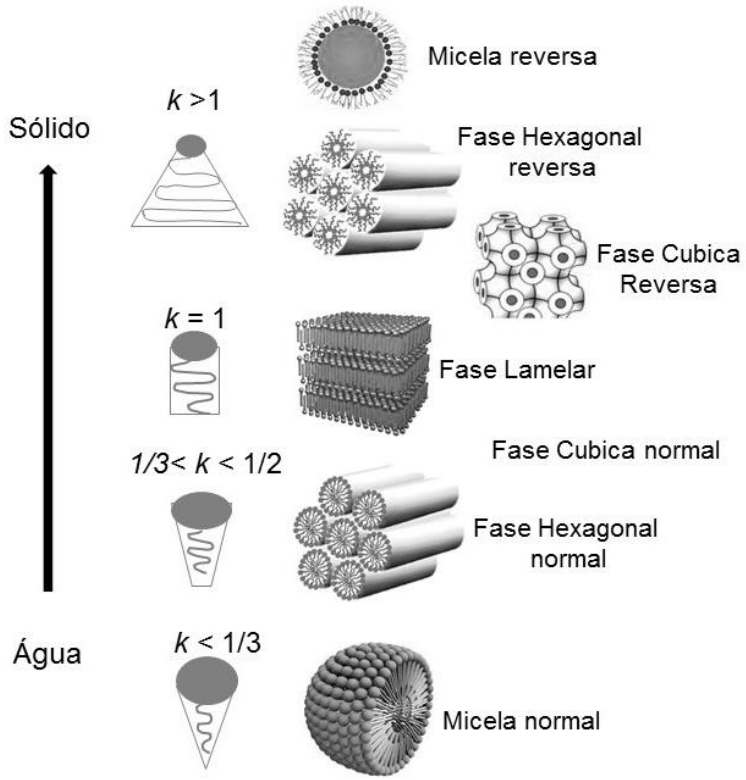

Figura 5. Relação entre o fator de empacotamento e as estruturas líquido cristalinas formadas. Adaptado de (BORNÉ; NYLANDER; KHAN, 2001; LOPES, 2005).

Os sistemas líquido cristalinos são de grande interesse para a administração de fármacos, peptídeos e genes porque eles podem incorporar compostos com diferentes solubilidades, proteger os fármacos da degradação física e enzimática, aumentar sua penetração na pele e controlar a sua liberação (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011; LOPES; SPERETTA; BENTLEY, 2007; LOPES et al., 2006a, 2006b; MOEBUS; SIEPMANN; BODMEIER, 2012; VICENTINI et al., 2013a; YARIV et al., 2010).

Baseado nas vantagens da administração localizada de siRNA e da formação de gel *in situ* pelo mecanismo de solidificação *in situ* de organogel, na presente pesquisa, foi proposto um sistema de liberação localizada para administração de siRNA obtido a partir de MO. Os MOs são o componente responsável pela formação de cristais líquidos viscosos como a fase cúbica e hexagonal. Propilenoglicol (PG) e tampão tris 0,1M pH 6,5 foram incorporados ao sistema para garantir a fluidez necessária para a injeção da formulação e o PEI 25 kDa foi usado para conferir um

residual de carga positiva ao sistema e assim permitir a formação de complexo entre o sistema e o siRNA.

O PEI (Figura 6) é um polímero sintético solúvel em água que pode ser linear ou ramificado, com uma alta densidade de carga catiônica em pH fisiológico, devido aos seus grupos amina livre (GÜNTHER et al., 2011; KREBS; ALSBERG, 2011). PEI é um dos mais eficientes carreadores de genes não virais devido as suas características de possuir alta densidade de carga e por facilitar o escape endossomal pelo “efeito esponja de prótons” (GÜNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011; YIN et al., 2014). A eficiência de transfecção do PEI depende da sua estrutura e peso molecular, sendo que o PEI ramificado de 25 kDa e o de 22 kDa são os mais eficientes. Porém, estes PEIs apresentam certa toxicidade e além disto a eficiência de transfecção ainda é moderada quando comparada aos sistemas virais (GÜNTHER et al., 2011; LIU et al., 2011).

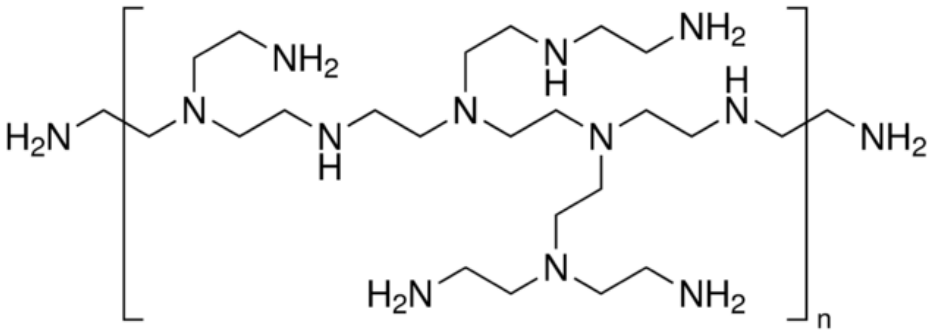

Figura 6. Estrutura química do polímero catiônico polietilenoimina (PEI), 25 kDa, ramificado.

Nos últimos anos tornou-se cada vez mais evidente que o desenvolvimento de novos fármacos por si só não seria suficiente para garantir o progresso nas terapias. Assim, uma estratégia para superar este problema é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. A principal vantagem desta abordagem é que o destino do fármaco *in vivo* não é mais somente determinado pelas características do fármaco, mas também pelo sistema de liberação, o qual deve proporcionar uma liberação localizada e controlada do fármaco (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

1.3. Câncer de pele

1.3.1. Epidemiologia, etiologia e tratamentos

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes (14,6% do total) em 2012 (FERLAY et al., 2015). Câncer é um termo genérico usado para se referir a um grande número de doenças complexas com crescimento celular irregular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O desenvolvimento de células cancerígenas é um processo multi-etapas, com alteração em uma variedade de eventos de sinalização celular que levam a modificações no perfil da expressão de determinados genes (GUO et al., 2011). Estas mudanças alteram a função das células permitindo a expressão de sinais de crescimento, inibição da apoptose, ilimitado potencial de replicação, angiogênese, invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011; URIBE; GONZALEZ, 2011).

O câncer de pele é o tumor maligno mais comum nos seres humanos, especialmente, na população branca (D'ORAZIO et al., 2013; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Na população brasileira, para o biênio 2016-2017, estima-se que ocorrerão aproximadamente 180 mil casos novos de câncer de pele não melanoma e 6 mil de melanoma, o que corresponde a 30% dos casos novos de câncer no país (SILVA, 2015).

Os cânceres de pele são denominados de acordo com as células a partir das quais eles surgem e de seus comportamentos clínicos. Os três tipos de cânceres mais comuns são os carcinomas de células basais, os carcinomas de células escamosas e os melanomas (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; D'ORAZIO et al., 2013; NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010). Os carcinomas de células basais e os carcinomas de células escamosas também são conhecidos como carcinoma de pele não melanoma. A sua incidência é bem maior do que a incidência de melanoma, mas felizmente, eles são mais fáceis de tratar e tem um prognóstico melhor. Embora a mortalidade seja baixa nestes cânceres, principalmente devido ao fato de serem localizados, eles podem resultar em desfiguração significativa, levando a consequências físicas e emocionais adversas para os pacientes. Além disto, estes cânceres, que causam considerável morbidade, colocam um enorme fardo sobre os sistemas de saúde em todo o mundo (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010; SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). O carcinoma de células escamosas, que corresponde a 15-20% de todos os cânceres de células não melanomas, é mais propenso a invadir outros tecidos, e pode causar a morte (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010; SIMÕES;

SOUSA; PAIS, 2015). É relatado que no carcinoma de células escamosas há risco de metástase em 12% dos casos (URIBE; GONZALEZ, 2011).

Os carcinomas de células basais e os de células escamosas são derivados de queratinócitos e o melanoma de melanócitos (Figura 7) (GARCIA-URIBE et al., 2012; NYS; AGOSTINIS, 2012). Os queratinócitos são as principais células da pele constituindo cerca de 90-95% da epiderme, que é a camada mais externa da pele tendo a função de barreira. A epiderme está em constante renovação devido a atividade mitótica das células da camada basal que originam os novos queratinócitos, que então, passam por um processo de diferenciação induzido pelo processo de morte celular se movendo para a camada externa da epiderme onde se tornam os corneócitos. Na epiderme os queratinócitos estão em contato com os melanócitos, que são células produtoras de pigmento (ERNFORS, 2010; HOUBEN; DE PAEPE; ROGIERS, 2007).

O aumento da incidência de câncer de pele nas últimas décadas é uma consequência direta da exposição à genotóxica e mutagência radiação ultravioleta (UV). A maioria das propriedades mutagênicas e cancerígenas da luz solar tem sido atribuída ao UVB. Quando uma célula é danificada gravemente pelo UVB e os mecanismos de reparo da célula não são suficientes para reverter os danos, a célula entra em processo de apoptose. Este processo é muito importante para impedir a sobrevivência das células lesadas que frequentemente carregam genes supressores de tumor ou protooncogenes mutados e que podem ser transmitidos aos seus descendentes (NYS; AGOSTINIS, 2012). Quando a processo de apoptose falha e as células danificadas sobrevivem pode-se resultar em câncer. É importante ressaltar que estudos recentes sugerem que o desenvolvimento de células epidérmicas em tumores malignos ocorre por mais de uma via, como é evidenciado pelos diferentes perfis moleculares, distintas distribuições anatômicas e diversos fatores de risco para subgrupos de cânceres de pele (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

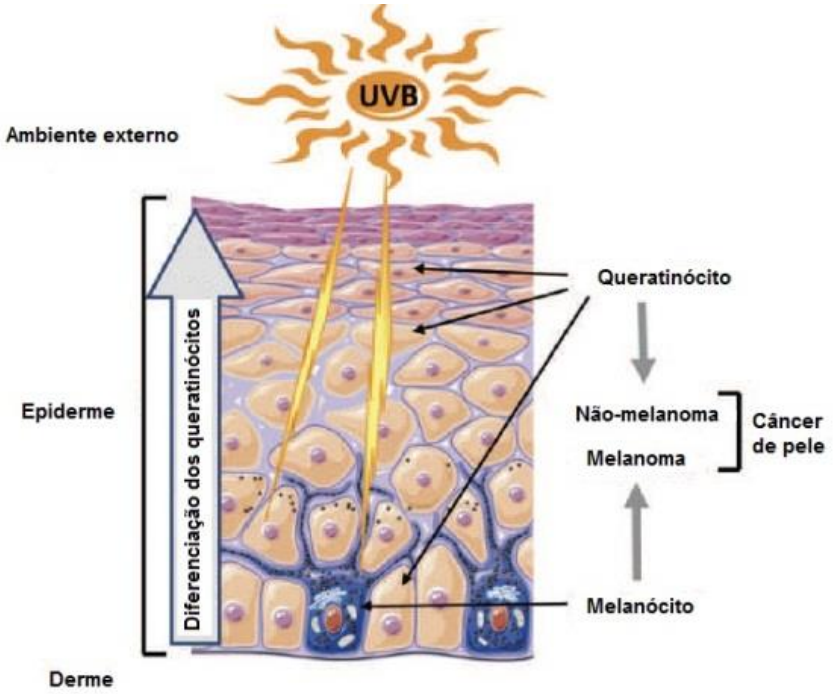

Figura 7. Representação esquemática da epiderme humana. Sob a exposição excessiva de radiação UVB pode ser desenvolvido o câncer de pele. Adaptado com autorização de (NYS; AGOSTINIS, 2012). Copyright (2012), com permissão de Elsevier.

O tratamento do câncer é tão complexo quanto o seu desenvolvimento. A terapia anti-câncer ideal deve matar as células cancerígenas sem afetar as células saudáveis. Atualmente, o sucesso da terapia anti-câncer depende principalmente do estado da doença no momento do diagnóstico e a terapia é normalmente baseada na remoção cirúrgica do tumor, quimioterapia, radioterapia ou na combinação destas. No câncer de pele a retirada do tumor por cirúrgia continua sendo o principal tratamento (CLARKE, 2012; LAZARETH, 2013). O tratamento do câncer de pele tem três objetivos centrais: erradicação completa do câncer, preservação da função normal da pele e cuidado com a cosmética (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Embora as terapias anti-cânceres tenham evoluído, elas ainda apresentam limitações e estão longe de ser o ideal. Portanto, novas pesquisas e tratamentos inovadores são necessários.

A descoberta do silenciamento gênico por siRNA apresentou novas oportunidades para a terapia do câncer (GUO et al., 2011). O siRNA está sendo empregado no silenciamento de genes envolvidos em diversas vias que levam ao desenvolvimento e progressão do câncer incluindo as vias de oncogênese, angiogênese (KIM et al., 2008; SALVA et al., 2012; SCHIFFELERS et al., 2004), apoptose, regulação do ciclo celular (BROWN et al., 2010; NYS; AGOSTINIS, 2012),

senescência celular, interação tumor-hospedeiro e resistência às terapias convencionais (HAN et al., 2011).

Na terapia do câncer a administração sistêmica tem sido extensivamente utilizada, embora alguns carcinomas são ideais para administração localizada como os cânceres de pele (SARETT; NELSON; DUVALL, 2015). As terapias localizadas permitem o acúmulo da substância no tumor sem toxicidade no resto do corpo, porém não permitem atingir as mestastases (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). A administração intratumoral de hidrogéis que formam gel *in situ* contendo siRNA se mostrou eficiente e segura para a terapia do câncer em estudos com animais (HAN et al., 2011; KIM; PARK; SONG, 2012, 2013; SEGOVIA et al., 2015).

Ao longo dos anos, o aumento do conhecimento sobre os processos envolvidos na carcinogênese, no crescimento e na transformação maligna do tumor tem resultado na identificação de alvos moleculares relevantes para o tratamento do câncer. A família HER dos receptores de tirosina quinase é uma das mais estudadas redes de sinalização que contribuem com o desenvolvimento e crescimento do tumor. Assim, um alvo atraente para a terapia do câncer é o receptor do fator de crescimento epidérmico (do inglês, *epidermal growth fator receptor* (EGFR)) (CHO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

1.3.2. Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O EGFR é uma glicopreoteína transmembrânica de 170 kDa que pertence a família de receptores também conhecidos como receptores tipo 1 de tirosina quinase ou família dos receptores ErbB. Esta família é composta de quatro receptores intimamente relacionados: o próprio receptor EGFR (ErbB1/HER1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Cada um destes receptores é composto por 3 domínios: o domínio de ligação extracelular, o segmento lipofílico transmembrânico e o domínio intracelular da proteína tirosina quinase com um segmento de regulação carboxílico terminal (CT) (WELLS, 1999; YARDEN, 2001). O domínio extracelular é uma estrutura dinâmica que pode se organizar em uma estrutura fechada com baixa afinidade pelo ligante ou uma estrutura aberta com alta afinidade pelo ligante. O segmento CT no domínio intracelular contém resíduos de tirosina que modulam a transdução de sinal mediada pelo EGFR após fosforilação. O CT também tem vários resíduos de treonina e serina, cuja fosforilação parece estar

envolvida nos processos de endocitose e *downregulation* do receptor (FERGUSON, 2004; NORMANNO et al., 2006).

A ativação do EGFR ocorre quando os ligantes, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação de crescimento α (TGF-α), afiregulina, betacelulina, EGF ligado a heparina ou epiregulina, se ligam ao receptor apresentando a conformação aberta. Este evento resulta na fosforilação de diversos substratos intracelulares, ativando certo número de cascatas que conduzem o sinal para o núcleo (Figura 8). As quatro vias de sinalização mais conhecidas são a proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), o fosfatidilinositol-3-OH quinase (PI3K)/Akt, o transdutor de sinal e ativador de transcrição mediado por STAT e a via fosfolipase Cy (PLCy). Cada sinal vai ativar a expressão de genes e, por fim, induzir respostas celulares, tais como a proliferação celular, diferenciação, invasão, migração, adesão, sobrevivência e reparação celular (CHOI et al., 2010; KALINOWSKI et al., 2012; NORMANNO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

O EGFR é expresso em todos os tipos celulares exceto em células hematopoéticas. Na maioria dos cânceres humanos epiteliais, tais como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer do pulmão de não pequenas células, câncer de colo, câncer de mama e câncer pancreático, ocorre uma super expressão do EGFR (BARO et al., 2014; EIBLMAIER et al., 2008). É relatado que a expressão de EGFR é desregulada em pelo menos 33-50% dos tumores epiteliais humanos (SEBASTIAN et al., 2006). Em relação aos cânceres de pele, EGFR foi detectado em aproximadamente 50% dos carcinomas de células basais e cerca de 100% dos carcinomas de células escamosas, sendo super expresso em 73% dos casos dos carcinomas de células escamosas. No carcinoma de células escamosas, esta superexpressão parece também conduzir à um fenótipo mais agressivo do câncer (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015; URIBE; GONZALEZ, 2011).

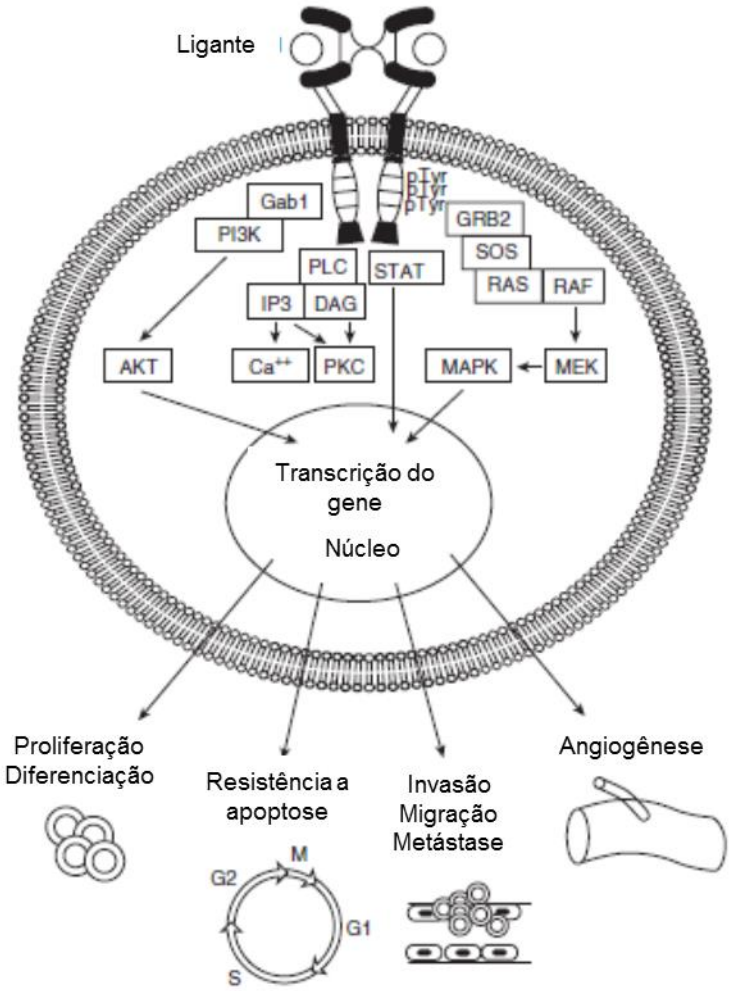

Figura 8. Ativação do EGFR e sinal de transdução. A ligação do ligante ao EGFR resulta em fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio terminal carboxílico, recrutamento de proteínas de sinalização e, por último, a fosforilação de substratos intracelulares ativando várias vias de transdução de sinal. Estas vias transmitem o sinal para o núcleo e modulam a transcrição celular e a progressão do ciclo celular. Por fim, estes efeitos no núcleo são traduzidos em aumento da diferenciação, proliferação e resistência à apoptose. Além disso, invasão, migração e metástase das células são promovidas e angiogénese é estimulada. DAG: diacilglicerol, IP3: inositol trifosfato, MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos, MEK: quinase MAPK, PKC: proteína quinase C, PI3K: fosfatidilinositol-3-OH quinase, PLC: fosfolipase C, STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição. Adaptado com autorização de (OLIVEIRA et al., 2006). Copyright (2006) Taylor & Francis.

Desde que foi mostrado que o EGFR está envolvido na iniciação, crescimento e metastese de muitos tumores humanos, várias estratégias para reduzir a atividade deste receptor têm sido desenvolvidas (CHOI et al., 2010). Estas estratégias podem ser divididas em três tipos dependendo da localização onde a ação é realizada (Figura 9) (OLIVEIRA et al., 2006):

- no domínio extracelular do EGFR, interferindo com a ligação do ligante o ao receptor, por exemplo, pela utilização de anticorpos monoclonais (mAbs) como o cetuximab e

panitumumab que são aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (CIARDIELLO; TORTORA, 2008);

- no domínio intracelular, inibindo a ativação da proteína tirosina-quinase, como por exemplo usando inibidores da tirosina quinase como o erlotinib e o gefinitinib (aprovados pelo FDA) (CIARDIELLO; TORTORA, 2008).
- no nível do RNAm, interferindo com a produção de EGFR, por exemplo, utilizando siRNA que promove a degradação do RNAm que codifica a proteína EGFR e assim reduzindo a sua expressão na célula.

Intervindo na expressão ou inativação do EGFR através do uso de mAbs, inibidores de tirosina quinase ou interferentes de RNAm, obtem-se atividades antitumorais por vários efeitos celulares tais como controle do ciclo celular, indução da apoptose, diminuição da proliferação celular, redução da capacidade de mestastase e inibição da angiogênese.

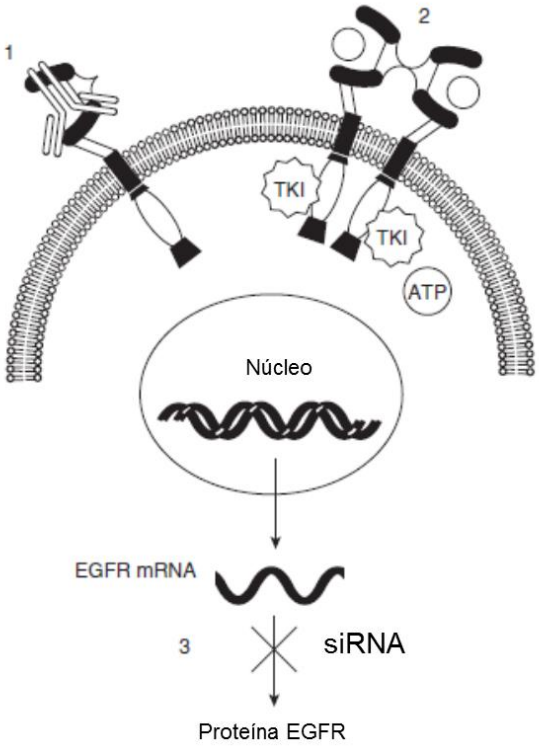

Figura 9. Estratégias para bloquear a transdução de sinais pelo EGFR pode ser feito em 3 diferentes níveis: (1) no domínio extracelular do EGFR interferindo na ligação do ligante com o receptor; (2) no domínio intracelular, inibindo a ativação da proteína tirosina quinase; (3) a nível de RNAm, pela inibição da tradução do RNAm. TKI: inibidor da tirosina quinase. Adaptado com autorização de (OLIVEIRA et al., 2006). Copyright (2006) Taylor & Francis.

Embora muitos testes clínicos têm mostrado que as terapias com mAbs e inibidores da tirosina quinase têm sido promissores no tratamento de tumores, a baixa eficácia em alguns casos requer o desenvolvimento de terapias mais efetivas contra este alvo. A baixa eficácia tem sido relacionada ao fato de tumores adquirirem resistência a estas terapias (WHEELER; DUNN; HARARI, 2010). A resistência adquirida ou intrínseca das células em relação a estes agentes terapêuticos pode ocorrer por vários mecanismos tais como (i) mutações dentro do EGFR e em seus efetores de *downstream* que ativam a sinalização, (ii) sinalização compensatória através de outros receptores de tirosina quinase e (iii) transição de um fenótipo epitelial para mesenquimal (KALINOWSKI et al., 2012).

Alguns estudos também têm mostrado que estes agentes podem ser efetivos para uns tumores, mas não são para outros. Como por exemplo, os testes clínicos com radiação em combinação com cetuximab tiveram resultados promissores no tratamento de câncer de cabeça e pescoço, porém os estudos combinando quimioterapia e radioterapia com cetuximab não demonstraram diferenças significativas no tratamento de câncer de pulmão de não pequenas células (RABEN et al., 2005). Vários testes clínicos de fase III corroboram com este resultado, mostrando que o cetuximab não melhorou significativamente os resultados clínicos em pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (QIAN et al., 2014). O uso de erlotinib ou gefitinib combinados com quimioterapia também não mostraram diferenças quando comparado com a quimioterapia sozinha (GATZEMEIER et al., 2007; HERBST et al., 2004). A maioria dos pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células também não respondem ao gefitinib, apenas 10% destes pacientes tiveram uma boa resposta clínica a esta terapia. Algumas mutações no domínio da tirosina quinase do gene EGFR foram as responsáveis por conferir resposta a este inibidor de tirosina quinase (LYNCH et al., 2004). Portanto, novas estratégias são necessárias para efetivamente bloquear a atividade deste receptor ou silenciar o gene EGFR e, assim, inibir todas as vias de sinalização que a sua ativação desencadeia.

Neste contexto o uso de siRNA, que interefere no nível de RNAm é uma abordagem promissora para a inibição da síntese de EGFR e esta estratégia tem se mostrado eficiente na terapia do câncer tanto aplicada sozinha quando combinada à outras terapias (CHEN et al., 2012; LI et al., 2008; ZHANG et al., 2013).

A duração do silenciamento do gene promovido pelo siRNA depende tanto do número de moléculas de siRNA transfectadas quanto da taxa de duplicação da célula.

O siRNA parece ter um efeito de silenciamento gênico mais prolongado em células com baixa taxa de divisão celular do que em células que se dividem rapidamente. Como por exemplo, a atividade do siRNA dura de 3-7 dias em células proliferativas enquanto que em células tais como neurônios tem atividade por 3 semanas (MASIERO et al., 2007). Desta forma, sistemas de liberação localizada e sustentada são bastante promissores para a liberação de siRNA em células tumorais, uma vez que o período de retenção do siRNA nestas células é bastante curto.

Neste contexto, a presente pesquisa propôs uma nova abordagem para a terapia gênica do câncer de pele empregando sistemas de geleificação *in situ* para administração intratumoral de siRNA.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa visa avaliar sistemas líquido cristalinos de geleificação *in situ* como sistema de liberação localizada de siRNA na terapia do câncer de pele. Para tal, a capacidade deste sistema de liberar, complexar e proteger o siRNA, promover a sua internalização celular e o silenciamento de proteínas de interesse foi avaliado *in vitro*, bem como foi avaliado *in vivo* a formação do gel, o silenciamento da expressão de EGFR e a redução do tumor após administração intratumoral do sistema complexado ao siRNA específico para EGFR.

2.1. Objetivos específicos:

2.1.1. Obtenção da formulação fluida precursora (FFP);

2.1.2. Avaliação da formação de gel *in vitro* e caracterização do gel formado em excesso de água;

2.1.3. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*;

2.1.4. Determinação do processo de esterilização da FFP;

2.1.5. Determinação da capacidade da FFP complexar siRNA;

2.1.6. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a FFP;

2.1.7. Avaliação da viabilidade celular;

2.1.8. Avaliação da internalização celular do siRNA liberado do G-FFP por medida da fluorescência em lisado celular e microscopia confocal em células HeLa, FaDu, A549, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP;

2.1.9. Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HeLa, FaDu e A549 pelo siLuc liberado do G-FFP;

2.1.10. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR em células FaDu, A549, HeLa e A431 pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP;

2.1.11. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP combinado com a Internalização Fotoquímica (IFQ) em células A549;

2.1.12. Avaliação da formação do gel intratumoral;

2.1.13. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Western Blotting;

2.1.14. Análise da expressão de EGFR RNAm nos tumores por RT-PCR;

2.1.15. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Imunohistoquímica (IHQ);

2.1.16. Avaliação *in vivo* da redução do tumor.

3. MATERIAL E MÉTODOS

- A formulação fluida precursora (FFP) de geleificação *in situ* que é utilizado nesta pesquisa foi desenvolvida no projeto de mestrado de Lívia N. B. Cardoso, intitulado “Sistemas de liberação de geleificação *in situ* para veiculação de siRNA: desenvolvimento, caracterização e estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal”, projeto Fapesp n° 2010/11736-0. No projeto de mestrado, os géis obtidos a partir dos sistemas (MO/PG/tampão tris 0,1M pH6,5 e PEI ou oleilamina foram caracterizados como sistemas líquido cristalinos por microscopia de luz polarizada e difração de raios-X. Os sistemas formam complexo com o siRNA devido a presença do polímero ou lipídeo catiônico. Os estudos *in vivo* com administração subcutânea das FFPs mostraram que o gel obtido *in situ* é biodegradável e biocompatível (BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015). Baseado nestes resultados, escolhemos a FFP composta por MO/PEI/PG/tampão tris (7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p)) para avaliar a sua eficácia em promover a internalização celular do siRNA e a sua liberação efetiva no citoplasma para que ocorra o silenciamento de proteínas de interesse, bem como, avaliar a eficiência da FFP em promover uma liberação localizada de siRNA na terapia gênica do câncer de pele não melanoma após administração intratumoral.

3.1. Material:

3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas:

- Monoglicerídeo (MO) (Myverol 18-92 K consistindo de 93% de monoglicerídeos (contendo 65% de monolinoleato de glicerila, 23% de monoleato de glicerila, 6% de monoglicerídeo (C16), 4% de monoglicerídeo (C18), 1% de monoglicerídeo (C20), 1% de monoglicerídeo (C18:3)), 6% de diglicerídeos e triglicerídeos seguindo o mesmo perfil de ácidos graxos dos MO e <1% de ácidos graxos livres e glicerol e traços de ácido cítrico, ácido ascórbico e tocoferóis) - Kerry Bio Science, (Zwijndrecht, Holanda)
- Polietilenoimina (PEI) - Sigma Aldrich Co., (St. Louis, MO, EUA)
- Propilenoglicol (PG) - Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, (Diadema, SP, Brasil) ou Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemanha).
- Tris (hidroximetil) aminometano – Merck KGaA (Germany) ou Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemanha)
- UltraPure^{TM} Agarose – Invitrogen, (Carlsbad, CA, EUA)

- Heparina (Heparina sódica 5.000 U.I./mL) – Blausiegel, (Cotia, SP, Brasil)
- Brometo de etídio - Sigma Aldrich Co., (St. Louis, MO, EUA)
- siRNA não especifico (ns-siRNA) - Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) Ambion (Austin, TX, EUA)
- siRNA não especifico (ns-siRNA) - Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgica)
- EGFR siRNA - STW projer dupler 5, MW 13300 g/mol - Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgica)
- EGFR siRNA (SC-29301) - Santa Cruz Biotechnology, INC (Santa Cruz, CA, EUA)
- EGFR siRNA (*in vivo*) (Reference # 67191424) - Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgica)
- siLuc (sense: GAUUAUGUCCGGUUAUGUACG, antisense: UACAUAACCGGACAUAAUCGG) - Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgica) ou Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA)
- Lipofectamina 2000 - Life Technologies (Paisley, Reino Unido)
- HiPerFect Transfection Reagent - QIAGEN GmbH (Hilden, Alemanha)
- GelRed – Biotium (Hayward, CA, Estados Unidos)
- CellTiter 96 AQueous MTS Reagent Powder (MTS) - Promega Corporation (Madison, WI, EUA)
- Di(monoetanolamina)meso-tetrafenil porfirina disulfonato (a=adjacente) $(MEA)_2$TPPS2a, fotosensibilizador) - PCI Biotech AS (Oslo, Noruega)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Hybri-Max: Sigma Aldrich (St. Louis, EUA)
- Vetor pCMV-Luc (expressão de Firefly luciferase (FL)) - PlasmidFactory (Bielefeld, Alemanha)
- Vetor pGL4.74 [hRluc/TK] (expressão de Renilla luciferase (RL)) - Promega (Leiden, Holanda)
- Dual Luciferase Reporter Assay System kit - Promega (Leiden, Holanda).
- Ripa Buffer Cat No. R3792 - Teknova (EUA)
- Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100x) Prod#877585 - Thermo Scientific ((Rockford, IL, EUA)
- Micro BCA™ Protein Assay Kit (Prod No. 23225) - Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA)

- Anticorpo EGFR: EGF receptor (D38B1) XP(R) rabbit mAB - Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA)
- Anticorpo β-Actina: beta-Actin Antibody rabbit mAB - Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA)
- Segundo anticorpo: Alexa Fluor 680 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2 mg/mL - Invitrogen (Eugene, Oregon, EUA)
- Glicina – Riedel de Haen (Hanover, Alemanha)
- Odyssey Block Buffer – Westburg (Leusden, Holanda)
- Albumina do soro bovino (BSA) – MP Biomedical (Santa Ana, CA, EUA)
- Acrilamida/Bis – BioRad (Veenendaal, Holanda)
- Ladder: Precision Plus ProteinTM All Blue Standards - Bio-Rad Laboratories B.V (Veenendaal, Holanda)
- OPTI-MEMR I + GLUTAMAXTM I 1X (Optimem) Ref 51985-026: Life Technologies (Paisley, Reino Unido)
- F-12K Nut Mix - Nutrient Mixture Kaighn's Modification [+] Glutamine (F-12K): Life Technologies (Paisley, Reino Unido)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) - Gibco® by Life Technology (Paisley, Reino Unido)
- Camundongo NU/NU nude Crl:NU-Foxn1nu, homozigoto (code 088) - Charles River (Leiden, Holanda)
- Tissue homogenizing CKMix - Precellys Lysing Kit - Bertin Technologies (France)
- TRIzol Reagent (Ref 15596018) - Ambion by Life Technologies (Paisley, Reino Unido)
- RNAseZAP - Sigma Aldrich (EUA)
- GeneAmp RNA PCR kit - Applied Biosystems (EUA)
- TaqMan Universal Master Mix II - Applied Biosystems (EUA)
- TaqMan Gene Expression Assays (EGFR, Actin) (EUA)
- Primeiro anticorpo (imunohistoquímica): rabbit α-EGFR (#4267) - Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EUA)
- Segundo anticorpo (imunohistoquímica): goat α-rabbit-HRP - Dako Netherlands bv (Heverlee, Bélgica)
- Terceiro anticorpo (imunohistoquímica): rabbit α-goat-HRP - Dako Netherlands bv (Heverlee, Bélgica)

- Loading buffer 6X (Dye #R0611) - Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA)

3.1.2. Equipamentos e acessórios:

- Microscópio ótico modelo AxioPlan 2 Image (Carl Zeiss) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmera digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha)
- Balança analítica (Ohaus)
- Agitador mecânico tipo mixer (IKa)
- Chapa de aquecimento (Fisatom)
- Medidor de pH (Digimed)
- Cuba eletroforética (BioRad)
- Banho termoregulado (FANEM® modelo 1100)
- Concentrador (Eppendorf Concentrator 5301)
- Membrana de 0,22 µm (Corning Incorporated, Alemanha)
- Membrana de nitrocellulose 0,2 µm (GE Healthcare, Alemanha)
- Membrana de transferência PVDF Immobilon FL Cat No. IPFL00010 Pore Size 0,45 µm (Millipore, Alemanha)
- Insert com membrana com poro de 1 µm (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA)
- Fluxo laminar (Veco modelo VLFS 12M)
- Criostato (Leica CM1850)
- Odyssey Infrared Imager (LI-COR® Biosciences, EUA)
- Equipamentos do Western Blotting (BioRad)
- LumiSource® (PCI Biotech AS, Oslo, Noruega)
- Precellys®24-Dual (3x20 s, 5500 rpm)
- GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)
- ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- SpectraMax L luminescence microplate reader (Molecular Devices)
- BioStation IM-Q (Nikon)
- Microscópio de Fluorescência (Leica DMI 6000B)
- Microscópio Confocal (Leica TCS SP8)
- Microscópio Confocal (Zeiss LSM 700)
- Leitor de placa SpectraMax M2 (Molecular Devices)
- Leitor de placa EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer)

- Leitor de placas Synergy 2 (Biotek) com o programa Gen5 Data Analysis Software
- Transilluminator L PIX, Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, Brasil) com o programa LabImage 1D Gel Analysis Software

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção da formulação fluida precursora (FFP)

Para a obtenção da FFP, o MO (Myverol 18-92K, Kerry Bio Science, Holanda) foi aquecido em banho de água termostatizado até a temperatura de fusão (42 °C) e, em seguida, foram adicionados o PEI (25 kDa, ramificado) e o PG. A mistura obtida foi homogeneizada. Após a homogeneização foi adicionado o tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,5 (tampão tris) previamente aquecido a mesma temperatura. O sistema foi deixado em repouso por 24 h após o preparo para equilíbrio e acondicionados ao abrigo da luz.

Para a complexação da FFP com o siRNA, o mesmo foi adicionado ao sistema na proporção 1:1 (v/v) e a mistura foi agitada em vórtex e incubada a temperatura ambiente por 30 min.

3.2.2. Avaliação da formação de gel *in vitro* e caracterização do gel formado em excesso de água

3.2.2.1. Avaliação da formação do gel in vitro

A avaliação da formação de gel *in vitro* foi realizada adicionando-se 100 µL da FFP:água ou FFP:solução aquosa de siRNA (1:1, v/v) a 900 µL de água, mantidos a 37 °C em banho termoregulado. Após a adição do siRNA à FFP, o sistema foi agitado em vortex e deixado em repouso por 30 min para que ocorra a complexação antes de ser adicionado a 900 µL de água. O gel obtido a partir da FFP em excesso de água (G-FFP) foi analisado por microscopia de luz polarizada e SAXS após 24 h de sua obtenção.

3.2.2.2. Caracterização do gel por microscopia de luz polarizada e por espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS, Small Angle X-ray Scattering)

O G-FFP foi caracterizado por microscópio óptico modelo Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmara digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha) e por SAXS.

As estruturas líquido cristalinas do G-FFP contendo 10 e 100 µM de siRNA (concentração final na formulação) foram determinadas por SAXS usando o *Bruker AXS Nanostar small angle X-ray camera* com um sistema *microfocus Genix 3D* (λ = 0,15418 nm) e detector 2D Vantec-2000. O tempo de aquisição de cada amostra foi de 3 h à temperatura ambiente. As medidas de intensidade foram analisadas em função do vetor de onda $q = (4\pi sen\theta)/\lambda$. A distância amostra-detector foi de 667 mm, que forneceu valores de q entre 0 e 3,5 nm^{-1}. Os G-FFPs foram acondicionadas em suporte, entre folhas de mica. Os resultados experimentais foram corrigidos pela resposta do detector. A transmissão das amostras e do suporte isolado com as folhas de mica foram medidas e os dados de SAXS foram normalizados pela transmissão em cada caso, bem como foi removido o espalhamento das folhas de mica do espalhamento das amostras. As estruturas líquido cristalinas foram determinadas calculando os valores das distâncias interplanares, d, da lei de Bragg, e estas distâncias foram associadas ao índice de Miller de estruturas simétricas (LINDBLOM; RILFORS, 1989).

3.2.3. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*

O perfil de liberação do siRNA foi avaliado em placa de 12 poços com insert com membrana com poro de 1 µm. À FFP foi adicionado siRNA na concentração final de 10 µM e após agitação, deixada em repouso por 30 min para que ocorra a complexação. Como controle foi utilizado o siRNA em água DEPC. 100 µL da formulação e do controle foram adicionados sobre a membrana do insert. O meio receptor utilizado foi água DEPC (1800 µL) e em intervalos de tempos pré-estabelecidos (24 h, 48 h e 7 dias), o meio receptor foi coletado e novamente reposto com água DEPC. A placa de 12 poços foi mantida em banho termostatizado a 37° C. As amostras coletadas foram secas no concentrador de amostra, ressuspendidas em 60 µL de água livre de RNAse e dividas em dois eppendorfs. Em um eppendorf foi adicionado 10 µL de heparina 5.000 U.I./mL, no outro, água. Então, as amostras foram colocadas em banho termostatizado a 37° C por 1 h. O siRNA liberado foi determinado em gel de agarose 2% por eletroforese. As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 min. No gel foi aplicado uma curva-padrão na concentração de 0,9375 a 15 µM de siRNA. A intensidade das bandas da curva-padrão e das amostras foram calculadas pelo NIH ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

3.2.4. Determinação do processo de esterilização da FFP

A formulação foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm em fluxo laminar. O teste de esterilidade foi realizado de acordo com o preconizado pela *U.S.Pharmacopeia* (USP 33-NF 28, 2010, item 71 do Capítulo Geral) e os critérios de aceitabilidade seguiram os estabelecidos por esta farmacopéia. Para padronizar e verificar a eficiência do processo de esterilização os seguintes experimentos foram realizados: determinação da quantidade de microrganismos presentes nas matérias-primas e formulação (FFP), teste de esterilização da formulação e teste de esterilização da formulação desafiado com *Pseudomonas diminuta*.

3.2.4.1. Determinação da quantidade de microrganismos presentes nas matérias-primas e formulação (FFP)

3.2.4.1.1. Determinação do diluente

Foram testados como diluente solução salina, PG e miristato de isopropila (MIP). As matérias-primas (MO, PG, tampão tris) e a FFP foram diluídas nos diferentes diluentes na proporção de 1:99. As que solubilizaram, foram lavadas duas vezes com 200 mL de água peptonada 0,1% (p/v) contendo 3% de polissorbato 80 (água de lavar I) e em seguida, lavadas uma vez com 100 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (água de lavar II) (AHMED; DASHEVSKY; BODMEIER, 2010).

3.2.4.1.2. Avaliação do diluente quanto à capacidade de não inibir o crescimento de microrganismos

MIP foi escolhido como diluente e foi filtrado assepticamente em membrana de 0,22 µm. Então, 100 unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus* foram adicionadas ao MIP estéril e misturado. O MIP com microrganismos foi assepticamente filtrado em membrana de 0,22 µm seguido de duas lavagens de 200 mL de água de lavar I e 100 mL água de lavar II. A membrana foi colocada em uma placa de triptona caseína soja (TCS) e incubada a 35 °C por 48 h. Como controle foi utilizada salina estéril adicionada de 100 UFC de *Staphylococcus aureus* e o mesmo procedimento repetido. O crescimento de *Staphylococcus aureus* na placa de TCS indica que o diluente não inibe o crescimento de microrganismos e pode ser usado na avaliação do processo de esterilização.

3.2.4.1.3. Avaliação dos microrganismos presentes na matéria-prima e FFP

1 g de cada matéria-prima e da FFP foi adicionado a 100 mL de MIP estéril. Estas amostras foram filtradas assepticamente em membrana de 0,22 µm e lavadas duas vezes com 200 mL de água de lavar I e 100 mL água de lavar II. A membrana foi colocada em placa de TCS e incubada a 35 °C por 3 dias ou em placa de potato-dextrose-agar (PDA) e incubada a 30 °C por 5 dias. Foi utilizado como controle negativo a filtração de 100 mL de solução salina estéril e como controle positivo foi adicionado 300 µL de uma suspensão de 100 UFC de *Staphylococcus aureus* na placa de TCS e incubado a 35 °C por 3 dias. Após incubação, as colônias microbianas foram contadas, cada colônia é o resultado do crescimento de uma célula bacteriana ou levedura/bolor.

3.2.4.2. Teste de esterilização da formulação

1 g da FFP foi adicionado a 100 mL de MIP estéril. Esta solução foi filtrada em membrana de 0,22 µm. O filtrado estéril foi novamente filtrado em membrana de 0,22 µm. Esta membrana foi então cortada ao meio com auxílio de pinça e tesoura estéril e cada parte foi colocada em caldo de TCS ou Tioglicolato e incubados a 30 °C e 37 °C, respectivamente, por 14 dias. Os caldos foram visualizados diariamente, a presença de turbidez indica que a amostra não está estéril. Após os 14 dias de incubação, 100 UFC de *Staphyloccocus aureus* foram adicionados nas amostras que não tiveram crescimento microbiano e foram incubados por mais 3 dias.

3.2.4.3. Teste de esterilização da formulação desafiado com Pseudomonas diminuta

O experimento descrito acima foi completamente repetido, porém desta vez 10^6 UFC de *Pseudomonas diminuta* foi adicionado à FFP antes de ser diluída em MIP.

3.2.5. Determinação da capacidade da FFP complexar siRNA

Para determinar o máximo de siRNA que a FFP é capaz de complexar, diferentes concentrações de siRNA não-especifico (ns-siRNA, Integrated DNA Technologies, Belgium) (12,5 µL) foi adicionado a 12,5 µL de FFP. As misturas foram agitadas em vortex e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Em 25 µL da FFP com siRNA foi adicionado 5 µL de loading buffer 6X (Dye #R0611 - Thermo Scientific). Então, 25 µL de cada mistura foi aplicada no gel de agarose 2% contendo GelRed. A

eletroforese foi realizada a 100 V por 20 min. As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta.

3.2.6. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a FFP

A estabilidade do siRNA complexado a FFP foi avaliado por um estudo de estabilidade em soro (SHEN et al., 2011). Para tal, siRNA não-especifico (Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635), Ambion, EUA, 10 e 100 µM) foi complexado com a FFP por 30 min. Então, foi adicionado 25% de SFB (soro fetal bovino) e incubado por 24 h a 37 °C. Ao mesmo tempo, siRNA em água livre de RNAse, lipofectamina/siRNA e PEI/siRNA (0,65% de PEI em tampão tris) foram incubados com 25% de SFB a 37 °C por 24 h como controles. As amostras foram então divididas em 2 eppendorfs, uma parte foi incubada por 1 h com heparina (5000 UI/mL) e a outra com água livre de RNAse. A heparina foi utilizada para que ocorresse a descomplexação do siRNA, devido a competição polianiônica (SHEN et al., 2011). Foi utilizado 25% de heparina para descomplexar as amostras complexadas com 10 µM de siRNA e 35% de heparina para descomplexar as amostras complexadas com 100 µM de siRNA. Após este tempo, foi adicionado 25% de loading buffer às amostras. Este tampão é utilizado para conferir densidade à amostra analisada, sendo composto por: azul de bromofenol (0,25% p/v), xileno cianol FF (0,25% p/v), orange G (0,25% p/v), Tris-HCl pH 7,5 (10 mmol/L), EDTA (10 mmol/L) e sacarose (0,65%, p/v).

As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 min. Os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta. Para obtenção das imagens utilizou-se o LabImage 1D Gel Analysis Software.

3.2.7. Experimentos *in vitro* – Linhagem, cultivo celular e considerações gerais

Os experimentos *in vitro* foram realizados utilizando células tumorais humanas A431 (carcinoma epidermoide), A549 (carcinoma de pulmão), FaDu (carcinoma de células escamosas da hipofaringe), HeLa (câncer cervical), WM35 (melanoma) e MCF-7 (câncer de mama). As células WM35 e MCF-7 foram transduzidas por lentivírus carregando o vetor com o inserto (FugW-EGFP-DLC2) e expressam estavelmente a proteína DLC2 e GFP (*Green Fluorescent Protein*), por este motivo neste trabalho serão denominadas WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP. As células A431, FaDu, HeLa e MCF-7/DLC2-GFP foram cultivadas em meio de cultura

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com 1% (v/v) de antibiótico (penicilina/streptomicina, P/S)) e 10% (v/v) de SFB inativado. As células A549 foram cultivadas em meio F-12K Nut Mix com 1% de P/S e 10% de SFB e as células WM35/DLC2-GFP foram cultivadas em meio TU (78,22% de meio MCDB-153, 19,6% de meio L-15, 2% de SFB, 0,098% de insulina (5 mg/mL) e 0,082% de $CaCl_2$ 2M). Todas as células foram incubadas a 37 ºC com 5% de CO_2. As células foram subcultivadas a cada 3-4 dias, usando PBS para lavá-las e tripsina 0,5% (g/v) para desaderí-las do frasco. Após desfazer a aderência, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 3 min a 4 °C, ressuspendidas no meio de cultivo e, para contagem de células foi utilizado a câmara de Neubauer.

3.2.8. Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade da FFP foi avaliada por CellTiter 96 Aqueous MTS Reagent (Promega Corporation, USA), que é formado por uma solução de tetrazolium (MTS) e metosulfato de fenazina, em diferentes linhagens celulares (A431, HeLa, A549 e FaDu). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (A431: $1,5x10^4$ células/poço, HeLa: $3,75 x10^4$ células/poço, A549: $5x10^4$ células/poço e FaDu: $7,5x10^4$ células/poço) e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 por 24 h. Após 24 h, o meio foi substituído por um novo e a FFP contendo ou não siRNA foi adicionada. As células foram incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 por 48 h. Após 48 h de tratamento, 100 µL da solução de MTS foi adicionada em cada poço. A placa foi incubada por 3 h a 37 ºC e 5% de CO_2. 100 µL de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi determinada a 490 nm em leitor de placa de Elisa (SpectraMax M2). Como controle foi utilizado 500 µL de meio + 100 µL de solução de MTS. A viabilidade celular foi calculada normalizando a absorbância das amostras a 490 nm com a absorbância do controle.

A citotoxicidade da FFP nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foram avaliadas pelo método da reação de redução da resazurina. As células foram incubadas e tratadas como descrito acima, sendo que $4x10^4$ células/poço foram plaqueadas. Após 48 h de tratamento, 12,5 µL da solução de resazurina (700 µM) foi adicionada em cada poço. Como controle foi utilizado 500 µL de meio + 12,5 µL de solução de resazurina. 100 µL de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a fluorescência foi determinada (Excitação: 530/25, Emissão: 590/35) em

leitor de placa Synergy 2. A viabilidade celular foi calculada normalizando a fluorescência das amostras com a do controle.

Também foi avaliado a viabilidade celular das células tratadas com PEI em tampão tris, que será utilizado como controle nos experimentos *in vitro*.

3.2.9. Avaliação da internalização celular do siRNA liberado do G-FFP por medida da fluorescência em lisado celular e microscopia confocal em células HeLa, FaDu, A549, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP

Os estudos de internalização celular do siRNA veiculado pela FFP foram realizados utilizando Alexa488 siRNA nas células HeLa, FaDu e A549 e, Alexa647 siRNA nas células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP. Como controles foram utilizados lipofectamina e 0,65% de PEI em tampão tris complexados ao siRNA.

A medida da fluorescência em lisados celulares foi realizado seguindo o método proposto por Vader et al. (2010) (VADER et al., 2010). Células A549, FaDu, Hela, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foram plaqueadas em placas de 6 poços a densidade de $2x10^5$, $3x10^5$, $1,5x10^5$, $1x10^5$, $2\ x10^5$ e $2x10^5$ células/poço, respectivamente, em 2 mL de meio com 10% de SFB e 1% P/S e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 por 24 h, com exceção da célula WM35/DLC2-GFP que foi incubado com meio contendo 2% de SFB. Após 24 h, o meio foi substituído por outro sem SFB e P/S e, foi adicionado FFP, lipofectamina ou PEI em tampão tris complexados a 50 ou 200 pmol Alexa488 ou 647 siRNA/$1x10^5$ células. As células foram incubadas por 48 h a 37 ºC e 5% de CO_2. Após as primeiras 24 h, 200 µL de SFB foi adicionado. Após o tratamento de 48 h, as células foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas no gelo por 30 min com 400 µL de tampão de lise (1% de Triton X-100, 2% SDS em PBS). O lisado celular foi transferido para eppendorfs e centifugado a 14000 g, 4 ºC por 15 min. Então, 200 µL do sobrenadante foi transferido para uma placa preta de 96 poços para medida da fluorescência no SpectraMax M2 (Alexa 488 siRNA) ou no EnSpire® Multimode Plate Reader (Alexa 647 siRNA). 50 µL do sobrenadante foi usado para determinar o conteúdo de proteína usando o Micro BCA™ Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Para determinação da intensidade média da fluorescência (IMF), a fluorescência determinada na medida da fluorescência foi corrigida pela quantidade de proteína em cada amostra. De acordo com o preconizado pelo método proposto por Vader et al. (2010), antes da realização deste experimento, avaliamos se 2% de SDS é capaz de promover a

descomplexação do siRNA da FFP. Para tal, siRNA foi complexado a FFP ou 0,65% de PEI em tampão tris por 30 min, depois foi adicionado 2% de SDS e as amostras foram incubadas a 37 ºC por 1 h. Então, foi realizado eletroforese em gel de agarose 2% com gel red por 60 min, 80 V.

Para avaliação da internalização celular do siRNA por microscopia confocal, células A549, FaDu, HeLa, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foram plaqueadas em placa de 24 poços ($5x10^4$, $7,5x10^4$, $3,75x10^4$, $2,5x10^4$, $5x10^4$ e $5x10^4$ células/poço, respectivamente) em 500 µL de meio com 10% SFB e 1% de P/S, e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 por 24 h, com exceção da célula WM35/DLC2-GFP que foram incubadas com meio com 2% de SFB. Antes de plaquear as células, lamínulas foram adicionadas em cada poço. Após 24 h, o meio foi substituído por outro sem SFB e P/S e, foi adicionado FFP complexada a 50 ou 200 pmol Alexa488 ou 647 siRNA/$1x10^5$ células ou os controles (lipofectamina e PEI em tampão tris). As células tratadas com o complexo foram incubadas por 4 ou 48 h a 37 ºC e 5% de CO_2. Após as primeiras 24 h, 50 µL de SFB foi adicionado. O meio foi retirado e as células lavadas rapidamente com PBS. Então, foi adicionado 1% de paraformaldeído em cada poço e a placa foi armazenada a 4 ºC *overnight*. Os poços foram lavados com PBS e lamínulas e as lâminas foram montadas usando Prolong Gold que contêm DAPI para coloração do núcleo de azul. As lâminas foram armazenadas no escuro para secar e então, foram avaliadas no Microscópio Confocal (células tratadas com Alexa 488 siRNA no Zeiss LSM 700 e as células tratadas com Alexa 647 siRNA no Leica TCS SP8).

A internalização celular do Alexa 647 siRNA nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP também foi avaliada por time-lapse no equipamento BioStation IM-Q da Nikon. As células foram plaqueadas em placa de cultura dividida em quatro segmentos (Greiner), cada parte foi plaqueada com $5x10^4$ células em 750 µL de meio com 10 % SFB (células MCF-7/DLC2-GFP) e meio com 2% de SFB (células WM35/DLC2-GFP), e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 por 24 h. Após 24 h, as células foram incubadas com 10 mg/mL de Hoescht por 15 min para coloração do núcleo, então, o meio foi substituído por outro e foi adicionado FFP complexada a 200 pmol Alexa647 siRNA/$1x10^5$ células ou os controles (lipofectamina e PEI em tampão tris). As placas foram colocadas no BioStation em ambiente controlado (37 ºC e 5% de CO_2) por 48 h. Após 1 h de tratamento, iniciou-se a aquisição das imagens, que registraram imagens a cada 20 min por 48 h.

3.2.10. Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HeLa, FaDu e A549 pelo siLuc liberado do G-FFP

A eficiência de silenciamento *in vitro* do siRNA veiculado pelo gel obtido a partir da FFP foi investigado usando células HeLa, FaDu e A549 e ensaio duplo de luciferase (Luciferase Reporter Assay System) (Promega, Holanda). Primeiro, $2x10^6$ células foram semeadas em garrafas de 25 cm^2 com meio sem antibiótico por 24 h. Então, estas células foram transfectadas com vetores para Firefly luciferase (pCMV-Luc) (PlasmidFactory, Alemanha) e Renilla luciferase (pGL4.74 [hRluc/TK]) (Promega, Holanda) por 24 h complexados a lipofectamina. Então, as células HeLa, A549 e FaDu foram lavadas com PBS, tripsinizadas e plaqueadas em placa de 24 poços na densidade de $3.75x10^4$, $5x10^4$ e $7,5x10^4$ células/poço, respectivamente. Após 24 h, o meio foi substituído por um novo sem antibiótico e as células foram tratadas com Lipofectamina 2000 ou 0,65% de PEI em tampão tris complexados a 100 pmol de Firefly luciferase siRNA (siLuc)/$1x10^5$ células ou ns-siRNA (controles). As células também foram tratadas com FFP complexada com 400 pmol siLuc/$1x10^5$ células ou ns-siRNA. As células foram incubadas por 48 h a 37 ºC e 5 % de CO_2. Então, as células foram lisadas com Passive Lysis Buffer (Promega) (200 µL/poço) numa plataforma de agitação de placas por 45 min e armazenada a -20 ºC até a análise. A placa foi descongelada e 10 µL foi transferido para uma placa branca de 96 poços. Um ensaio duplo de luciferase foi realizado pela adição de 50 µL de reagente de Luciferase às amostras na placa. A luminescência foi imediatamente medida em um leitor de placas com mistura inicial por 2 s seguido da medida da luminescência por 5 s em intervalos de 0.5 s. Subsequente, 50 µL do reagente Stop&Glo foi adicionado em cada amostra e a luminescência foi medida. Para calcular a eficiência de silenciamento, a luminescência da Firefly luciferase foi normalizada pela luminescência da Renilla luciferase pela formula: AUC-5s Luminescência da Firefly / AUC-5s Luminescência da Renilla.

3.2.11. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR em células FaDu, A549, HeLa e A431 pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP

Os estudos de silenciamento *in vitro* de EGFR foram investigados nas células FaDu, A549, HeLa e A431 por Western Blotting (WB). As células foram plaqueadas em placas de 12 poços com 1,0 mL de meio por 24 h e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2. As densidades de células/poço estão descritas nos resultados. Também está

descrito nos resultados a composição do meio, a concentração de EGFR siRNA (sc-29301, Santa Cruz Biotechnology, INC., EUA) e o tempo de tratamento com a FFP e os controles, uma vez que experimentos com diferentes parâmetros foram realizados. Após as 24 h, o meio foi substituído por um novo e as células foram tratadas com FFP ou os controles (Lipofectamina 2000 ou 0,65% de PEI em tampão tris) complexados ao EGFR siRNA ou ns-siRNA e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2. As células foram então lavadas com PBS e lisadas usando o tampão de lise (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail/Ripa Buffer), após 10 min de incubação com o tampão de lise em gelo, as células foram removidas usando "scraper celular". O lisado foi transferido para eppendorf, agitado em vortex e centrifugado por 15 min, 14.000 g e 4 ºC. O sobrenadante foi armazenado a – 20 ºC até o uso. A quantidade de proteína total do lisado celular foi determinada usando Micro BCA™ Protein Assay. 10 µg de proteína total foi adicionada em cada poço do gel de acrilamida 12%. A eletroforese foi realizada a 100 V por 15 min, seguido de 125 V por 60 min. Subsequentemente, as proteínas foram electro-transferidas para a membrana PVDF Immobilon FL a 125 V por 60 min. Proteínas não-especificas foram bloqueadas da membrana usando 5 mL de Odyssey Blocking Buffer por 2 h a temperatura ambiente com constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h a temperatura ambiente, agitação constante, com anticorpo primário *EGF receptor (D38B1) XP(R) rabbit mAB* ou *beta-Actin Antibody (8H10D10) mouse mAB* na diluição de 1:1000 em *Antibody Incubation buffer odyssey* (50 % Dilute odissey blocking buffer + 50 % TBS-Tween). Finalmente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário *Alexa Fluor 680 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2 mg/mL* ou *Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/mL* na diluição de 1:7500 em Blocking Buffer (5% w/v BSA em 1x TBS). Para visualização da fluorescência, Odyssey Infrared Imager (LI-COR® Biosciences, EUA) foi usado. A intensidade das bandas foi quantificada pelo NIH ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

3.2.12. Avaliação de eficiência de silenciamento de EGFR pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP combinado com a Internalização Fotoquímica (IFQ) em células A549

Para realizar este experimento, células foram plaqueadas em placas de 12 poços com 1,0 mL de meio contendo 10% de SFB e 1% P/S e cultivadas a 37 ºC, 5% de CO_2 por 24 h. Após 24 h, o meio foi removido e foi adicionado 800 µL de solução

do fotosensibilizador (FS, preparada partindo de uma solução estoque de 6200 µg/mL de FS em DMSO em meio de cultura com 10% de SFB). Nesta pesquisa, $(MEA)_2$TTPS2a (Di(monoetanolamina)mesotetrafenil porfirina disulfonato (a=adjacente) (PCI Biotech AS, Noruega) foi utilizado como FS. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada *overnight* na estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. A solução do FS foi removida e foi adicionado meio sem antibiótico. Então, as células foram tratadas com EGFR siRNA ou ns-siRNA complexado a Lipofectamina, 0,65% de PEI em tampão tris ou FFP por 48 h. Após 48 h de incubação, o meio foi removido e substituído por meio com 10% SFB e 1% P/S. A placa foi então, iluminada no LumiSource® (375–450 nm, com irradiação de 13 mW/cm^2, PCI Biotech AS, Noruega) por 60 ou 75 s. Após iluminação, as células foram incubadas novamente por mais 48 h. Finalmente, as células foram lisadas e WB foi realizado para avaliar a expressão do EGFR como descrito acima (3.2.11).

Tabela 1. Condições experimentais do tratamento das células A549 com EGFR siRNA combinado a IFQ.

Parâmetros	Condições experimentais
Número de células plaqueadas	7,5x10^4 células/poço
Meio de cultura	F-12K Nut Mix + 10% SFB
Concentração de siRNA complexado com FFP	200 pmol/1x10^5 células
Tempo de tratamento	48 h
Concentração da solução de FS	0,5, 0,8, 1,2 e 1,6 µg/mL
Tempo de exposição a luz	60 e 75 s

3.2.13. Estudos *in vivo*

A indução do carcinoma de células escamosas foi realizada em camundongo NU/NU mude Crl:NU-Foxn1nu, homozigoto. Camundongos foram mantidos em caixas com filtros sob condições padrões (25 °C, 50% humidade relativa, 12 h ciclo claro/escuro), água e alimentação foram fornecidas *ad libitum*. O tumor subcutâneo foi induzido pela inoculação 10^6 células da linhagem A431 (1x10^6 células em 100 µL de PBS gelado) no dorso direito dos camundongos. Tumores foram medidos usando um paquímetro digital e quando atingiram aproximadamente 100-150 mm^3, os camundongos foram incluídos no estudo (OLIVEIRA et al., 2010).

Os estudos *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Utrecht (Dierexperimentencommissie Utrecht), número 2014.III.04.037.

3.2.14. Avaliação da formação do gel intratumoral

Camundongos com tumores medindo 100-150 mm^3 foram tratados com injeção intratumoral de FFP (12,5 µL) ou FFP contendo EGFR siRNA (25 uL: 12,5 µL FFP + 12,5 µL siRNA contendo 2,5 mg de EGFR siRNA (Ref# 67191424, Integrated DNA Technologies (IDT), Leuven, Bélgica), incubados por 30 min antes da injeção. Os camundongos foram sacrificados em tempos pré-estabelecidos (24 h, 7 e 14 dias) ou quando atingiram o *Human Endpoint*. Assim, tivemos 6 grupos com 7 animais cada. Após o sacrifício dos animais, os tumores foram retirados e congelados em nitrogênio líquido. Os tumores foram armazenados a – 80 ºC até serem utilizados. Foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura em criostato (Microm HM560). Os cortes foram dispostos em lâminas e corados com hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas foram observadas ao microscópio Axio–Zeizz e as imagens foram obtidas usando o programa ZEN lite 202.

3.2.15. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Western Blotting

Para extração da proteína EGFR, aproximadamente 200 mg de tumor foi diluído em 1 mL de Halt Protease/Ripa Buffer e colocado em tubo “Tissue homogenizing CKMix” e então homogeneizado no Precellys®24-Dual (3x20 s, 5500 rpm). O tubo com o homogenato foi então centrifugado (14.000 g, 4 °C, 15 min) para remoção do tecido residual. A quantidade de proteína total foi determinada usando Micro BCA™ Protein Assay e as amostras para o Western Blotting foram preparadas com 10 µg de proteína total. O Western Blotting foi realizado como descrito acima (item 3.2.11).

3.2.16. Análise da expressão de EGFR RNAm nos tumores por RT-PCR

Para extração do RNAm que codifica a proteína EGFR dos tumores, aproximadamente 50 mg do tumor foi diluído em 0,5 mL de reagente TRIzol e colocado em tubo “Tissue homogenizing CKMix” e então homogeneizado no Precellys®24-Dual (3x20 s, 6000 rpm). O tubo com o homogenato foi então centrifugado (14.000 g, 4 °C, 15 min) para remoção do tecido residual. A quantidade de RNA foi medida no NanoVue Plus e diluída para obter 1 µg de RNA. O RNA foi convertido em DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa no GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), realizado nas seguintes condições: extensão dos primers (25 °C por 10 min), transcrição reversa (42 °C por 15 min), desnaturação (99 °C por 5 min) e resfriamento (5 °C por 5 min). Em seguida, foi feita a amplificação do cDNA por PCR

usando o TaqMan Universal Master Mix II. 19 µL do premix preparado a partir do Kit foi adicionado na placa de reação MicroAmp Optical 96-well e foi adicionado então, 1 µL da amostra. A placa foi centrifugada rapidamente. O RT-PCR foi realizado nas seguintes condições usando o Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System: incubação com a enzima uracil-N-glicosilase (50 °C por 2 min), ativação da polimerase (95 °C por 10 min), desnaturação (95 °C por 15 s), anelação/extensão (60 °C por 1 min). Foi realizado uma quantificação relativa do RNAm usando β-actina como controle.

3.2.17. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Imunohistoquímica (IHQ)

Para análise por imunohistoquímica, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura em criostato (Microm HM560) dos tumores. Os cortes foram dispostos em lâminas e congelados. Antes de iniciar o processo de fixação dos cortes e marcação, as lâminas congeladas foram deixadas *overnight* a temperatura ambiente para secarem. Os cortes foram fixados em acetona por 10 min e então secados ao ar frio. Foi feito um círculo em volta de cada corte usando uma *PAP Pen* e seco por 10 min. Os cortes foram lavados 2 vezes com TBS-Tween por 2 min. Em seguida, foram bloqueados usando soro normal de cabra (1:20) durante 45 min à temperatura ambiente. As lâminas foram então mergulhadas em TBS. Os cortes foram então incubados com o primeiro anticorpo (100 µL de rabbit *α*-EGFR (Cell Signaling; #4267) diluído 100 vezes em PBS com 5% de soro fetal de vitelo) a temperatura ambiente em um ambiente úmido por 45 min. A solução com primeiro anticorpo foi aspirada seguido de três lavagens com TBS-Tween por 5 min. Para evitar coloração inespecífica por peroxidase endógena, os cortes foram incubados com 175 µL H_2O_2 (30%) + 70 mL PBS por 20 min, seguido de 3 lavagens com PBS por 2 min cada. Os cortes foram então incubados com o segundo anticorpo (100 µL de goat *α*-rabbit-HRP (Dako) diluído 100 vezes em PBS com 5% de soro fetal de vitelo e 2% de soro normal de rato) a temperatura ambiente em um ambiente úmido por 45 min. A solução com o segundo anticorpo foi aspirada seguido de três lavagens com TBS-Tween por 5 min. Em seguida, os cortes foram então incubados com o terceiro anticorpo (100 µL de rabbit *α*-goat-HRP (Dako) diluído 100 vezes em PBS com 5% de soro fetal de vitelo e 2% de soro normal de rato) a temperatura ambiente em um ambiente úmido por 30 min. A solução com o terceiro anticorpo foi aspirada seguido de três lavagens com TBS-Tween por 5 min. Os cortes foram então incubados com cromogênio (solução de

3-amino-9-etilcarbazole (AEC)) para o desenvolvimento da coloração imuno-histoquímica por 5 min. Os cortes foram lavados 2 vezes com água deionizada por 5 min, corados com hematoxilina por 3 min e novamente lavados 3 vezes com água de torneira por 3 min. As lâminas foram montadas com Glicerol de Kaiser em gelatina. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico modelo Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Alemanha). Esta análise foi realizada com animais sacrificados 24 h e 7 dias após tratamento com FFP e FFP + siRNA.

3.2.18. Avaliação *in vivo* da redução do tumor

Os tumores foram medidos durante todo o estudo (antes e após a injeção da FFP contendo ou não EGFR siRNA) usando um paquímetro digital, porém as análises estatísticas da diferença do tamanho dos tumores entre os grupos foram realizadas com tumores de até 7 dias após o tratamento, porque após 7 dias não obtivemos um “n” suficiente para a realização das estatísticas devido muitos animais terem atingido o *Human Endpoint* antes de 14 dias. A diferença do tamanho dos tumores dos grupos foi avaliada por t-test e os valores extremos foram excluídos de acordo com Thompson Tau Test.

3.2.19. Estatística

Diferenças significativas entre dois grupos foram analisadas usando t-test. Comparação entre mais de dois grupos foram feitas usando one-way ANOVA com teste Tukey post-hoc. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e caracterização da FFP e do gel formado em excesso de água

A combinação adequada de MO, PEI, PG e tampão tris permitiu a obtenção de sistemas fluidos que em contato com excesso de água formam gel líquido cristalino. Os géis obtidos em excesso de água foram caracterizados por microscopia de luz polarizada e SAXS (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015).

A FFP composta por MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p) foi a formulação de trabalho escolhida para esta pesquisa. O G-FFP contendo ou não siRNA na concentração final de 10 e 100 µM foi caracterizada como fase hexagonal por microscopia de luz polarizada (Figura 10A) e como uma mistura de fase cúbica e hexagonal por SAXS (Figura 10B e Tabela 2). A presença de siRNA não alterou a fase liquido cristalina obtida, porém promoveu um aumento no parâmetro de rede como observado na Tabela 2.

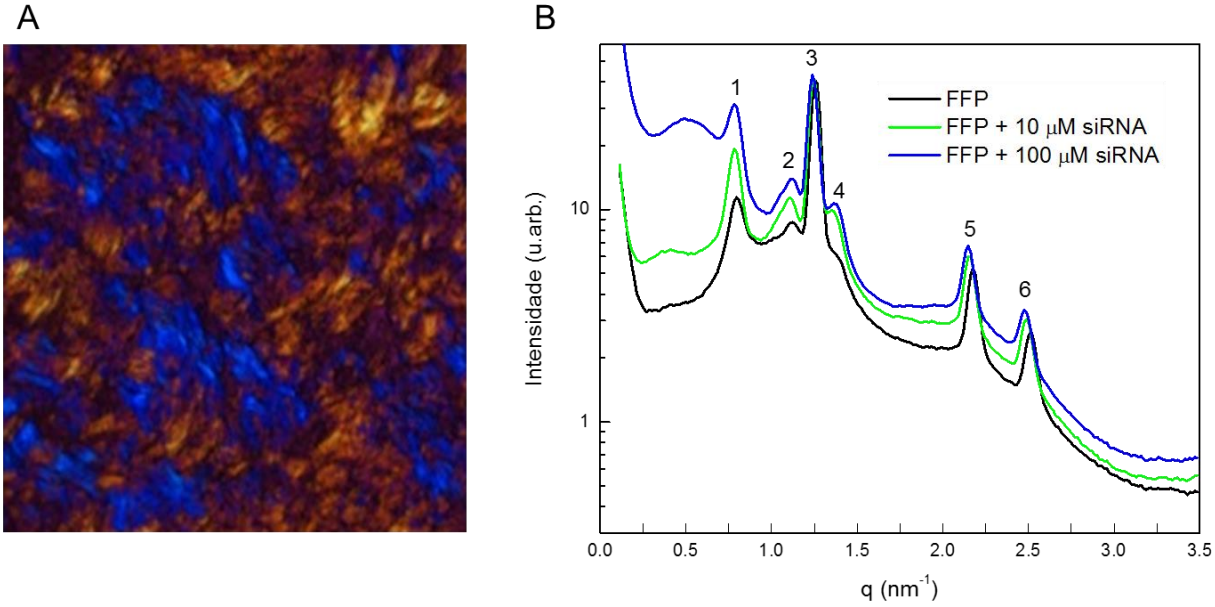

Figura 10. (A) Fotomicrografia por microscopia de luz polarizada do gel obtido a partir da FFP (G-FFP). Aumento 200x. (B) SAXS do G-FFP com e sem siRNA**.** FFP: MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p). G-FFP: Gel formado em excesso de água a partir da FFP.

Tabela 2. Vetor de espalhamento, distâncias interplanares, estruturas líquido cristalinas e parâmetros de rede determinados por SAXS dos géis obtidos a partir da FFP (MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p)) sem e com a adição de 10 e 100 µM de siRNA.

Amostra	Pico	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Estrutura	Média do parâmetro de rede (nm)
G-FFP	1	0,7966	7,8875	1:1	Cúbica D	a_c = 7,894 ± 0,012 a_H = 5,778 ± 0,016
	2	1,1237	5,5915	1/√2	Cúbica D	
	3	1,2517	5,0197	1:1	Hexagonal	
	4	1,3798	4,5537	1/√3	Cúbica D	
	5	2,1761	2,8874	1/√3	Hexagonal	
	6	2,5174	2,4959	1/√4	Hexagonal	
G-FFP + 10 µM siRNA	1	0,7824	8,0307	1:1	Cúbica D	a_c = 8,031 ± 0,022 a_H = 5,813 ± 0,017
	2	1,1095	5,6631	1/√2	Cúbica D	
	3	1,2517	5,0197	1:1	Hexagonal	
	4	1,3513	4,6497	1/√3	Cúbica D	
	5	2,1619	2,9063	1/√3	Hexagonal	
	6	2,4890	2,5244	1/√4	Hexagonal	
G-FFP + 100 µM siRNA	1	0,7824	8,0307	1:1	Cúbica D	a_c = 8,003 ± 0,031 a_H = 5,859 ± 0,007
	2	1,1095	5,6631	1/√2	Cúbica D	
	3	1,2375	5,0773	1:1	Hexagonal	
	4	1,3655	4,6014	1/√3	Cúbica D	
	5	2,1477	2,9255	1/√3	Hexagonal	
	6	2,4747	2,5390	1/√4	Hexagonal	

G-FFP: gel obtido a partir da FFP (MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p)); a_c: média do parâmetro de rede da estrutura cúbica; a_H: média do parâmetro de rede da estrutura hexagonal.

4.2. Avaliação do perfil de liberação do siRNA *in vitro*

O estudo de liberação do siRNA (10 µM) complexado a FFP mostrou que houve uma liberação sustentada do siRNA (Figura 11A). Como esperado, o controle (água DEPC) liberou todo o siRNA em 24 h (98%) e alcançou 100% de siRNA em 48 h. A formulação liberou 25% do siRNA em 24 h e alcançou 40 e 44% do siRNA liberado após 48 h e 7 dias, respectivamente. Este estudo também mostra que o siRNA foi liberado complexado ao PEI porque somente na presença de heparina (agente descomplexante), o siRNA foi visualizado (Figura 11B) (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015).

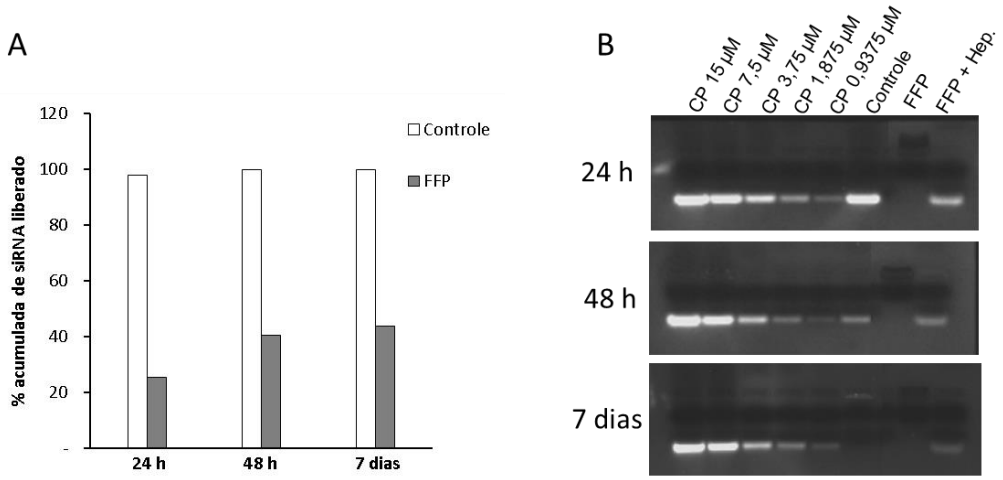

Figura 11. (A) Gráfico da liberação do siRNA a partir do gel obtido da FFP e do controle. (B) Eletroforese das amostras obtidas no estudo de liberação e da curva-padrão (siRNA em água livre de RNAse em diferentes concentrações). Controle: siRNA em água livre de RNAse (10 µM). FFP: FFP + siRNA (10 µM). Hep: Heparina. CP: curva-padrão. Adaptado de (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015). Copyright (2015), com permissão de Elsevier.

4.3. Determinação do processo de esterilização da FFP

Para determinar o processo de esterilização, a primeira etapa foi determinar a presença de microrganismos nas matérias-primas e FFP.

Para determinar a presença de microrganismos, de acordo com o preconizado pela USP XXXIII, a amostra deve ser diluída. Para tal foi avaliado três diluentes e os resultados encontrados estão abaixo na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados do teste de diluição de 1 g das matérias-primas e FFP em 100 mL de diluente.

Matéria-prima (1 g)	Diluente (100 mL)	Sistema obtido com a diluição	Sistema obtido após solução ser lavada com água peptonada
MO	Salina	Gel + água	-
MO	PG	Solução	Gel + água
MO	MIP	Solução	Gotículas óleo em água
FFP	Salina	Gel + água	-
FFP	PG	Solução	Gotículas óleo em água
FFP	MIP	Solução	Gotículas óleo em água

Diante destes resultados, foi selecionado o MIP como diluente das amostras. Após a escolha do diluente, foi verificado se o mesmo não inibe o crescimento de microrganismos. Os resultados mostraram que os *Staphylococcus aureus* adicionados ao MIP cresceram nas placas, provando que o MIP não inibe o crescimento de microrganismos.

A qualidade microbiana das matérias-primas e FFP foi avaliada e os resultados mostraram que os mesmos apresentam baixa quantidade de microrganismo (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da qualidade microbiana das matérias-primas e FFP.

Amostra	Número de UFC	Tipo de microrganismo
Placas de PDA		
Solução salina estéril (controle negativo)	Ausência	-
1 g de tampão tris em 100 mL de MIP	Ausência	-
1 g de PG em 100 mL de MIP	3	Fungo
1 g de MO em 100 mL de MIP	2	Fungo
1 g de FFP em 100 mL de MIP	1	Fungo
Placas de TCS		
Solução salina estéril (controle negativo)	Ausência	-
Solução salina com 100 UFC de *Staphyloccocus aureus* (controle positivo)	102	Bactéria
1 g de tampão tris em 100 mL de MIP	Ausência	-
1 g de PG em 100 mL de MIP	Ausência	-
1 g de MO em 100 mL de MIP	4	-
1 g de FFP em 100 mL de MIP	Ausência	-

O processo de esterilização mostrou que a filtração asséptica em membrana de 0,22 µm é efetiva para esterilizar a formulação desenvolvida, uma vez que, após 14 dias não se observou turvação dos caldos. Pode-se afirmar que a ausência de crescimento microbiano foi devido à esterilização adequada e não devido a fatores que inibiram o crescimento dos microrganismos, porque observou-se a turvação dos caldos após 3 dias de adição do *Staphyloccocus aureus*. A esterilização por filtração em membrana 0,22 µm também foi eficiente quando a FFP foi desafiada com *Pseudomonas diminuta*, microrganismo indicado pela USP XXXIII para a realização deste desafio.

Após a filtração em membrana de 0, 22 µm a FFP foi capaz de se geleificar, não alterando as propriedades do sistema.

4.4. Determinação da capacidade da FFP complexar siRNA

A capacidade da FFP complexar siRNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose adicionando-se siRNA à FFP até a concentração de 60 mM. Como observado na Figura 12, a FFP foi capaz de complexar até 15 mM de siRNA.

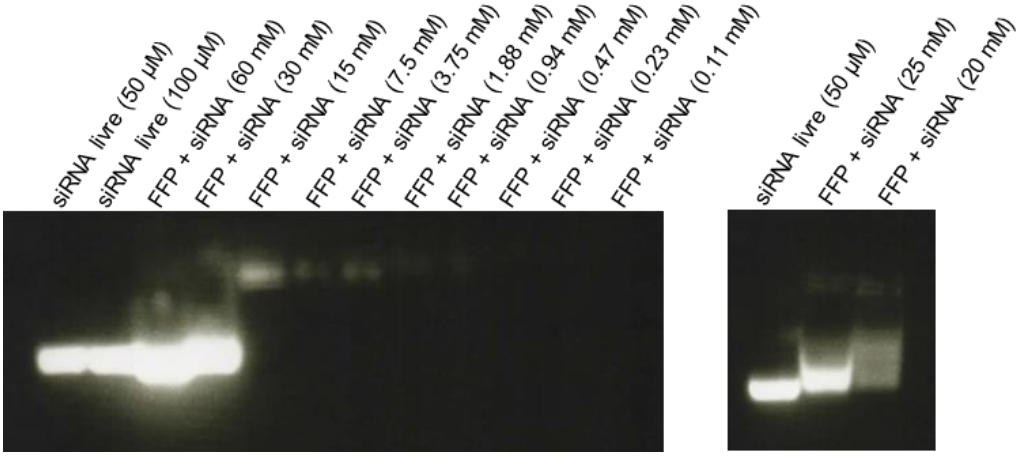

Figura 12. Capacidade da FFP complexar siRNA. Eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, 20 min.

4.5. Avaliação da estabilidade do siRNA complexado a FFP

A habilidade da FFP complexar e aumentar a estabilidade do siRNA foi avaliada em um ensaio utilizando 25% de SFB por 24 h, seguido de descomplexação com heparina. Como se pode observar na Figura 13, 25% de SFB degradou completamente 10 µM de siRNA livre em água e cerca de 70% do siRNA 100 µM (intensidade da banca calculada por ImageJ). Pela análise das amostras sem a presença de heparina, pode-se concluir que o PEI, a lipofectamina e a FFP foram capazes de complexar ambas concentrações de siRNA. Já a análise das amostras incubadas com heparina mostra que todos os agentes complexantes (PEI, lipofectamina e FFP) foram capazes de proteger, pelo menos uma alta porcentagem, o siRNA da degradação por SFB. O PEI e a FFP foram ligeiramente mais eficientes do que a lipofectamina em estabilizar o siRNA na presença de SFB. Na concentração de 100 µM foi aplicado um volume quatro vezes menor de siRNA/lipofectamina comparado as outras amostras, portanto, justifica a visualização de uma banda mais fraca. Pela análise da intensidade da banda (ImageJ), a concentração corrigida de siRNA encontrada na amostra siRNA/Lipofectamia/SFB/Heparina (100 µM) é similar a concentração da amostra de siRNA/PEI/SFB/Heparina.

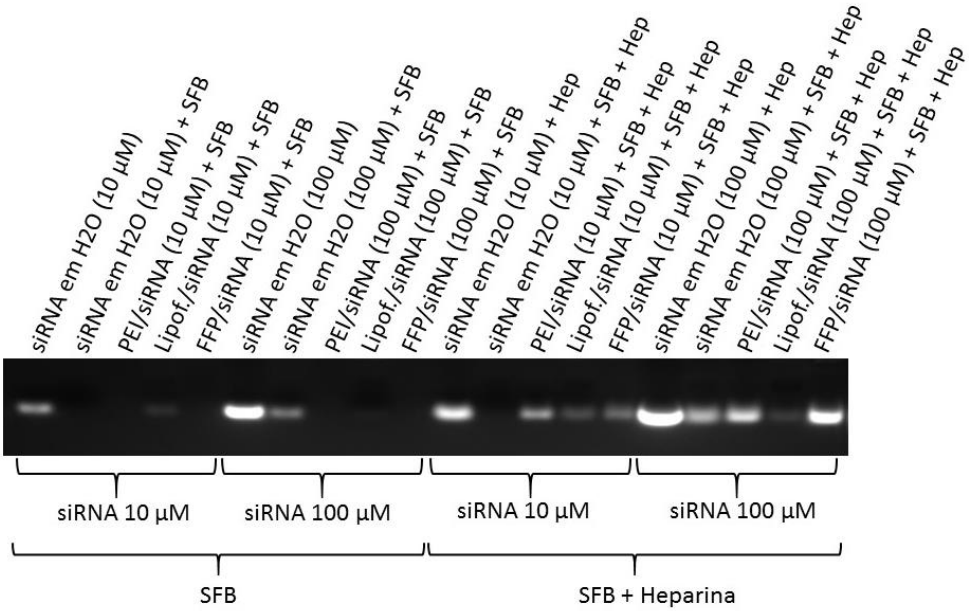

Figura 13: Avaliação da estabilidade do siRNA (10 e 100 µM) livre em água, complexado ao PEI, lipofectamina e FFP na presença de SFB (25%). Eletroforese em gel de agarose 2%, 100 V, 20 min.

4.6. Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade da FFP nas células A431, FaDu, A549 e HeLa foi avaliada por MTS. Nas células A431, diferentes volumes de FFP foram adicionados em cada poço, como controle foram usadas células não-tratadas. Como observado na Figura 14A, todos os volumes de FFP adicionados nas células foram muito tóxicos. Então, avaliamos a adição de volumes menores de FFP bem como a citotoxicidade de FFP complexada ao siRNA (0,25 pM) (Figura 14B).

A viabilidade celular das células tratadas com 0,25 µL de FFP complexada ao siRNA foi estatisticamente igual as células não tratadas. A viabilidade das células tratadas com 0,25 µL de PFF foi de 94% e 80% quando a FFP estava complexada ou não com siRNA, respectivamente. As células tratadas com 0,5 µL de FFP contendo ou não siRNA apresentaram viabilidade celular de 82% e 70%, e as tratadas com 1,0 µL ficaram 60 e 38% viáveis, respectivamente.

A viabilidade celular foi avaliada da mesma forma em células FaDu, A549 e HeLa e apresentaram resultados similares.

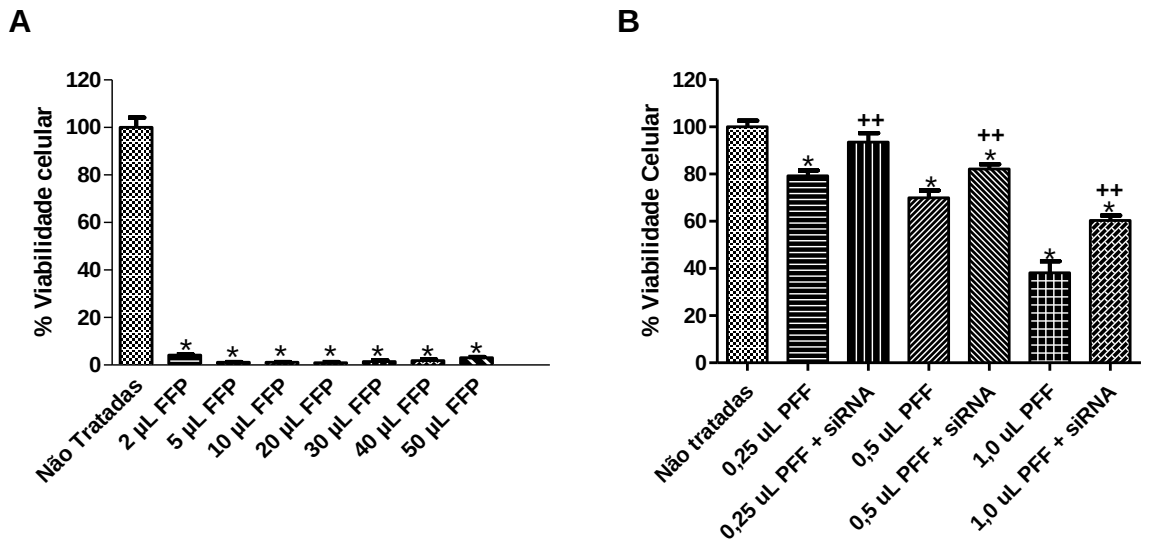

Figura 14. (A) Viabilidade celular das células A431 tratadas com FFP (2 – 50 µL) (n=6) e (B) Viabilidade celular das células A431 tratadas com FFP (0,25 – 1,00 µL) e FFP complexada ao siRNA 0,25 pM (n=9). * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas. $^{++}$ $p < 0,05$ comparado as células tratadas com FFP sem siRNA.

A avaliação da viabilidade celular das células A431 tratadas com PEI em tampão tris também foi realizada. Na concentração de 0,0004% a viabilidade celular foi de 60%. A viabilidade celular foi dependente da concentração de PEI, tendo uma relação inversa (Figura 15).

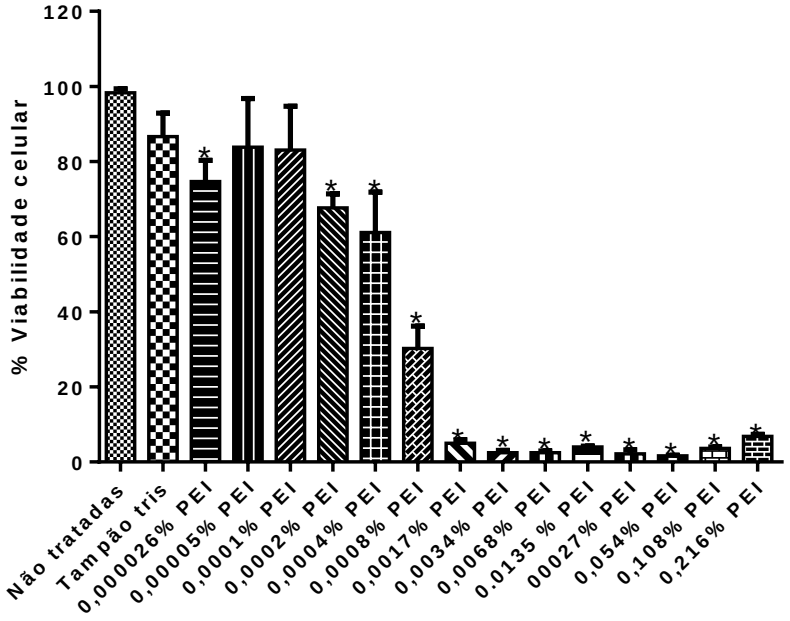

Figura 15. Viabilidade celular das células A431 tratadas com diferentes porcentagens de PEI em tampão tris (n=4). * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas.

A citotoxicidade da FFP e do PEI em tampão tris nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foi avaliada por ensaio de resazurina. A viabilidade celular das células WM35/DLC2-GFP foi menor do que 50% quando as células foram tratadas por 48 h com 0,5 e 1,0 µL de FFP e PEI em tampão tris. Já as celulas tratadas com 0,15 e 0,25 µL de FFP e PEI em tampão tris apresentaram viabilidade celular semelhante a das células não tratadas. A presença de siRNA também não alterou a viabilidade das células tratadas com estes volumes de FFP ou PEI (Figura 16).

Nas células MCF-7/DLC2-GFP foram avaliadas as mesmas condições e os resultados encontrados foram semelhantes aos da célula WM35/DLC2-GFP.

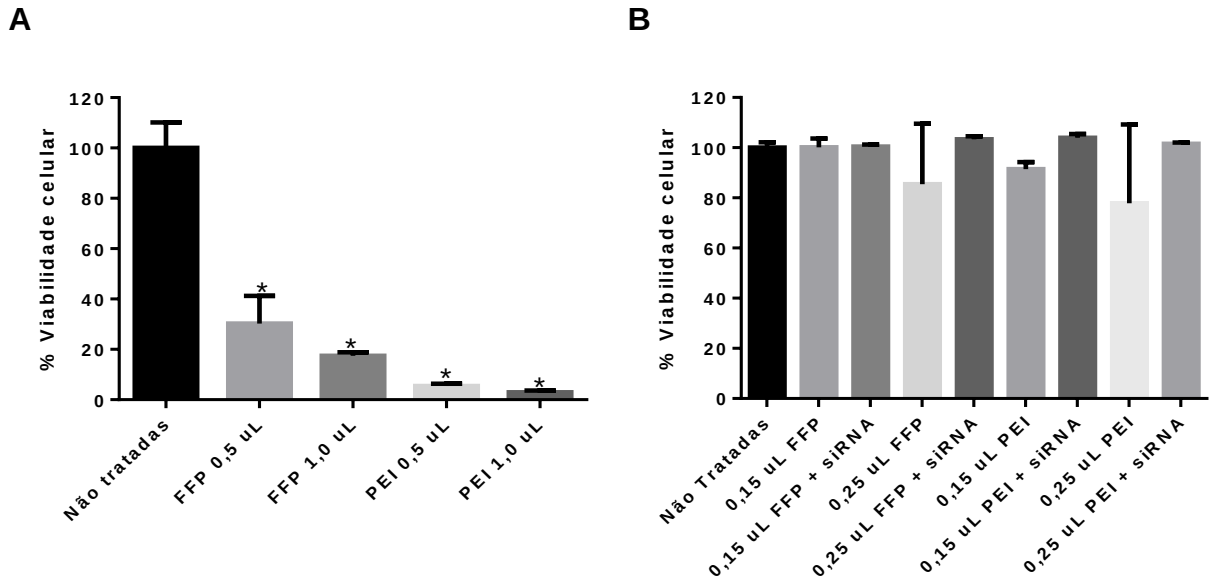

Figura 16. (A) Viabilidade celular das células WM35/DLC2-GFP tratadas com FFP e 0,65% de PEI em Tampão Tris (0,5 e 1,0 µL) e (B) Viabilidade celular das células WM35/DLC2-GFP tratadas com FFP e 0,65% de PEI em Tampão Tris (0,15 e 0,25 µL) e FFP e PEI em tampão tris complexada ao siRNA 20 µM. * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas.

4.7. Avaliação da internalização celular do siRNA liberado do G-FFP por medida da fluorescência em lisado celular e microscopia confocal em células HeLa, FaDu, A549, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP

A internalização celular do siRNA liberado do G-FFP em células HeLa, FaDu, A549, A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foi determinada por medida da fluorescência em lisado celular e por microscopia confocal.

A medida da fluorescência no lisado celular foi realizada após 48 h de tratamento. Antes deste ensaio, foi avaliada por eletroforese a capacidade do SDS

2% em promover a descomplexação do siRNA-PEI e siRNA-FFP, como indicado pelo método de Vader et al. (VADER et al., 2010).

Na Figura 17, estão os gráficos da intensidade média da fluorescência (IMF) das células HeLa, FaDu e A549 determinada pela medida da fluorescência em lisados celulares usando o Alexa488 siRNA complexado com lipofectamina, PEI e FFP. Esta IMF foi calculada normalizando o valor da fluorescência de cada amostra pelo conteúdo de proteína da amostra. Como se pode observar nos gráficos, quase não houve quantificação de fluorescência nas células não-tratadas, nas demais células, sinais de fluorescência foram medidos (Figura 17). A IMF das células HeLa e A549 tratadas com FFP/siRNA (200 pmol/1x10^5 células) foram de três e sete vezes maior do que a IMF das células não tratadas. Já a IMF das células FaDu não foram estatisticamente diferentes das células não tratadas. O mesmo foi observado para as células FaDu e A549 quando as mesmas foram tratadas com o complexo FFP/siRNA (50 pmol/1x10^5 células). Já a IMF das três linhagens tratadas com o complexo PEI/siRNA foram treze (HeLa), dez (A549) e cinco (FaDu) vezes maiores do que a IMF das células não tratadas. Para as células tratadas com o complexo lipofectamina/siRNA, apenas as células HeLa tiveram IMF maior (2,6 vezes) do que as células não tratadas.

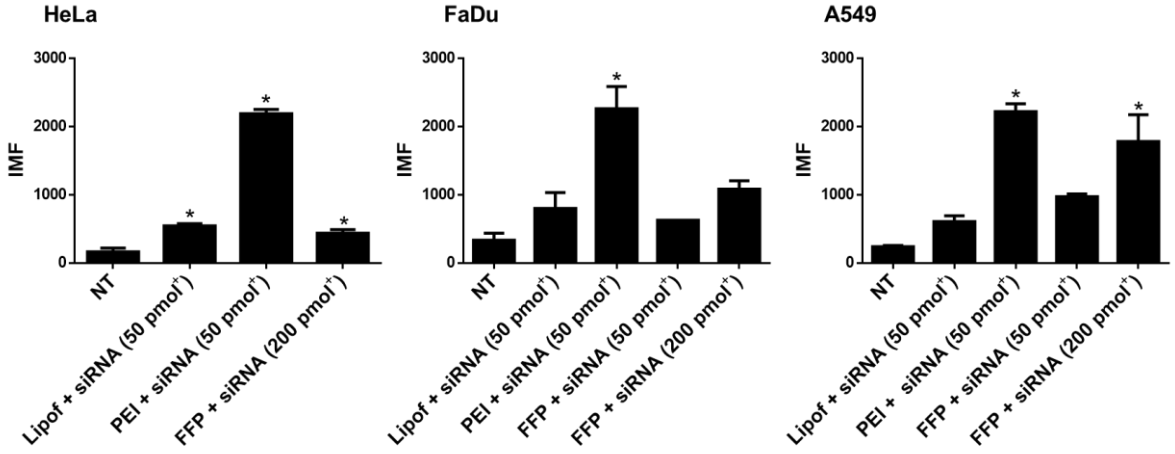

Figura 17. Intensidade média da fluorescência (IMF) das células HeLa, FaDu e A549 determinada pela medida da fluorescência em lisados celulares. Os valores da fluorescência foram corrigidos pela quantidade de proteína. * $p < 0,05$ comparado as células não-tratadas. NT: células não tratadas, Lipof: Lipofectamina complexada ao Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), PEI: 0,65% de PEI em tampão tris complexado ao Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), FFP: FFP complexada ao Alexa488 siRNA (50 ou 200 pmol/1x10^5 células). O símbolo $^+$ na legenda do eixo x se refere a "/1x10^5 células". (n=3).

Na Figura 18, estão os gráficos da IMF das células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP determinada pela medida da fluorescência em lisados celulares usando o Alexa647 siRNA complexado com lipofectamina, PEI e FFP. Não houve quantificação de fluorescência nas células não-tratadas. A IMF das células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP tratadas com FFP/siRNA (200 pmol/1x10^5 células) foi 100, 61 e 26 vezes maior do que a IMF das células não tratadas. As células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP tratadas com o complexo PEI/siRNA apresentaram IMF 130 e 48 vezes maiores do que as células não-tratadas, respectivamente. Apenas as células MCF-7/DLC2-GFP apresentaram IMF maiores do que as não tratadas quando foram tratadas com lipofectamina (33 vezes). As demais células tratadas com PEI/siRNA ou Lipofectamina/siRNA não apresentaram IMF estatisticamente diferentes das células não-tratadas.

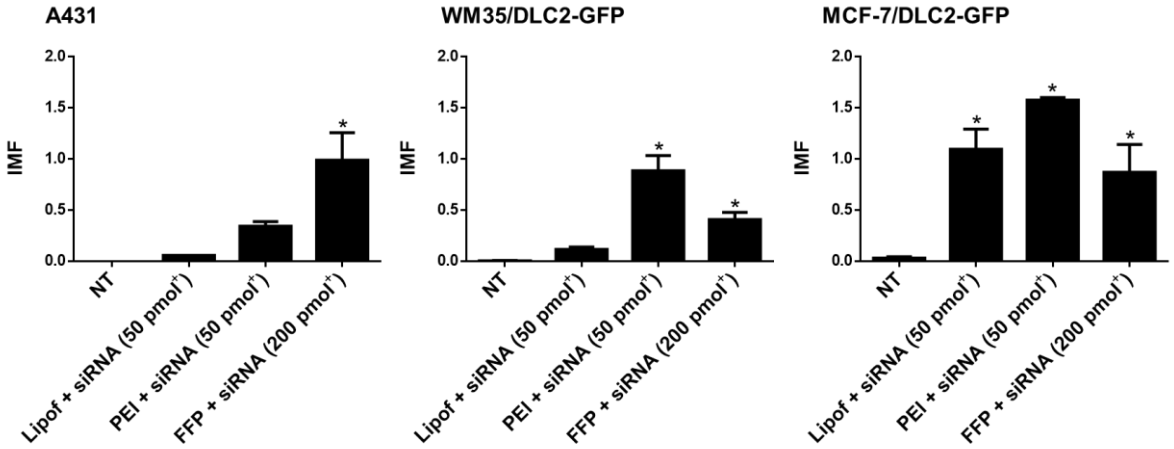

Figura 18. Intensidade média da fluorescência (IMF) das células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP determinada pela medida da fluorescência em lisados celulares. Os valores da fluorescência foram corrigidos pela quantidade de proteína. * $p < 0,05$ comparado as células não-tratadas. NT: células não tratadas, Lipof: Lipofectamina complexada a Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), PEI: 0,65% de PEI em tampão tris complexado ao Alexa488 siRNA (50 pmol/1x10^5 células), FFP: FFP complexada ao Alexa488 siRNA (50 ou 200 pmol/1x10^5 células). O símbolo $^+$ na legenda do eixo x se refere a "/1x10^5 células". (n=3).

A microscopia confocal foi realizada em dois tempos de transfecção (4 e 48 h). As células HeLa, FaDu e A549 foram tratadas com Alexa488 siRNA e as células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foram tratadas com Alexa647 siRNA complexado a lipofectamina, PEI e FFP.

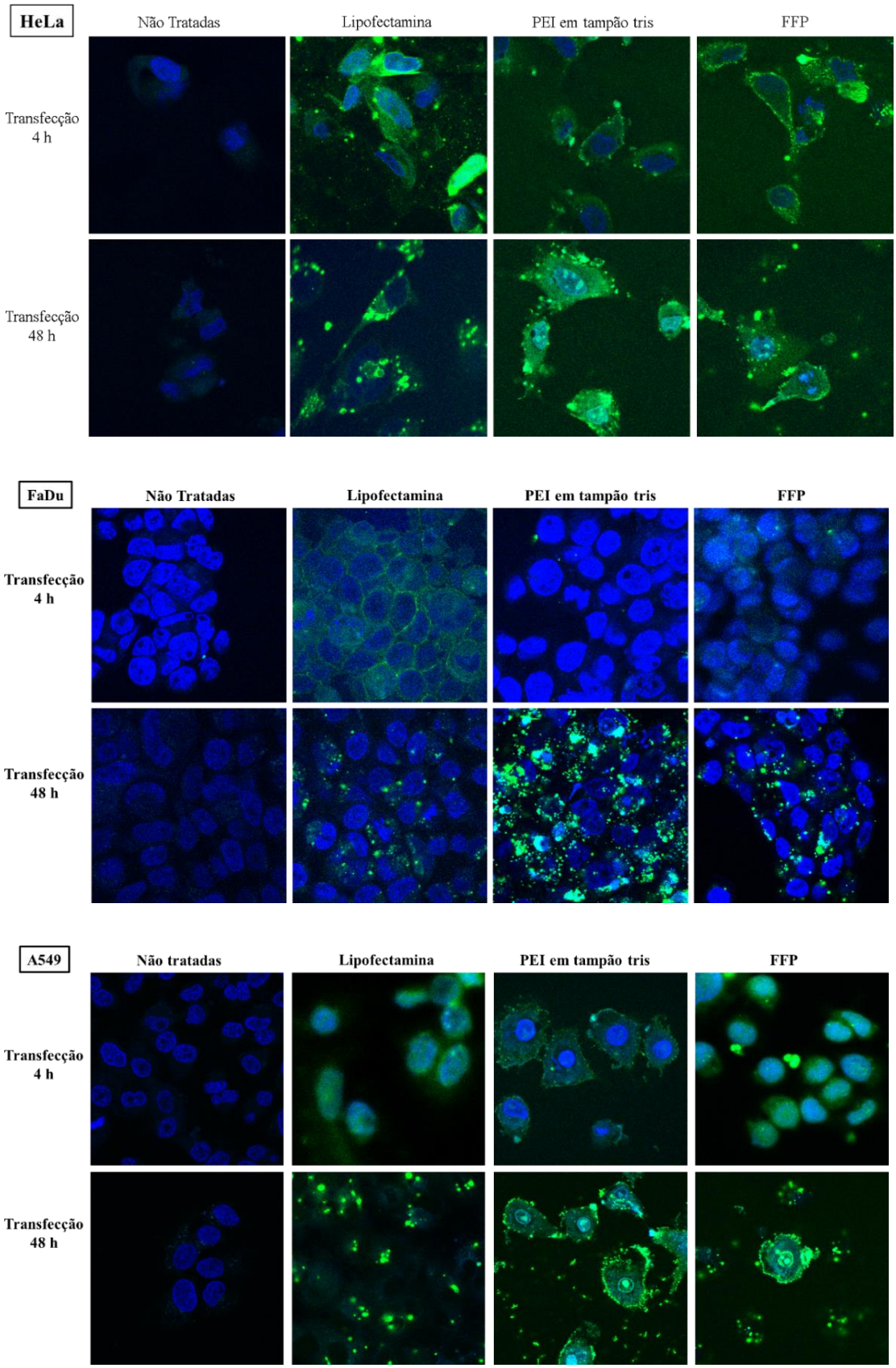

Figura 19. Fotos representativas da microscopia confocal das células HeLa, FaDu e A549 tratadas com lipofectamina, PEI em tampão tris ou FFP complexado com Alexa488 siRNA (verde) (50, 50 e 200 pmol siRNA/1x10^5 células). O núcleo das células foi corado com DAPI (azul).

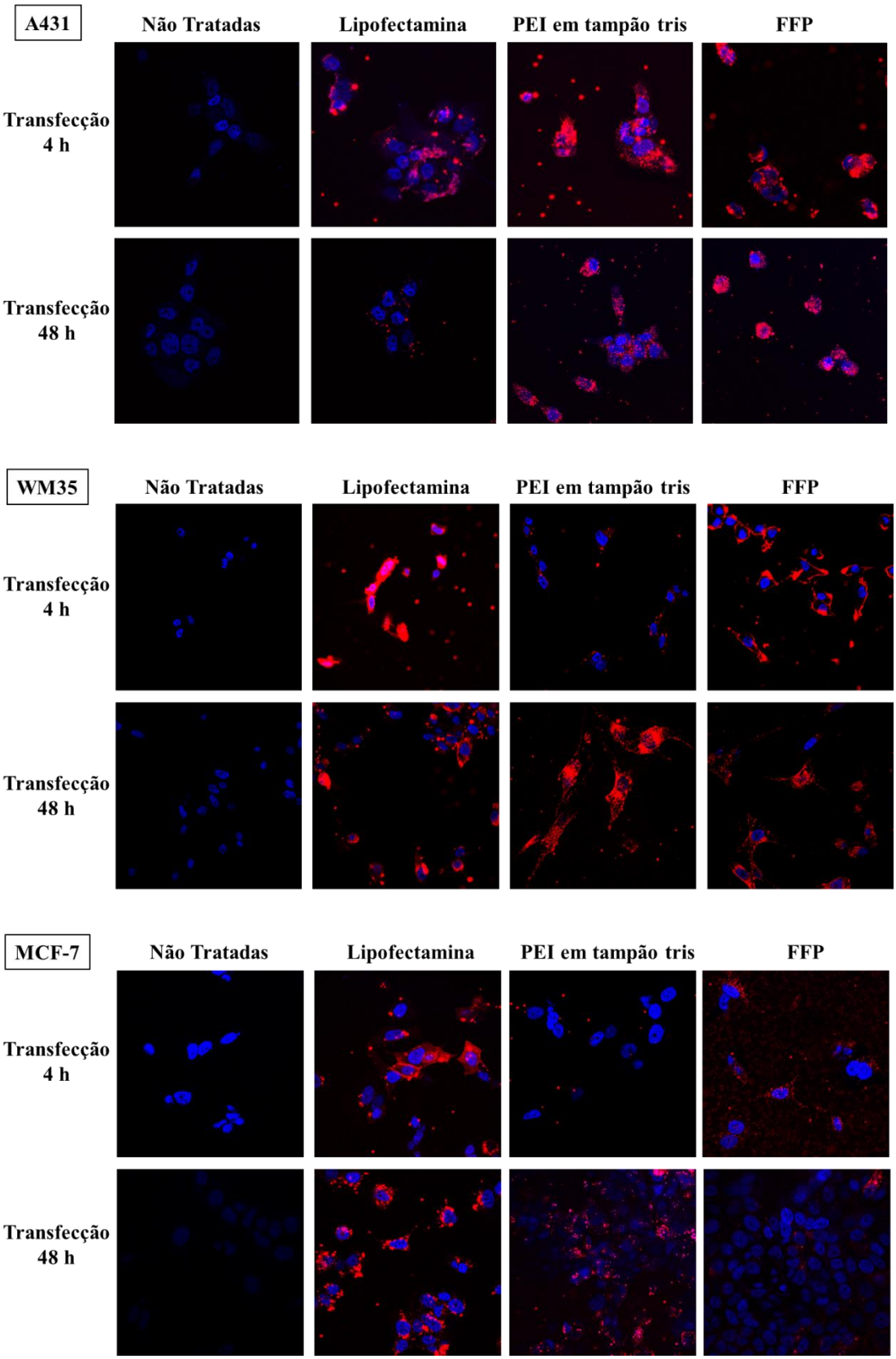

Figura 20. Fotos representativas da microscopia confocal das células A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP tratadas com lipofectamina, PEI em tampão tris ou FFP complexado com Alexa488 siRNA (verde) (50, 50 e 200 pmol siRNA/1x10^5 células). O núcleo das células foi corado com DAPI (azul). WM35: WM35/DLC2-GFP; MCF-7: MCF-7/DLC2-GFP.

Após 4 h de transfecção, pode-se observar a internalização do siRNA complexado a lipofectamina, PEI, FFP nas células HeLa e A549, embora a internalização seja mais pronunciada após 48 h de transfecção. Nas células FaDu, após 4 h de transfecção, observou-se a internalização apenas do siRNA complexado a lipofectamina. A internalização do siRNA complexado ao PEI e FFP, nestas células, foi observada apenas após 48 h (Figura 19).

Nas células A431, em 4 h já é possível observar a internalização do siRNA complexado com lipofectamina, PEI e FFP. Nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP o siRNA é internalização após 4 h de transfecção quando as células são tratadas com o complexo lipofectamina/siRNA ou FFP/siRNA, já nas células tratadas com PEI/siRNA a internalização é melhor visualizada após 48 h de tratamento. Nas células MCF-7/DLC2-GFP, após 48 h de tratamento com FFP/siRNA, pouco siRNA é visualizado nas células (Figura 20).

Nas células MCF-7/DLC2-EGFP e WM35/DLC2-EGFP também se avaliou a internalização celular por time-lapse (vídeo) feito no BioStation IM-Q da Nikon. O vídeo permitiu observar que todos os tratamentos promoveram internalização celular do siRNA, corroborando com os resultados de medida da fluorescência em lisado celular e microscopia confocal. O vídeo também permitiu observar que o siRNA permanece mesmo após sucessivas divisões celulares. Na Figura 21 há algumas imagens representativas extraídas do vídeo ao longo do experimento nas células MCF-7/DLC2-GFP e WM35/DLC2-GFP tratadas com siRNA complexado a FFP. Na imagem B das células WM35/DLC2-GFP da Figura 21 observou-se um ponto vermelho ao centro da imagem que provavelmente corresponde ao complexo siRNA/FFP, após 20 min (tempo mínimo que foi feito a imagem), este complexo está internalizado na célula (imagem C da Figura 21).

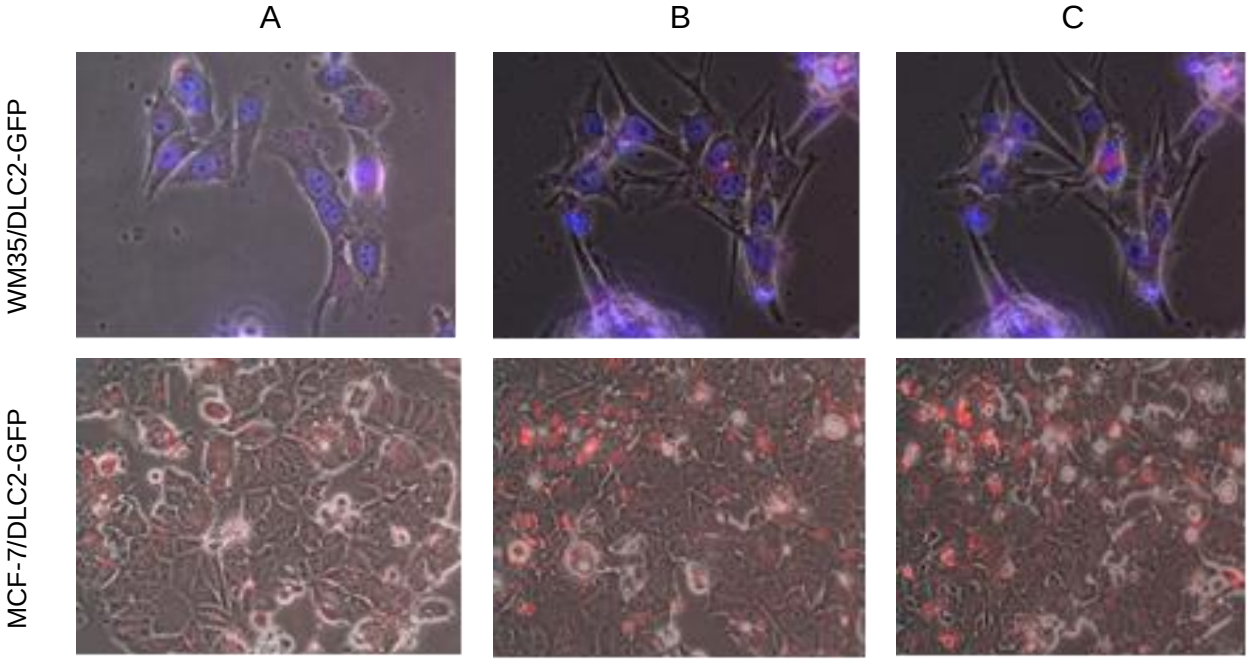

Figura 21. Imagens representativas obtidas pelo vídeo realizado no BioStation IM-Q da Nikon após as células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP serem tratadas com siRNA complexado a FFP. WM35/DLC2-GFP: imagem A, B e C corresponde ao tempo zero, 10 h e 10 h e 20 min, respectivamente, aumento 400x. MCF-7/DLC2-GFP: imagem A, B e C corresponde ao tempo 4, 24 e 48 h, respectivamente, aumento 200x.

4.8. Avaliação da eficiência de silenciamento de Firefly luciferase em células HeLa, FaDu e A549 pelo siLuc liberado do G-FFP

A eficiência de silenciamento de Firefly luciferase pelo siLuc (siRNA específico para Firefly luciferase) veiculado por Lipofectamina, 0,65% de PEI em tampão tris e FFP foi avaliada em células HeLa, FaDu e A549 expressando Firefly luciferase e Renilla Luciferase.

A redução da expressão de Firefly luciferase em células HeLa tratadas com 0,65% de PEI (94% de redução) e FFP (90% de redução) foi maior do que em células tratadas com lipofectamina (76% de redução) (Figura 22). Resultados similares foram observados quando células FaDu foram tratadas com 0,65% de PEI em tampão tris (83% de redução) e Lipofectamina (80% de redução) (Figura 22). No entanto, a redução da expressão de Firefly luciferase foi menor quando as células foram tratadas com FFP (58% de redução). Os resultados obtidos com as células A549 mostram que não houve diferença estatística entre as células tratadas com siLuc ou ns-siRNA (Figura 22).

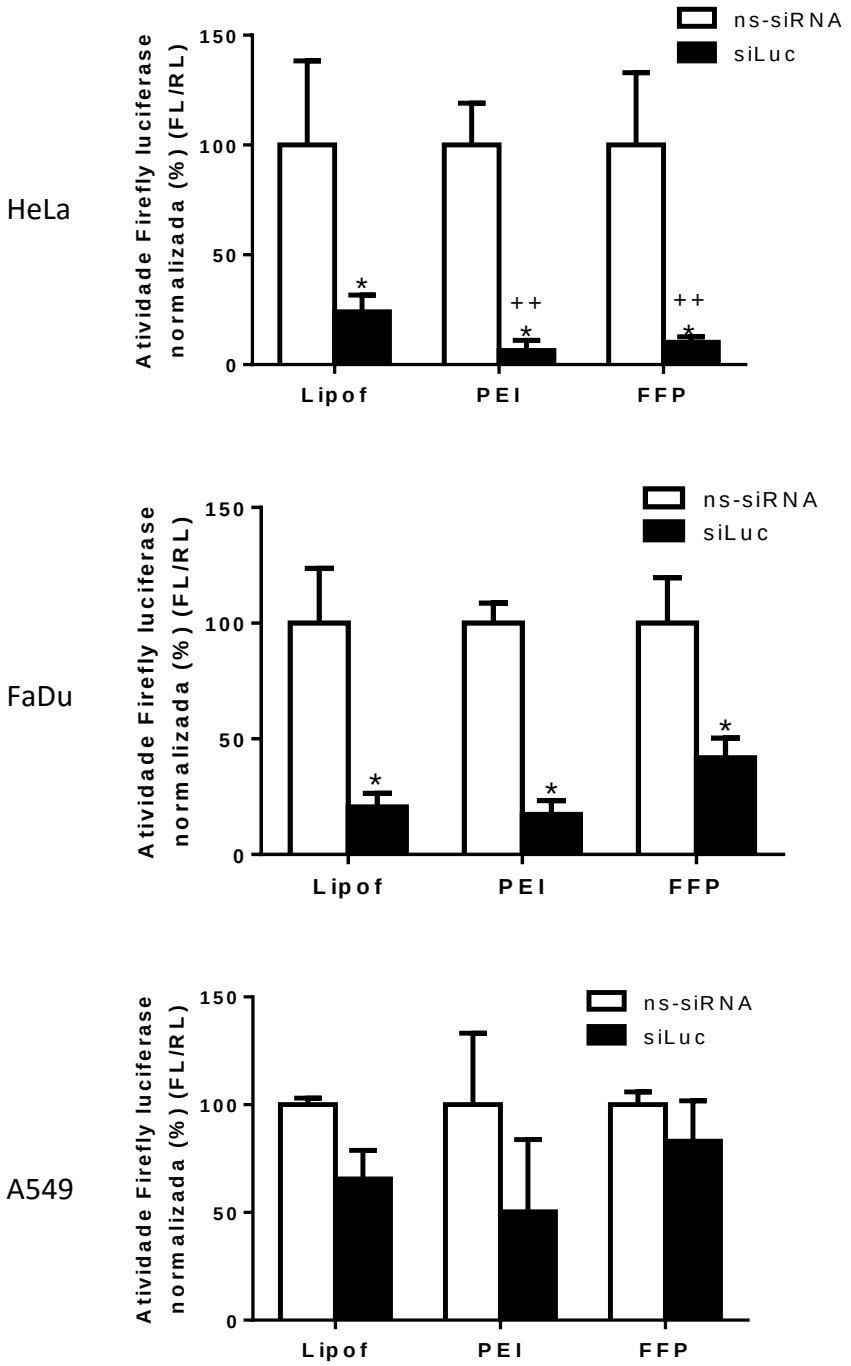

Figura 22. Porcentagem de inibição da atividade de Firefly luciferase normalizada por Renilla luciferase após tratamento das células HeLa, FaDu e A549 com siLuc e ns-siRNA (100 pmol/1x10^5 células) complexado com Lipofectamina (lipof) ou 0,65% de PEI em tampão tris (PEI) e, siLuc e ns-siRNA (400 pmol/1x10^5 células) complexados com FFP. * $p < 0,05$ comparado as células tratadas com ns-siRNA. $^{++}$ $p < 0,05$ comparado as células tratadas com complexo siLuc-lipofectamina (100 pmol/1x10^5 células). (n=3).

4.9. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR em células FaDu, A549, HeLa e A431 pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP

A expressão do EGFR (170 kDa) nas células FaDu, A549, HeLa e A431 foi determinado por WB. β-actina (42 kDa) também foi detectada por WB e foi utilizada como controle interno no WB. A quantidade da expressão da proteína EGFR, determinada quantitativamente pelo NIH ImageJ, foi corrigida pela intensidade de β-actina (Intensidade da banda de EGFR/Intensidade da banda de β-actina). A redução da expressão de EGFR nas células FaDu, A549, HeLa e A431 foi avaliada pela administração de EGFR siRNA complexado a Lipofectamina, 0,65% de PEI em tampão tris ou FFP. Também foi administrado ns-siRNA complexado aos mesmos veículos e em todas as linhagens celulares como controle. Na Figura 23 tem-se uma imagem representativa dos WB realizados para determinar a expressão de EGFR. Como se pode observar, o tratamento com ns-siRNA não promoveu nenhuma redução na expressão do EGFR.

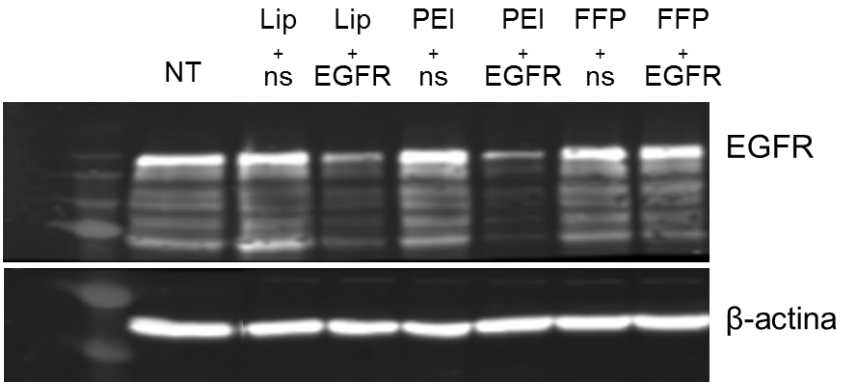

Figura 23. Representação das bandas obtidas no Western Blotting. NT: células não-tratadas. Lip: Lipofectamina. PEI: 0,65% de PEI em tampão tris. ns: ns-siRNA; EGFR: anti-EGFR siRNA.

Para avaliar a capacidade do EGFR siRNA complexado a lipofectamina, o PEI e a FFP em promover o silenciamento da expressão de EGFR diferentes condições experimentais foram avaliadas (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição das condições experimentais realizadas no estudo do silenciamento da expressão de EGFR e apresentação da % de silenciamento promovido pelo EGFR siRNA administrado por lipofectamina, 0,65% de PEI em tampão tris ou FFP.

Linhagem Celular	Condições experimentais	% silenc. do EGFR / siRNA-lipof *	% silenc. do EGFR / siRNA-0,65% PEI *	% silenc. do EGFR / siRNA-FFP *
FaDu	- $1,5x10^5$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof e PEI: 100 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 100, 200 e 400 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	55	0	0
	- $8x10^4$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof e PEI: 100 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 100 e 400 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 72 h	75	0	0
	- $1,5x10^5$ célula/poço, Meio, 10% de SFB foi adicionado 24 h após o início do tratamento - Lipof e PEI: 100 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 100, 200 e 400 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	60	0	0
	- $1,5x10^5$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof e PEI: 100 pmol siRNA**/$1x10^5$ células - FFP: 800^A e 8000^B pmol siRNA**/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	52	NA	10^A, 15^B
A549	- $1,0x10^5$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof e PEI: 50 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 200 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	80	50	0
	- $1,0x10^5$ célula/poço, Meio, 10% de SFB foi adicionado 24 h após o início do tratamento - Lipof e PEI: 50 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 200 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	90	40	0
	- $1,0x10^5$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof: 100 pmol siRNA**/$1x10^5$ células - FFP: 800^A, 3200^B e 6400^C pmol siRNA**/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	60	NA	10^C
HeLa	- $1,0x10^5$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof e PEI: 100 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 400 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	50	65	0
	- $1,0x10^5$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof: 100 pmol siRNA**/$1x10^5$ células - FFP: 800 e 8000 pmol siRNA**/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	50	NA	0
A431	- $5x10^4$ célula/poço, Meio + 10% SFB - Lipof e PEI: 50 pmol siRNA/$1x10^5$ células - FFP: 50, 100 e 200 pmol siRNA/$1x10^5$ células - Tempo de tratamento: 48 h	50	60	0

* valores comparados as células não tratadas, **EGFR siRNA da IDT; NA: não avaliado, lipof.: lipofectamina 2000.

Como observado na Tabela 5, o EGFR siRNA utilizado foi eficiente para silenciar a expressão do EGFR porque quando administrado com lipofectamina

promoveu mais de 50% do silenciamento de EGFR em todas as linhagens celulares avaliadas.

O EGFR siRNA veiculado por 0,65% de PEI em tampão tris promoveu silenciamento da expressão de EGFR nas células A549, HeLa e A431. Já nas células FaDu, nenhum silenciamento do EGFR foi observado.

A administração de EGFR siRNA complexado a FFP não promoveu o silenciamento da expressão de EGFR nas diferentes condições avaliadas (48 e 72 h de tratamento, meio com e sem a presença de SFB) e nas diferentes linhagens celulares. Somente com altas doses de siRNA, um pequeno silenciamento foi observado nas células FaDu e A549.

4.10. Avaliação da eficiência de silenciamento de EGFR pelo EGFR siRNA liberado do G-FFP combinado com a Internalização Fotoquímica (IFQ) em células A549

A capacidade do EGFR siRNA complexado a FFP em promover o silenciamento de EGFR combinando com a IFQ foi avaliado em células A549. Como visualizado na Figura 24, inicialmente foi realizado um *screening* no qual as células foram tratadas com EGFR siRNA complexadas com a FFP por 48 h e diferentes concentrações de fotosensibilizador e tempos de exposição à luz foram utilizados para definir a melhor condição a ser empregada.

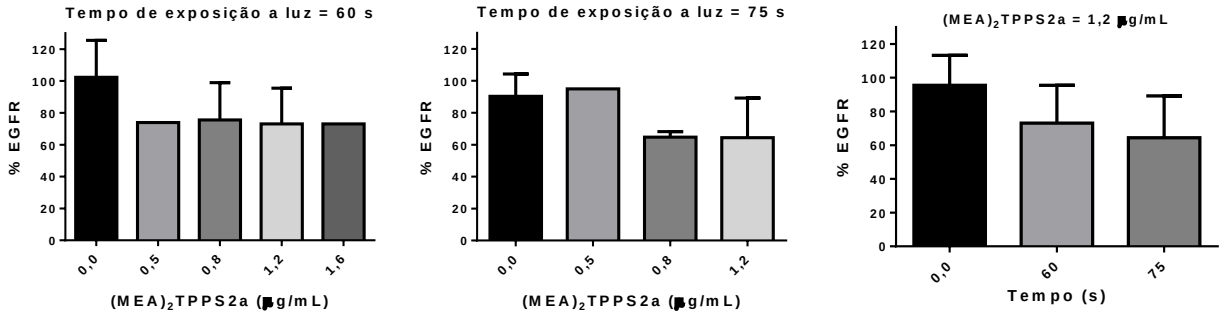

Figura 24. % da expressão de EGFR (em relação as células não tratadas) nas células A549 determinado por Western Blotting após o tratamento por 48 h com EGFR siRNA complexado a FFP. Diferentes concentrações do fotosensibilizador ($(MEA)_2TPPS2a$) foi utilizado bem como 2 tempos de exposição à luz (60 e 75 s). As células com 0,0 µg/mL de $(MEA)_2TPPS2a$ ou 0,0 (tempo) foram tratadas somente com EGFR siRNA complexado a FFP.

Do *screening* realizado definiu-se a melhor condição para o estudo com IFQ nas células A549: concentração de 1,2 µg/mL de $(MEA)_2TPPS2a$ e 75 s de tempo de exposição das células à luz. Como mostrado na Figura 25, o tratamento das células

com EGFR siRNA combinado com IFQ promoveu uma redução na expressão do EGFR (35%) quando o siRNA foi administrado complexado a FFP em comparação as células não tratadas. As células não tratadas e as tratadas com EGFR siRNA livre e FFP/ns-siRNA combinadas com a IFQ não apresentaram silenciamento na expressão de EGFR. O mesmo foi observado para as células tratadas com EGFR siRNA complexadas a FFP e não tratadas com IFQ.

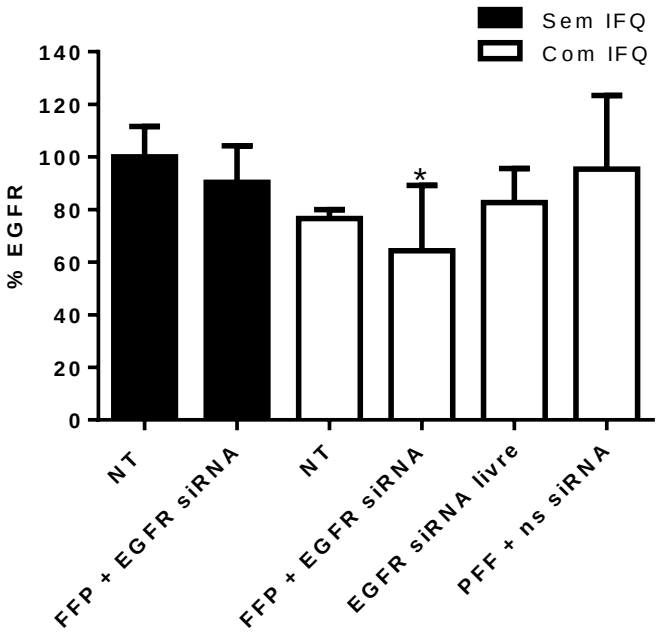

Figura 25. % da expressão de EGFR (em relação as células não tratadas) nas células A549 determinado por Western Blotting após o tratamento por 48 h com EGFR siRNA complexado a FFP. Com IFQ: células tratadas com 1,2 µg/mL de $(MEA)_2TPPS2a$ e expostas à luz por 75 s. NT: células não tratadas com EGFR siRNA. * $p < 0,05$ comparado as células não tratadas.

4.11. Estudos *in vivo*

A inoculação de células A431 no dorso de camundongos nude foram efetivas para a obtenção dos tumores subcutâneos e após 10 dias da inoculação a maioria dos tumores atingiram 100-150 mm^3.

4.12. Avaliação da formação do gel intratumoral

A formação do gel após injeção intratumoral da FFP contendo ou não siRNA foi avaliada pela análise visual e por microscopia dos cortes histológicos corados com H&E. Como observado na Figura 26, o gel é formado intratumoralmente após a injeção intratumoral da FFP na presença e ausência de siRNA.

A Figura 26 também mostra que o gel não foi formado como um único ponto localizado, houve um local maior de formação de gel, onde a FFP foi aplicada, mas a FFP também se espalhou dentro do tumor e o gel se formou nesta área. Também observa-se a presença de células, na maioria mortas, dentro do gel, estudos mais detalhados precisam ser feitos para verificar se o gel circundou estas células e promoveu a sua morte ou se o gel funcionou como um suporte e células começaram a se desenvolver nesta “matriz”.

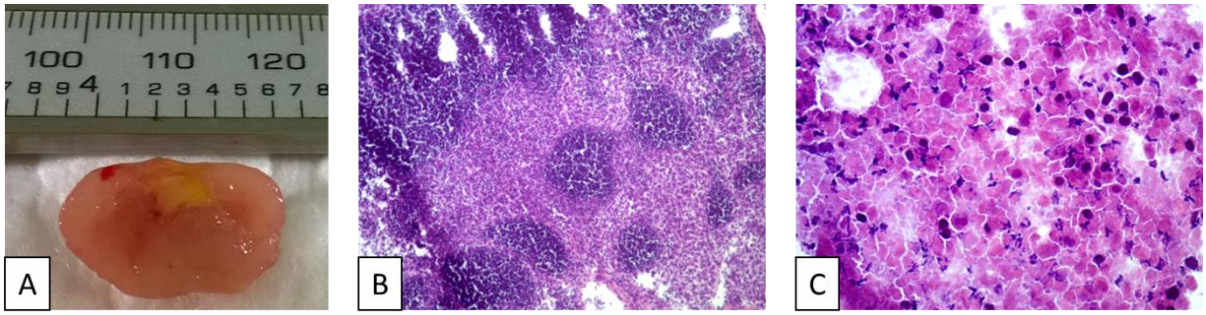

Figura 26. (A) Foto do tumor com gel após administração intratumoral de FFP. (B e C) Análise histológica do tumor corado com H&E. Tecido tumoral após 24 h da injeção da FFP, o gel corresponde a coloração rosa (Aumento 100x) e tecido tumoral com gel após 7 dias da injeção de FFP (Aumento 400x), respectivamente.

4.13. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Western Blotting

A expressão de EGFR nos tumores de camundongos sacrificados após 24 h, 7 e 14 dias (o grupo de 14 dias corresponde a todos os animais que foram sacrificados entre 10 e 14 dias) do tratamento com FFP contendo ou não siRNA foi avaliada por WB. As bandas obtidas no WB estão mostradas na Figura 27A. Não houve diferenças significativas na expressão do EGFR entre os grupos tratados com e sem EGFR siRNA (Figura 27B).

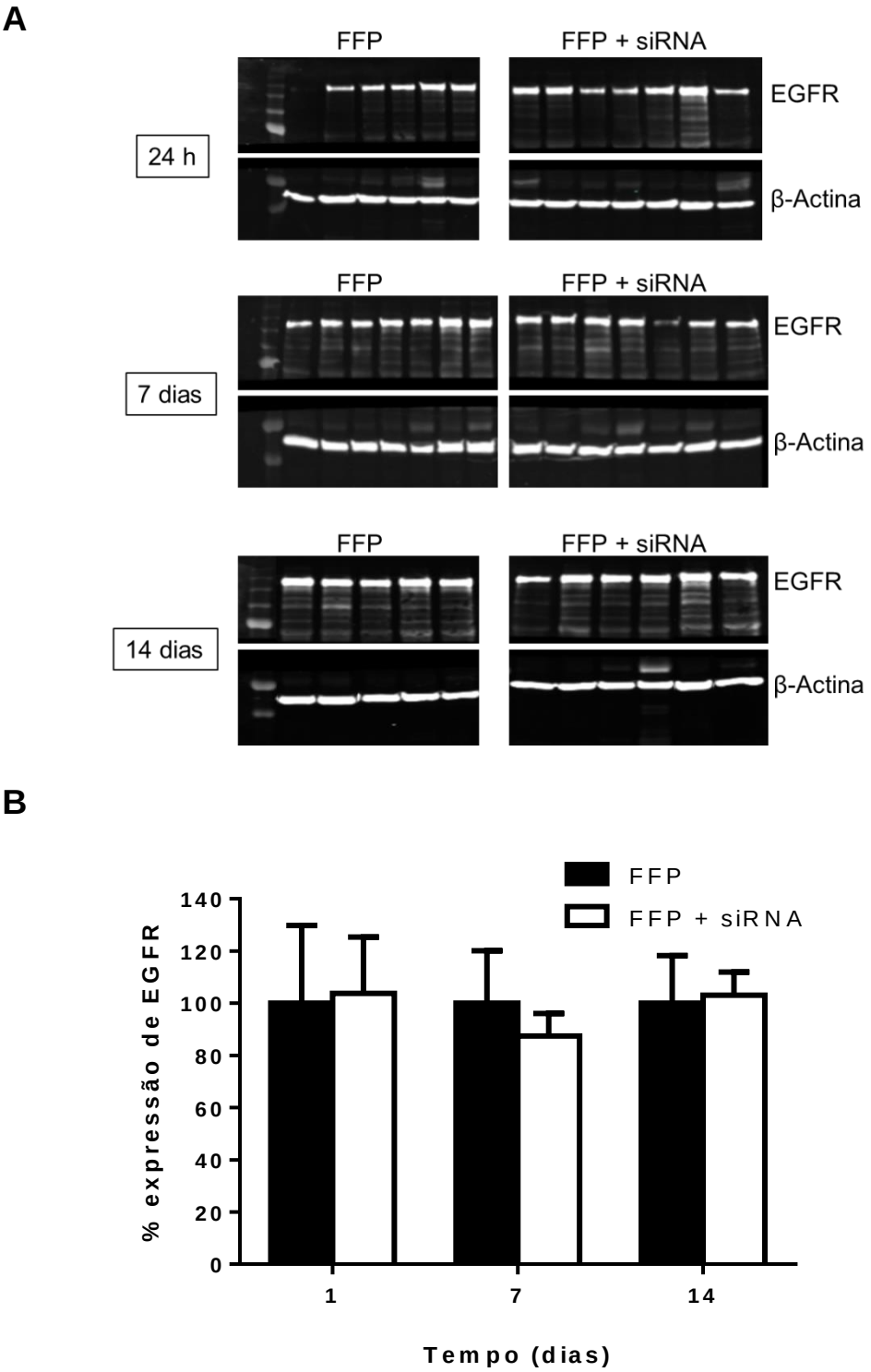

Figura 27. (A) Bandas obtidas no Western Blotting da expressão de EGFR em tumores tratados por 24 h, 7 e 14 dias com a FFP contendo ou não EGFR siRNA (2,5 mg). (B) Gráfico da expressão do EGFR em tumores tratados por 24 h, 7 e 14 dias com a FFP contendo ou não EGFR siRNA em função do tempo.

4.14. Análise da expressão de EGFR RNAm nos tumores por RT-PCR

A expressão de EGFR RNAm nos tumores de camundongos sacrificados após 24 h, 7 e 14 dias do tratamento com FFP contendo ou não siRNA foi avaliada por RT-PCR. Como observado na Figura 28, não houve diferenças estatisticas entre a expressão do EGFR RNAm dos camundongos tratados com FFP contendo ou não siRNA, indicando que não houve redução da expressão do EGFR RNAm com tratamento de EGFR siRNA nestas condições.

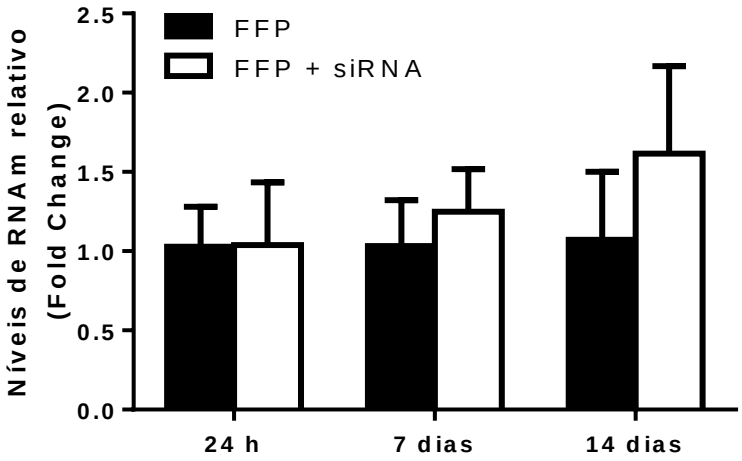

Figura 28. Detecção por RT-PCR de EGFR RNAm em tumores A431 tratados com injeção intratumoral de FFP ou FFP + siRNA. Todos os valores são relativos ao β-Actina RNAm (RNAm controle). Resultados estão apresentados como média ± desvio padrão (n mínimo de 5 e máximo de 7).

4.15. Análise da expressão de EGFR nos tumores por Imunohistoquímica (IHQ)

A Figura 29 mostra imagens representativas dos tumores dos camundongos sacrificados 24 h e 7 dias após injeção intratumoral de FFP ou FFP + siRNA corados por IHQ e por H&E. Como se pode observar nas imagens dos tumores corados por IHQ há regiões com coloração marrom (indicativa de EGFR) tanto nos tumores tratados com FFP quanto nos tratados com FFP + siRNA. Nos tumores corados por H&E, a coloração roxa indica o tecido tumoral e a rosa indica a presença de gel no tecido tumoral. A comparação dos cortes corados por H&E e IHQ mostra que não há coloração marrom somente nas regiões onde o gel está presente.

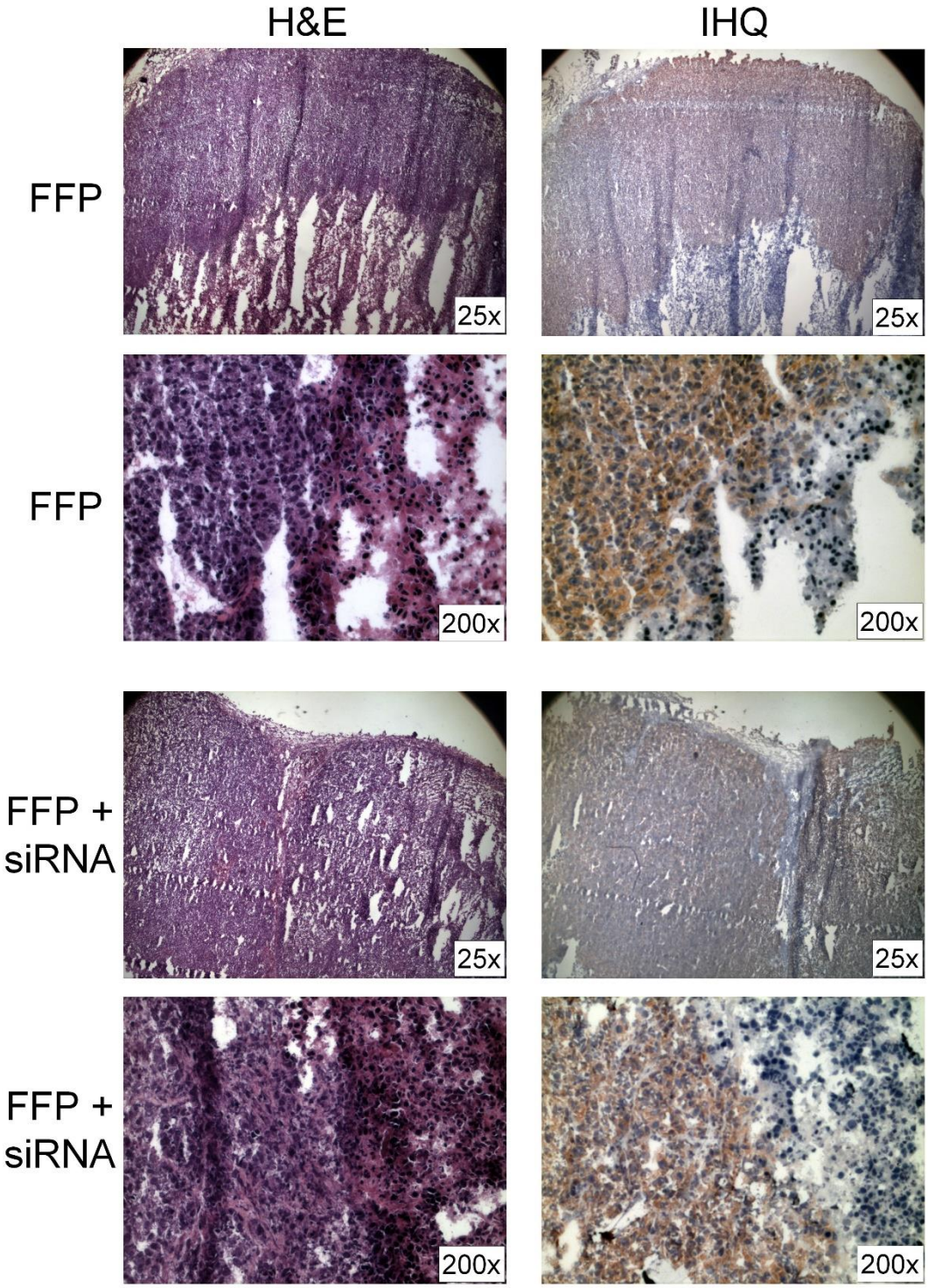

Figura 29. Cortes histológicos de 5 µm de espessura dos tumores de camundongos tratados por 24 h e 7 dias com FFP ou FFP + EGFR siRNA. Os tumores foram corados por H&E (Esquerda) e por IHQ (Direita) com marcação para EGFR. O aumento de cada imagem está mostrado na própria imagem.

4.16. Avaliação *in vivo* da redução do tumor

O tamanho dos tumores foi avaliado usando um paquímetro digital. A Figura 30 mostra o tamanho dos tumores após administração da FFP contendo ou não EGFR

siRNA em função do tempo. Como observado na Figura 30, após 3 dias da administração da FFP, os tumores tratados com FFP contendo siRNA tiveram uma redução de tamanho de 30% comparado os tumores tratados com FFP. Não foi observado redução significativa no tamanho dos tumores entre os dois grupos nos demais tempos avaliados.

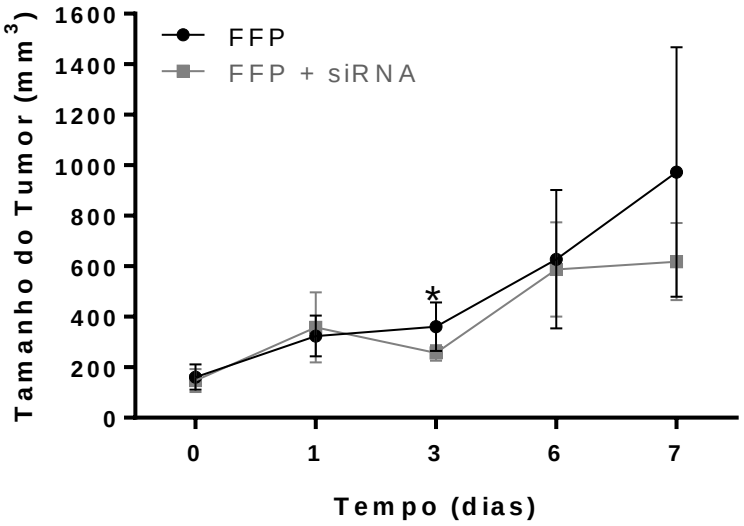

Figura 30. Tamanho dos tumores após tratamento com FFP contendo ou não EGFR siRNA (2,5 mg). * $p < 0.05$ comparado aos tumores tratados com FFP.

5. DISCUSSÃO

A habilidade de líquidos isotrópicos e sistemas líquido cristalinos fluidos, como a fase lamelar, formarem sistemas líquido cristalinos rígidos, como a fase cúbica e a fase hexagonal, após contato com excesso de água dos fluidos corporais está descrita na literatura (CHANG; BODMEIER, 1997b, 1998; RIZWAN et al., 2009; SHAH; SADHALE; CHILUKURI, 2001). Estes sistemas podem ser formados a partir de lipídeos anfifílicos tais como MO que intumescem na presença de água e formam vários tipos de cristais líquidos (AGARWAL; RUPENTHAL, 2013; HATEFI; AMSDEN, 2002; YAGHMUR; RAPPOLT; LARSEN, 2013). Os sistemas líquido cristalinos que formam géis *in situ* são promissores para administração localizada e sustentada de fármacos (FONG; HANLEY; BOYD, 2009).

Na presente pesquisa, MO foi usado para obtenção de sistemas líquido cristalinos que formam géis *in situ* (BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015). PG e tampão tris foram adicionados para garantir fluidez à FFP, e o polímero catiônico PEI foi adicionado para formar um sistema capaz de administrar genes (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015).

A FFP composta de MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p) forma gel líquido cristalino em contato com excesso de água (G-FFP). O G-FFP foi caracterizado como fase hexagonal por microscopia de luz polarizada (Figura 10A) e como uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal por SAXS (Figura 10B e Tabela 2). A precisão da SAXS revelou todos os sistemas líquido cristalinos presentes, mesmo aqueles não observados por microscopia de luz polarizada, como a isotropia da fase cúbica, que foi ocultada pela birrefringência da fase hexagonal.

Nesta pesquisa, a FFP foi complexada com diferentes concentrações de siRNA durante os experimentos *in vitro* e *in vivo*, porém sempre foi mantida a proporção 1:1 (v/v) de FFP:solução de siRNA nos experimentos com culturas celulares e *in vivo*. Como descrito na literatura, o tipo do sistema líquido cristalino formado depende das propriedades estruturais dos lipídeos, temperatura, característica dos componentes incorporados e quantidade de água no sistema (CHANG; BODMEIER, 1998; FONG; HANLEY; BOYD, 2009). Por este motivo padronizou-se o uso da mesma proporção de FFP e solução de siRNA nos diferentes experimentos com culturas celulares e *in vivo*. Os resultados de SAXS do G-FFP, obtido a partir de 100 µL de FFP:Água (1:1, v/v) em 900 µL de água, mostram que o gel rígido formado é uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal. Este mesmo sistema formado pela FFP:Água na proporção de 8:2 (v/v) em excesso de água resultou em um gel rígido de fase cúbica com

interstício de fase hexagonal, sendo observado também duas fases cúbicas bicontínuas (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015). Estes resultados mostram que a quantidade de água no sistema inicial influencia a estrutura líquido cristalina do gel formado em excesso de água. O aumento da quantidade de água no sistema inicial favorece a obtenção de hase hexagonal, pois com o aumento de água observou-se uma mudança de interstício de fase hexagonal (fase em pequena proporção) para fase hexagonal. É relatado na literatura que com o aumento na concentração de solventes pode ocorrer transformação das moléculas de uma forma de linear (fase lamelar) para uma forma de cone. Dependendo da polaridade do agente de solvatação e da própria molécula, a transição pode resultar em uma fase hexagonal ou fase hexagonal reversa (MULLER-GOYMANN, 2004)

Como a adição de qualquer componente pode influenciar a estrutura líquido cristalina formada, também foi avaliada a influência da adição de siRNA no gel obtido. Para avaliar esta influência selecionou-se duas concentrações de siRNA (10 e 100 µM) porque a maioria dos experimentos utilizaram concentrações de siRNA dentro da faixa de 10 a 100 µM. Os G-FFP contendo 10 e 100 µM de siRNA também foram caracterizadas como uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal. A mesma caracterização foi obtida quando a FFP:siRNA (8:2, v/v) com 10 µM de siRNA formou gel em excesso de água (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015).

A incorporação de componentes aos sistemas líquido cristalinos pode resultar em completa mudança de fase ou apenas em alterações no parâmetro de rede da estrutura (PHAN et al., 2011). A incorporação de siRNA não resultou em mudança de fase líquido cristalina, mas aumentou o parâmetro de rede. O parâmetro de rede representa a distância entre os centros das micelas ordenadas da fase líquido cristalina (AMAR-YULI et al., 2007). O aumento do parâmetro de rede pode ser devido à (i) hidratação da estrutura, (ii) presença de moléculas hidrofílicas nos domínios aquosos ou (iii) presença de moléculas anfifílicas ancoradas entre o domínio polar e a cauda apolar, sugerindo que a molécula adicionada ao sistema está localizada internamente na estrutura líquido cristalina (AMAR-YULI; ASERIN; GARTI, 2008; AMAR-YULI et al., 2007; LIBSTER et al., 2007). Como o siRNA é uma molécula hidrofílica este resultado era esperado e indica que o siRNA está nos domínios aquosos da fase cúbica e da fase hexagonal, inchando a estrutura e, portanto, aumentando o parâmetro de rede. Também é importante ressaltar que embora o aumento na concentração de siRNA, de 10 para 100 µM, adicionado a FFP tenha

promovido um aumento no parâmetro de rede, este aumento não foi muito pronunciado.

O aumento do parâmetro de rede era esperado após a adição do siRNA, porém em trabalhos anteriores, quando a formulação inicial era composta de FFP:siRNA (8:2, v/v) observamos que a adição de siRNA promoveu uma redução no parâmetro de rede quando comparado ao sistema sem siRNA. Esta redução foi explicada pela alta hidrofilicidade do siRNA, que o faz competir com o MO pela água, promovendo a desidratação do MO, resultando em diminuição do tamanho efetivo dos seus grupos polares, e consequente encolhimento do parâmetro de rede (AMAR-YULI et al., 2007; BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015). A diferença de resultados nestes dois estudos pode ser explicada pela quantidade de água inicial no sistema. Como no gel obtido a partir de FFP:água (1:1, v/v), a proporção de água inicial é maior, provavelmente, não houve competição do siRNA com o MO pela água, e se houve esta competição não foi suficiente para desidratar a estrutura e assim observamos o aumento do parâmetro de rede devido à presença de molécula hidrofílica nos canais aquosos.

Para que o siRNA não seja degradado no organismo e consiga efetivamente entrar nas células e ser liberado no citoplasma para exercer seu efeito é necessário que ele seja liberado da formulação complexado ao PEI (BEYERLE et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011). Usando um ensaio de competição com heparina foi mostrado que o siRNA veiculado pelo gel obtido a partir da FFP é liberado complexado ao PEI (Figura 11B). Este resultado é importante porque indica que esta formulação tem potencial como sistema de liberação de siRNA.

A liberação de fármacos *in vitro* a partir de sistemas líquido cristalinos tem sido investigada em vários estudos (CHANG; BODMEIER, 1998; LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005; PHAN et al., 2011; RIZWAN et al., 2009); porém o mecanismo de liberação ainda não é completamente entendido. Vários fatores estão envolvidos e podem influenciar a liberação do fármaco incluindo as propriedades do mesmo (que determina a concentração do fármaco solubilizada e sua afinidade pelos canais de água da estrutura líquido cristalina), composição e estrutura dos cristais líquidos (que estão relacionadas com o conteúdo de água inicial, com a taxa de absorção de água e com o tamanho dos canais hidrofílicos) e as condições experimentais usadas para realizar o ensaio de liberação do fármaco *in vitro* (YAGHMUR; RAPPOLT; LARSEN, 2013; YAGHMUR et al., 2012). O tamanho dos canais das estruturas líquido cristalinas

pode influenciar na liberação do fármaco, como por exemplo, a liberação de fármacos hidrofílicos de fase hexagonal reserva é menor do que de fase bicontinua cúbica provavelmente devido ao menor tamanho dos canais hidrofílicos da fase hexagonal (FONG; HANLEY; BOYD, 2009; NEGRINI; MEZZENGA, 2011). Assim, a liberação de fármacos hidrofílicos parece estar relacionada com o diâmetro e a tortuosidade dos canais de água (YAGHMUR; RAPPOLT; LARSEN, 2013). Neste estudo preliminar, o G-FFP liberou o siRNA de maneira sustentada (Figura 11A). A liberação de siRNA foi avaliada com apenas uma concentração (10 µM) devido a limitações de custos. Embora, não houve alteração da estrutura líquido cristalina quando concentração maior de siRNA foi adicionada (observando-se apenas pequeno aumento no parâmetro de rede), não se pode inferir que a liberação seria semelhante a obtida com a concentração de 10 µM de siRNA.

Este sistema foi proposto para administração parenteral de siRNA e, portanto, deve ser passível de esterilização. Para obter uma esterilização eficiente é preciso garantir que as matérias-primas e a formulação inicial tenham o mínimo de microrganismo antes da esterilização. As matérias-primas e FFP apresentaram baixa quantidade de microrganismo e estão de acordo com o preconizado pela USP XXXIII (Tabela 4). Para a realização dos testes de quantidade de microrganismos nas matérias-primas e na FFP e para a realização dos testes de esterilização, o MIP foi escolhido como diluente das amostras pois o mesmo não inibe o crescimento dos microsganismos. Este diluente também foi utilizado por Ahmed et al. (2010) na avaliação da esterilidade de fase cúbica realizada por diferentes métodos (AHMED; DASHEVSKY; BODMEIER, 2010).

O processo de esterilização mostrou que a filtração asséptica em membrana de 0,22 µm é efetiva para esterilizar a formulação desenvolvida, uma vez que, após 14 dias não se observou turvação dos caldos. Pode-se afirmar que a ausência de crescimento microbiano foi devido à esterilização adequada e não devido a fatores que inibiram o crescimento dos microrganismos, porque observou-se a turvação dos caldos após 3 dias de adição do *Staphyloccocus aureus*. A esterilização por filtração em membrana 0,22 µm também foi eficiente quando a FFP foi desafiada com *Pseudomonas diminuta*, microrganismo indicado pela USP XXXIII para a realização deste desafio. Após a filtração em membrana de 0,22 µm a FFP foi capaz de se geleificar, não alterando as propriedades do sistema. Assim, podemos concluir que a

filtração asséptica em membrana de 0,22 µm é eficiente para esterilizar o sistema desenvolvido.

O sistema desenvolvido foi então avaliado quanto a sua capacidade de complexar o siRNA (Figura 12). É importante lembrar que apesar do potencial do siRNA em tratar diversas doenças, a sua aplicação clínica é limitada devido a vários obstáculos tais como dificuldade de atravessar a membrana celular devido a repulsão de cargas e ao seu tamanho elevado, dificuldade de escape endossomal e a sua instabilidade *in vivo* (KIM; PARK; SONG, 2013; WONG; PELET; PUTNAM, 2007). Para superar estes desafios, sistemas de liberação são desenvolvidos incorporando lipídeos e polímeros catiônicos. Os lipídeos e polímeros catiônicos formam complexos com siRNA através de interações eletrostáticas de sua carga positiva com a carga negativa do siRNA. A formação destes complexos evita os problemas de repulsão pela membrana celular que tem uma carga residual negativa, diminui o tamanho dos ácidos nucléicos devido à condensação da molécula facilitando, assim, a sua internalização pelas células e evitando a degradação por nucleases (BEYERLE et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011). Portanto, o primeiro passo a se avaliar em um sistema para aplicação de siRNA é sua capacidade de complexar o siRNA.

A avaliação da capacidade de complexar o siRNA foi feita por eletroforese usando gel de agarose 2%. O siRNA livre consegue penetrar na malha do gel de agarose e uma banda é visualizada sob luz UV devido a intercalação com o brometo de etídeo ou GelRed. Quando o siRNA está complexado, ele não penetra na malha do gel e, portanto, não se consegue visualizar a banda (SHEN et al., 2011). A FFP foi capaz de complexar até 15 mM de siRNA. Portanto, o sistema é capaz de complexar altas concentrações de siRNA.

A proteção do siRNA durante a terapia também é indispensável porque siRNAs são degradados pelas RNAses e são agregados por moléculas carregadas presentes no soro dentro de poucas horas (KIM; PARK; SONG, 2013). A formação de complexos com siRNA é uma maneira de protegê-lo da degradação e como esperado o complexo formado entre o siRNA e a FFP protegeu o siRNA mesmo em altas concentrações (Figura 13). O mesmo foi observado para o siRNA complexado ao PEI e a lipofectamina, já o siRNA livre foi degradado após 24 h de contato com 25% de SFB.

Com os estudos apresentados até o momento, pode-se afirmar que o gel obtido a partir da FFP é um sistema capaz de complexar até 15 mM de siRNA e de proteger o siRNA da degradação. Além disto, o siRNA liberado da FFP está complexado ao

PEI. Com estas características em mente foi avaliado a interação do siRNA liberado do G-FFP com as células. Como as linhagens celulares apresentam características distintas que podem resultar em diferenças no processo de internalização gênica e silenciamento da expressão de proteínas (MATSUI et al., 2006; WEECHARANGSAN; OPANASOPIT; LEE, 2007), seis linhagens de células cancerígenas foram avaliadas, dentre elas, as células A431 e FaDu que são cânceres de células escamosas.

Para iniciar os estudos envolvendo cultura celular, avaliamos a citotoxicidade da FFP nas diferentes linhagens (Figura 14, 15 e 16). A citotoxicidade foi avaliada usando MTS ou rezasurina. No ensaio com MTS, enzimas desidrogenases encontradas em células metabolicamente ativas convertem o MTS em formazan solúvel. A quantidade de formazan formado, determinada pela absorbância a 490 nm, é diretamente proporcional ao número de células vivas. No ensaio com resazurina, as enzimas mitocondriais são responsáveis pela transferência de elétrons do NADPH + H^+ para a resazurina, que é reduzida a resofurina. A quantidade de resofurina, determinada por fluorescência, é diretamente proporcional ao número de células viáveis. A resofurina também pode ser determinada por absorbância a 570 nm (BORRA et al., 2009; PEETERS; NELIS; COENYE, 2008).

Estudos de citotoxicidade *in vitro* têm sido usado para predizer a toxicidade de diversos compostos em humanos (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Na presente pesquisa, a avaliação da citotoxicidade da FFP teve como objetivo principal determinar o volume de FFP que poderia ser usado nos experimentos com células, já que a toxicidade do sistema foi previamente avaliada *in vivo* após administração subcutânea da formulação (BORGHETI-CARDOSO et al., 2014, 2015). De qualquer forma, este estudo de viabilidade celular permitiu observar que o PEI, como já era esperado, é o componente mais tóxico da formulação (LIU et al., 2011). Uma observação interessante foi que a sua incorporação à FFP parece ter diminuido a sua toxicidade nas células A431, FaDu, HeLa e A549. Isto porque 0,0004% de PEI em tampão tris resultou em 60% de viabilidade celular, enquanto que 0,0004% de PEI na FFP (referente a concentração final na célula pelo volume de FFP administrado (0,37 µL)) resultou em viabilidade celular de aproximadamente 75%.

Também foi possível observar que a FFP complexada com siRNA foi menos citotóxica, provavelmente, porque o siRNA diminuiu a carga positiva do sistema. Vários estudos com nanopartículas também demonstraram que a redução ou neutralização da carga positiva do sistema resultou em menor citotoxicidade

(FRÖHLICH, 2012). Além disso, pode-se inferir também que o aumento do volume de FFP administrado promoveu uma redução na viabilidade celular, dessa forma, para garantir uma alta viabilidade celular nos estudos seguintes, utilizou-se a proporção de no máximo de 0,5 µL de PFF para 500 µL de meio de cultura nas células A431, FaDu, HeLa e A549. Para as células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP a FFP foi um pouco mais tóxica e optamos por usar 0,25 µL de PFF para 500 µL de meio de cultura, já que a administração de 0,5 µL de FFP resultou em viabilidade celular de 30%. Nestas células não se observou diferença na toxicidade do PEI em tampão tris ou PEI incorporado a FFP.

Após a definição do volume de FFP que pode ser administrado às células de modo a garantir uma viabilidade maior que 80% foi então, avaliado a internalização celular do siRNA.

A internalização celular do siRNA é um grande desafio devido as suas características físico-químicas como possuir alto peso molecular (~13 KDa) e carga negativa (BUMCROT et al., 2006). Com estas características o siRNA não consegue atravessar a membrana citoplasmática por difusão passiva (LU; LANGER; CHEN, 2009), portanto é necessário o desenvolvimento de carreadores que neutralizem a carga negativa do siRNA e que promovam a condensação da estrutura do siRNA (WONG; PELET; PUTNAM, 2007).

Para avaliar a capacidade de um sistema em promover a internalização celular do siRNA, é importante usar técnicas que determinam quantitativamente o siRNA dentro da célula após a transfecção. A análise quantitativa pode ser obtida usando siRNA marcado com elementos radioativos (OVERHOFF; WUNSCHE; SCZAKIEL, 2004; WOLFRUM et al., 2007). Porém, trabalhar com material radioativo requer pessoal treinado e laboratório preparado e autorizado. O uso de q-PCR também tem sido descrito para a quantificação de siRNA presente dentro da célula (LIU et al., 2009), porém esta técnica requer materiais caros e otimização do processo. Por outro lado, siRNA marcados com marcadores fluorescentes são comercialmente disponíveis, baratos, de fácil detecção e, portanto, frequentemente são usados para quantificar ou visualizar a internalização celular (VADER et al., 2010). Assim, para avaliar se o siRNA liberado da G-FFP é capaz de ser internalizado pelas células foi utilizado siRNA com marcador fluorescente (Alexa488 ou Alexa 647 siRNA).

A quantificação do siRNA marcado com marcador fluorescente normalmente é feita por citometria de fluxo, microscopia confocal ou medida da fluorescência do

lisado celular. Dependendo da técnica escolhida observa-se variações nas respostas obtidas devido ao problema de *quenching*. Vader et al. (2010) propôs um método para superar este problema. No método proposto, a medida da fluorescência foi realizada em células lisadas com tampão de lise contendo 2% de SDS para dissociar o siRNA dos complexos. De acordo com Vader et al. (2010) a internalização celular de siRNA determinada por citometria de fluxo ou microscopia pode ser subestimado, os autores reforçam a ideia de que medir a fluorescência após a adição de SDS 2% é a melhor metodologia para evitar o problema do *quenching* e obter resultados mais confiáveis (VADER et al., 2010). Na presente pesquisa, a quantificação da internalização do siRNA liberado da FFP e dos controles foi feita seguindo o protocolo proposto por Vader et al. (2010) (Figura 17 e 18). A microscopia confocal foi realizada para análise qualitativa do siRNA internalizado (Figura 19 e 20).

Avaliando a internalização celular do siRNA por medida da fluorescência em lisado celular pode-se observar que em todas as linhagens celulares avaliadas, com exceção da HeLa e MCF-7/DLC2-GFP, não houve diferenças estatísticas entre as células tratadas com o complexo lipofectamina/siRNA e as células não tratadas. Este resultado era esperado devido a rápida transfecção e eficiente escape endossomal do siRNA promovido pela lipofectamina, que libera rapidamente o siRNA no citoplasma, tornando-o disponível para a incorporação no complexo proteíco para a promoção de silenciamento gênico ou para ser degradado por RNAses do citosol. Assim, provavelmente após 48 h (tempo em que as células foram lisadas) pouco siRNA estava restando no interior das células. A microscopia confocal corrobora com estes dados, após 4 h de transfecção observa-se mais siRNA internalizado nas células tratadas com lipofectamina/siRNA do que após 48 h de transfecção.

Após 48 h de transfecção, o PEI em tampão tris foi o carreador que promoveu a maior internalização do siRNA em todas as linhagens celulares avaliadas, com exceção das células A431, na qual o carreador que promoveu a maior internalização foi a FFP. O siRNA veiculado pela FFP foi internalizado por todas as células quando administrado com uma concentração de 200 pmol/10^5 células, com exceção das células FaDu que não apresentaram diferenças estatísticas em relação as células não-tratadas.

Os resultados obtidos pela microscopia confocal após 48 h de transfecção corroboram com os dados da medida da fluorescência em lisado celular. Somente os resultados obtidos com as células MCF-7/DLC2-GFP tratadas com siRNA complexado

a FFP não corresponderam aos resultados da medida da fluorescência em lisado celular.

Pela análise dos resultados da microscopia confocal também pode-se observar que a lipofectamina promoveu uma rápida internalização do siRNA, enquanto a FFP promoveu uma internalização mais tardia do siRNA, o que já era esperado devido a liberação sustentada do siRNA a partir do G-FFP. Em relação a internalização do siRNA promovida pelo PEI em tampão tris, observou-se que, embora o complexo formado esteja disponível para a entrada na célula sem necessidade de ser liberado de um sistema, a internalização deste complexo também foi mais tardia em comparação com a internalização do complexo lipofectamina/siRNA. A diferença no tempo de internalização entre o complexo PEI/siRNA e lipofectamina/siRNA pode ser explicada pela diferença da via de entrada de cada complexo na célula.

Os lipoplexos são internalizados preferencialmente por endocitose mediada por clatrina enquanto os poliplexos são internalizados por endocitose mediada por caveolina e clatrina, sendo que a endocitose mediada por caveolina é a responsável pela internalização efetiva de ácidos nucléicos complexados a polímeros catiônicos (REJMAN; BRAGONZI; CONESE, 2005). É sabido que a internalização pela via clatrina é muito mais rápida que a internalização por via caveolina (FERREIRA et al., 2014; REJMAN; BRAGONZI; CONESE, 2005; WANG et al., 2016). Como por exemplo, em um estudo avaliando a transfecção de DNA, o máximo da expressão do gene luciferase foi atingido 15 min e 3 h após as células serem tratadas com lipoplexos de DOTAP e poliplexos de PEI (25 kDa), respectivamente (REJMAN; BRAGONZI; CONESE, 2005). Assim, as diferenças nas vias de entrada destes complexos podem explicar a diferença no tempo de internalização do siRNA veiculado por estes carreadores, porém, como a via de internalização é determinada por uma série de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas dos complexos e a linhagem celular, uma conclusão requer estudos mais detalhados sobre a interação entre estes complexos, a via de entrada e a linhagem celular.

A internalização celular nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP observada pelo vídeo foi interessante pois permitiu visualizar a transfecção de forma mais dinâmica, embora a qualidade das imagens apresente menor resolução quando comparado com a microscopia confocal (Figura 21). Pode-se observar que o siRNA foi internalizado pelas células e permanece mesmo após sucessivas divisões celulares. Também verificou-se que a concentração intracelular de siRNA aumenta ao

longo do tempo quando o mesmo é complexado com a FFP. O vídeo obtido das células MCF-7/DLC2-GFP corrobora com os resultados da medida da fluorescência em lisado celular e difere do obtido pela microscopia confocal. Provavelmente, ocorreu algum problema com as amostras das células MCF-7/DLC2-GFP tratadas com siRNA/FFP por 48 h e avaliadas por microscopia confocal, já que ficou evidente que após este período tem mais siRNA internalizado do que nas primeiras horas de transfecção, fato que também foi observado nas demais células.

A FFP foi eficiente para promover a internalização celular do siRNA em todas as linhagens celulares, mesmo nas células FaDu onde não se observou diferença estatística na medida da fluorescência em lisado celular, verificou-se uma pequena internalização por microscopia confocal. Assim, o próximo passo foi avaliar se o siRNA internalizado pelas células estavam disponíveis no citoplasma e eram capazes de se associar ao RISC e promover o silenciamento gênico.

A eficácia do siRNA em induzir o silenciamento gênico só pode ser medida experimentalmente com base na inibição da expressão do gene alvo (HUNG et al., 2006). Na presente pesquisa, a avaliação do silenciamento gênico foi feita com gene modelo exógeno (Firefy/Renilla luciferase) e gene endógeno de interesse (EGFR).

A avaliação do silenciamento de gene exógeno foi feita utilizando o gene que expressa luciferase. Estes genes podem expressar apenas a luciferase como também podem expressar proteínas de interesse acoplada a luciferase, neste último caso a luciferase age como gene repórter. O silenciamento de genes que expressam luciferase é medido pela capacidade da luciferase em transformar energia química em luminosa ao catalisar reações biológicas, tendo a luciferina como substrato (ALLARD; KOPISH, 2008). Muitos estudos avaliam a atividade de luciferase como indicador de sucesso de silenciamento gênico (CONDE et al., 2015; HUNG et al., 2006; KALINOWSKI et al., 2012; OISHI et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2005). A avaliação do silenciamento gênico medido pela atividade de luciferase fornece resultados confiáveis e de fácil obtenção por combinar a simplicidade e sensibilidade do ensaio com luciferase com a bem documentada e facilmente analisada proteína de referência (CONDE et al., 2015; HUNG et al., 2006).

A capacidade do siRNA liberado a partir do G-FFP em silenciar genes foi medida pela atividade da luciferase após a transfecção das células HeLa, A549 e FaDu com genes exógenos para a expressão de Firelfy e Renilla luciferase (Figura 22). Renilla luciferase é comumente usada como controle da transfecção

(KALINOWSKI et al., 2012), então, a atividade da firefly luciferase, nas células tratadas com siRNA específico para firefly luciferase e siRNA não-específico, foi normalizada pela atividade da renilla luciferase. Os resultados mostraram que o siRNA complexado a FFP e ao PEI foram mais eficientes do que o siRNA complexado a lipofectamina (controle positivo) em promover o silenciamento gênico nas células HeLa (90%, 94% e 76% de redução da expressão de Firefly luciferase, respectivamente). Em células FaDu, resultados semelhantes foram obtidos, porém as células tratadas com FFP apresentaram menor taxa de silenciamento do que as tratadas com PEI e lipofectamina. Estes resultados mostram que o PEI é o componente da formulação responsável pela veiculação efetiva do siRNA e que os demais componentes (MO, PG e tampão tris) não interferem. Porém, ao invés de usar somente o PEI como carreador do siRNA, o desenvolvimento de um sistema é vantajoso por promover uma liberação sustentada de siRNA, a qual é interessante para administração localizada de siRNA em ambientes com alta proliferação celular como por exemplo em câncer (HAN et al., 2011), regeneração de tecidos (NELSON et al., 2012) e formação de ossos (MANAKA et al., 2011). Além disso, o uso de sistemas de liberação sustentada e localizada pode permitir uma redução da dose administrada e aumentar o conforto e a adesão do paciente.

Embora o silenciamento de genes exógenos seja muito útil para avaliar a eficiência de um sistema em administrar efetivamente o siRNA esta avaliação é limitada em estudos que objetivam silenciar proteínas endógenas de interesse (CONDE et al., 2015). Assim, o próximo passo desta pesquisa foi avaliar o silenciamento gênico da proteína de interesse – EGFR.

Diferentes técnicas podem ser empregadas para determinar a eficácia do silenciamento gênico considerando os vários graus de complexidade celular, tais como o nível de transcrição, o nível de proteína e o nível fisiológico. PCR são normalmente empregados para avaliar o nível de transcrição e os dados obtidos fornecem informações sobre o aumento ou diminuição do gene alvo (CONDE et al., 2015; HOLMES et al., 2010). A abundância de RNAm transcritos se correlaciona parcialmente com o nível de proteína. Frequentemente, é relatado que o RNAm detectado pode predizer em apenas 40% o nível de proteína. Em células de mamíferos, RNAm são produzidos em taxas muito menores do que as proteínas, em média, duas moléculas de RNAm são produzidas por hora enquanto dezenas de cópias da proteína correspondente são traduzidas (VOGEL; MARCOTTE, 2012).

Estes dados mostram que a determinação do nível de proteína é o procedimento mais adequado para avaliar o silenciamento gênico (CONDE et al., 2015; HOLMES et al., 2010).

O Western Blot (WB) é a principal técnica utilizada para determinar proteínas e tem aplicação na avaliação do silenciamento gênico (HOLMES et al., 2010). No presente trabalho, o EGFR, que tem peso molecular de 170 kDa, foi detectado por WB (Figura 23 e Tabela 5). A avaliação do silenciamento de EGFR foi realizada nas células HeLa, A549, FaDu e A431. A maioria das células cultivadas de origem epitelial e de fibroblastos expressam EGFR em níveis de 5.000 a 2.000.000 por célula (SORKIN; DUEX, 2010). As células HeLa e A549 expressam EGFR (~ 5,3 $x10^5$ e 2,8$x10^5$ receptores/células, respectivamente) em taxas bem menores do que as células A431 (~1,2$x10^6$ receptores/células) (ZHANG et al., 2015). As células FaDu também expressam altas taxas de EGFR (~1$X10^6$ células/receptor) (BOUCEK et al., 2007).

β-actina (42 kDa) também foi detectada por WB. Esta proteína é expressa por todos os tipos de células eucarióticas em altas concentrações, sendo frequentemente utilizada como controle interno no WB. O uso de controle interno é necessário para a correta interpretação dos resultados obtidos no WB, sendo necessário para visualizar se a mesma quantidade de proteína das amostras foi utilizada em cada poço do gel. Ele também garante que as proteínas foram transferidas do gel para a membrana com a mesma eficácia e que houve uniformidade na incubação dos anticorpos e na detecção dos sinais (JOHNSON, 2012). Assim, a quantidade da expressão da proteína EGFR, determinada quantitativamente pelo NIH ImageJ, foi corrigida pela intensidade de β-actina (Intensidade da banda de EGFR/Intensidade da banda de β-actina).

Vários fatores podem influenciar a eficiência de silenciamento de um gene de interesse tais como a eficiência de transfecção, a eficácia da sequência de siRNA escolhida, a taxa de transcrição do gene de interesse, a estabilidade da proteína e as caracteristicas de crescimento da linhagem celular avaliada (INVITROGEN CORPORATION, 2002).

Apenas um número limitado de siRNAs é capaz de induzir altas taxas de silenciamento de genes alvo especificamente (HUNG et al., 2006; UI-TEI et al., 2004). Além disso, a eficácia de siRNAs é dependente da especificidade das sequências alvo dentro de um gene (HUNG et al., 2006). Na tentativa de facilitar o delineamento da

sequência de siRNAs que são altamente efetivos, Ui-Tei et al. (2004) avaliaram extensivamente 62 alvos de genes endógenos e exógenos e apresentaram regras que podem guiar a escolha do sequenciamento de siRNA com alto efeito de silenciamento gênico (UI-TEI et al., 2004). Na presente pesquisa, pelos resultados de silenciamento obtidos quando o mesmo foi complexado a lipofectamina, pode-se afirmar que os siRNAs específicos para EGFR usados foram efetivos para silenciar a expressão de EGFR em todas as linhagens celulares avaliadas. Vale a pena notar também que a administração de siRNA não-específico não promoveu nenhuma redução na expressão do EGFR, indicando que o siRNA é específico, como relatado na literatura (SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009), o que torna o siRNA uma interessante terapia para as mais diversas doenças com mínimo efeito colateral.

O siRNA complexado ao PEI foi capaz de silenciar a expressão de EGFR de modo similar ao complexado com lipofectamina em algumas linhagens celulares (A549, HeLa e A431), enquanto o siRNA complexado a FFP não promoveu silenciamento em nenhuma das linhagens celulares avaliadas. Os resultados obtidos são intrigantes, porque é difícil explicar como siRNA complexado a 0,65% de PEI em tampão tris promoveu o silenciamento do EGFR mas não quando liberado da formulação. Uma possível explicação é que o complexo siRNA-PEI liberado do G-FFP pode ter quantidade de PEI, flexibilidade conformacional e densidade de carga catiônica diferente do complexo siRNA-PEI formado em tampão tris. E como descrito na literatura, a eficiência de sistemas de liberação obtidos com PEI são influenciados por muitas características deste polímero, como a estrutura e peso molecular, potencial zeta, potencial iônico da solução, tamanho de partícula, sequência e flexibilidade conformacional e densidade de carga catiônica (BEYERLE et al., 2011). Assim, provavelmente, o complexo siRNA-PEI liberado do G-FFP tem características menos favoráveis para a sua entrada na célula (como mostrado nos estudos de internalização celular) e, principalmente, para a promoção do escape endossomal, o que pode ter dificultado a liberação do siRNA no citoplasma e, consequentemente, não se observou o silenciamento da expressão de EGFR. A falta de relação direta entre a eficiência de internalização celular e o silenciamento gênico e a importância do escape endossomal para se ter o silenciamento do gene de interesse também foi observada em um estudo com dois PEIs modificados (DPPE-PEI e DOPE-PEI) veiculando siRNA. O DOPE-PEI foi mais efetivo em promover o silenciamento gênico,

embora os dois tenham apresentado a mesma interação com a membrana celular e promovido internalização similar do siRNA. Isto porque, o DOPE-PEI promoveu um melhor escape endossomal do siRNA quando comparado com o DPPE-PEI (NAVARRO et al., 2014).

A eficiência na promoção do escape endossomal de um complexo carreador/siRNA está diretamente relacionada a via de entrada na célula deste complexo e as suas características. Como descrito acima na introdução e nesta discussão, poliplexos complexados a ácidos nucléicos são internalizados por endocitose mediada por clatrina e caveolina, enquanto os lipoplexos são preferencialmente internalizados por endocitose mediada por clatrina (KAPOOR; BURGESS, 2013; KIM; PARK; SONG, 2013; REJMAN; BRAGONZI; CONESE, 2005; REJMAN; CONESE; HOEKSTRA, 2006). Como os poliplexos internalizados por caveolina sofrem escape endossomal pelo “efeito esponja de prótons”, neste trabalho, supõe-se que o complexo PEI/siRNA liberado do G-FFP, quando internalizado pela via caveolina, provavelmente, tem características menos favoráveis para a promoção do “efeito esponja de prótons” do que o complexo PEI/siRNA em tampão tris, assim, pouco siRNA é liberado no citoplasma. Também pode ser que a presença de lipídeos anfifílicos na formulação favoreça uma maior internalização pela via clatrina do que normalmente ocorre com os poliplexos, mas neste caso, os lipídeos anfifílicos parecem não promoverem a desestabilização da membrana celular e assim não se tem o escape endossomal. Vale a pena também ressaltar que embora muitos estudos têm mostrado que a maioria dos sistemas não-virais entram na célula por endocitose, esta via parece não contribuir significativamente para a liberação efetiva de siRNA no citoplasma. A fusão dos lipoplexos com a membrana plasmática parece ser a via de entrada responsável por permitir a liberação do siRNA no citoplasma de forma efetiva (LU; LANGER; CHEN, 2009). Assim, a via de entrada, que é determinada principalmente pelas características do complexo, tem uma grande influência no destino do siRNA no interior da célula. Nesta análise, suposições do que pode ocorrer com o sistema desenvolvido ao interagir com as células foram feitas, porém, estudos futuros são necessários para entender a via de entrada e o tráfego intracelular do siRNA liberado pelo G-FFP.

Deste estudo de silenciamento da expressão de EGFR, também vale ressaltar que a taxa de silenciamento promovido pelo EGFR siRNA carreado pelo PEI e lipofectamina nas células A549 e HeLa foram menores do que o silenciamento

promovido na expressão de Firefly luciferase. Isto pode ser devido a diferenças na taxa de transcrição, tempo de meia-vida e estabilidade da proteína EGFR e da proteína Firefly luciferase. A produção e a manutenção de proteína celular envolvem uma série de processos relacionados que abrangem a transcrição, o processamento e a degradação de RNAms, a localização, a modificação e a destruição programada das próprias proteínas. A abundância da proteína reflete um equilíbrio dinâmico entre estes processos e isto varia para cada tipo de proteína (VOGEL; MARCOTTE, 2012).

Como explicado acima, o balanço entre a inibição e expressão de uma proteína é bastante delicado. André et al. (2006) mostrou que a inibição de proteínas de interesse usando nanosistemas é dependente do tempo de tratamento das células com siRNA. No presente estudo, avaliou-se o silenciamento em diferentes tempos (48 e 72 h), porém resultados similares foram encontrados. Também foi realizado estudo de silenciamento da expressão de EGFR usando meio de cultura sem SFB, obtendo-se os mesmos resultados. Este estudo foi importante porque mostrou que a falta de efeito do siRNA complexado a FFP não é devido a uma possível degradação do siRNA, comprovando os resultados de que o mesmo é liberado do sistema complexado ao PEI e isto o protege da degradação, corroborando com os resultados da estabilidade do siRNA realizado em eletroforese.

Como discutido na introdução e acima nesta discussão, vários estudos mostram que muitos sistemas são capazes de promoverem a internalização celular do siRNA, mas falham na promoção do silenciamento gênico (KAPOOR; BURGESS, 2013; NAVARRO et al., 2014). Este fato é normalmente associado a uma ineficiência do escape endossomal, que é mostrado por muitos autores como o principal desafio à administração efetiva de siRNA (BEYERLE et al., 2011; GÜNTHER et al., 2011; KAPOOR; BURGESS, 2013; NAVARRO et al., 2014; SCHROEDER et al., 2010). Para avaliar se a falta de eficácia no silenciamento de EGFR quando o siRNA foi veiculado por FFP é devido a deficiência no escape endosomal, IFQ foi associada ao tratamento nas células A549.

IFQ é uma tecnologia que melhora o escape endossomal de moléculas que estão dentro de vesículas endossomais. Foi primeiro demonstrada em 1999 como uma nova tecnologia para a liberação de diversas moléculas no citosol (BERG et al., 1999). Desde então, muitos estudos têm sido publicados mostrando que esta técnica pode ser utilizada tanto *in vitro* quanto *in vivo* para a liberação de macromoléculas (SELBO et al., 2010). Em 2007, foi publicado o primeiro trabalho que utilizou IFQ para

aumentar o escape endossomal de siRNA (OLIVEIRA et al., 2007). Os estudos mostraram um potente silenciamento gênico promovido por siRNA quando compararam células tratadas com IFQ com células não tratadas com IFQ (OLIVEIRA et al., 2007; RAEMDONCK et al., 2009).

A tecnologia da IFQ emprega, preferencialmente, FS anfifílicos que acumulam nas membranas das vesículas endocíticas. Após iluminação, os FS se tornam excitados, e então, induzem a criação de espécies reativas de oxigênio, principalmente oxigênio singleto. Este intermediário altamente reativo pode danificar os componentes celulares, mas o pequeno raio de ação e o tempo de vida curto restringem o efeito prejudicial para o local de produção. Este efeito localizado promove o rompimento das vesículas endocíticas, liberando assim as moléculas terapêuticas presentes na vesícula no citosol (BERG et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2007).

Dependendo da concentração de FS e do tempo de exposição a luz, o efeito pode resultar na liberação de siRNA no citosol ou na citotoxicidade. Portanto, foi necessário determinar a melhor condição para a promoção do escape endossomal (Figura 24). O tratamento das células A549 com IFQ promoveu uma redução (35%) na expressão do EGFR quando o EGFR siRNA foi administrado com a FFP em comparação as células não tratadas, mostrando que ao aumentar a eficiência de escape endossomal é observado o silenciamento gênico (Figura 25). Porém, este estudo teve limitações porque não houve diferenças estatísticas entre as células tratadas com siRNA/FFP e IFQ dos demais tratamentos combinados à IFQ. Pode-se observar que ao tratarmos as células com IFQ houve uma redução na expressão do EGFR das células que não foram tratadas com siRNA, o que pode ser devido a citotoxicidade desta técnica. Embora nossa proposta é para terapia do câncer e a citotoxicidade é uma preocupação menor, que poderia ser até considerada um adjuvante (OLIVEIRA et al., 2007), precisamos avaliar estes riscos e definir os melhores parâmetros a serem empregados para esta terapia.

Os estudos *in vitro* usando culturas celulares mostraram que as diferentes linhagens celulares apresentaram diferentes eficiências de internalização e de silenciamento gênico ao serem tratadas com siRNA complexado a FFP, PEI ou lipofectamina, em suma, os principais resultados para cada linhagem celular são:

- Células A431: o G-FFP foi mais eficiente do que o PEI em tampão tris e a lipofectamina na promoção da internalização celular do siRNA, mas o siRNA internalizado não promoveu silenciamento da expressão de EGFR. Esta observação

nos mostra que não há uma relação direta entre a eficiência de internalização celular do siRNA e a promoção do silenciamento gênico, o que provavelmente se deve a problemas no escape endossomal, como discutido acima. Além disto, vale ressaltar que nestas células o siRNA complexado ao PEI, mesmo tendo uma menor internalização celular do que o complexado a G-FFP promoveu silenciamento de EGFR, assim, como discutido anteriormente o PEI parece ter características mais favoráveis para promover o escape endossomal do que o complexo PEI/siRNA liberado do G-FFP.

- Células FaDu: não houve diferença estatística na internalização do siRNA entre as células tratadas com G-FFP/siRNA e as células controle (não-tratadas), apenas foi observado pequena internalização de siRNA por microscopia confocal. A pequena quantidade de siRNA no interior da célula foi capaz de promover um silenciamento de Firefly luciferase de 58%. Porém, o siRNA internalizado não foi capaz de silenciar a expressão da proteína endógena EGFR. Já as células tratadas com o complexo PEI/siRNA em tampão tris tiveram uma eficiente internalização do siRNA, foram capazes de silenciar a expressão de Firefly luciferase, porém, também não foram capazes de silenciar a expressão de EGFR. A diferença entre silenciamento da expressão de Firefly luciferase e EGFR pode ser devido às diferenças no processo que regula a expressão da proteína, como discutido acima.

- Células HeLa: houve uma maior internalização celular do siRNA complexado ao PEI em comparação ao complexado com G-FFP, porém o silenciamento da atividade da Firefly luciferase foi similar nos dois tratamentos e ambos foram mais eficientes do que a lipofectamina em promover este silenciamento. Quanto ao silenciamento de EGFR, o siRNA complexado ao PEI promoveu silenciamento semelhante a lipofectamina e o siRNA complexado a G-FFP não promoveu silenciamento. Assim como observado nas células A431 e FaDu, não houve correlação entre internalização celular e o silenciamento gênico. Estes resultados nos indicam que o PEI, como ocorrido também com as células A431, provavelmente foi mais eficiente do que a FFP em promover o escape endossomal.

- Células A549: o perfil de internalização do siRNA nas células tratadas com siRNA complexado ao PEI e a FFP foi similar. No silenciamento da atividade de firefly luciferase não houve diferenças estatísticas entre as células tratadas com siRNA não-específico das tratadas com siLuc para o siRNA complexado a todos os carreadores, portanto, nesta linhagem celular os carreadores avaliados parecem não terem

conseguido liberar o siRNA no citoplasma de forma a obter o silenciamento do gene exógeno. Na avaliação do silenciamento do EGFR foi observado silenciamento das células tratadas com PEI/siRNA, mas não foi observado silenciamento nas células tratadas com FFP/siRNA. Este resultado é intrigante pois ocorreu silenciamento do gene endógeno tratado com siRNA complexado ao PEI mas não ocorreu silenciamento do gene exógeno tratado com o mesmo complexo. Estes resultados mostram que muitos fatores estão envolvidos na resposta celular quando uma transfecção acontece e que não é simples desenvolver um sistema que será eficiente em todas as condições. Ao combinar a IFQ com o tratamento com siRNA-EGFR observou-se um aumento no silenciamento das células tratadas com siRNA/G-FFP. Este resultado pode indicar que nesta linhagem celular, a falta de eficiência no silenciamento do gene endógeno, provavelmente, foi devido a problemas com o escape endossomal do siRNA liberado do G-FFP.

- Células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP: houve internalização celular quando as células foram tratadas com siRNA complexado ao PEI e a FFP. O silenciamento gênico nestas linhagens foi avaliado usando o GFP como gene repórter do gene que expressa DLC2 e está apresentado e discutido no Apêndice 1.

Além dos estudos *in vitro* com células, também realizamos um estudo piloto em animais. Neste piloto o objetivo principal foi avaliar se a FFP era capaz de formar gel *in situ* após administrada intratumoralmente com ou sem siRNA (EGFR siRNA). Embora a administração subcutânea desta formulação FFP tenha mostrado que é possível obter um gel subcutâneo (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015), é necessário avaliar esta formação em tumores que são ambientes mais hostis do que o tecido subcutâneo. O tumor é um ambiente complexo com alterações anatômicas e fisiológicas do tecido. O crescimento desordenado das células cancerígenas favorece a obtenção de uma massa tumoral irregular, altamente vascularizada e com baixa drenagem linfática, que resulta em um efeito de permeabilidade e retenção aumentada (BERTRAND et al., 2014). Assim, este piloto serviria para responder a primeira questão (sobre a formação de gel intratumoral) e também forneceria dados preliminares sobre a terapia de dose única usando EGFR siRNA e FFP para o tratamento do câncer de pele.

Para avaliarmos a formação de gel intratumoral e a eficiência deste sistema em promover redução no tamanho do tumor, é necessário ter um modelo *in vivo* adequado. Em termos de modelos tumorais, eles podem ser obtidos após a exposição

repetida a carcinógenos ou pela inoculação de células tumorais. Os modelos tumorais que normalmente se originam após a exposição a carcinógenos, radiação, vírus ou bactérias mimetizam a situação clínica muito bem, mas muitos obstáculos existem para implantação destes modelos, como por exemplo, o tempo necessário para desenvolvimento do tumor e a padronização dos tumores obtidos. Diferentemente, a inoculação de células tumorais subcutaneamente no dorso de camundongos nude tem sido amplamente utilizada como um modelo de fácil obtenção para o estudo das terapias anti-câncer (GUO et al., 2011).

A inoculação de células A431 no dorso de camundongos nude realizada nesta pesquisa foi efetiva para a obtenção dos tumores subcutâneos. A FFP contendo ou não siRNA forma um gel *in situ* após ser administrada intratumoralmente (Figura 26). Vale a pena ressaltar que o gel não foi formado como um único ponto localizado, mas se espalhou dentro do tumor, embora houvesse um local de maior formação de gel correspondendo ao local que a FFP foi aplicada. Foi possível observar a presença do gel no tumor pelo período do experimento, ou seja, por 14 dias o gel se manteve no tecido tumoral. Este resultado indica que o processo de degradação do gel no tumor é semelhante ao processo de degradação do gel no tecido subcutâneo (BORGHETI-CARDOSO et al., 2015).

Após o sacrifício dos animais, os tumores foram usados para avaliar a expressão de EGFR por WB (Figura 27) e IHQ (Figura 29) e também foi quantificado o RNAm por RT-PCR (Figura 28). Na presente pesquisa foi observado uma correlação entre os resultados obtidos por RT-PCR e WB, ou seja, não foi observado nem a diminuição da expressão de RNAm nem da proteína EGFR após 24 h, 7 e 14 dias de tratamento do tumor com injeção intratumoral de EGFR siRNA complexado a FFP.

A análise por IHQ mostrou regiões com forte coloração marrom indicativa da presença de EGFR e outras com ausência da expressão de EGFR. Para avaliar se esta diferença é devido a ação do EGFR siRNA liberado da FFP e não devido a presença do gel no tecido, os cortes corados com H&E e os corados com IHQ foram comparados. Desta comparação observou-se que as áreas com gel correspondem as áreas onde não há coloração de EGFR, assim, não se pode afirmar que o EFGR siRNA liberado da FFP foi capaz de reduzir a expressão de EGFR, pois as imagens mostram que não tem a coloração marrom onde há pouco ou não há tecido tumoral.

O tamanho dos tumores avaliados mostrou que após 3 dias da administração da FFP complexada ao EGFR siRNA houve uma redução de tamanho de 30%

comparado com os tumores tratados com FFP sem siRNA (Figura 30). Para se ter uma redução no tamanho dos tumores, os seguintes passos precisariam ser cumpridos: siRNA seria liberado do G-FFP, internalizado pelas células, liberado no citoplasma e se ligaria ao RISC promovendo degradação do RNAm que, então, não seria traduzido na proteína EGFR e, assim, após o tempo de meia-vida da proteína haveria uma diminuição da expressão deste receptor e os mecanismos de proliferação celular, diferenciação, invasão, migração, adesão, sobrevivência e reparação celular desencadeados por este receptor seriam reduzidos e finalmente observaríamos uma redução no tamanho do tumor. Assim, não era esperada diferença no tamanho dos tumores no tempo de 24 h. A redução do tumor em 3 dias indica que todo este processo ocorreu: o siRNA foi liberado do gel e a expressão do EGFR foi silenciada promovendo uma redução do tumor. Porém, após 6 dias nenhuma redução significativa foi observada.

Vários fatores podem ter contribuído para a não redução do tumor após 6 dias: a dose de siRNA liberada de maneira sustentada pode não ter sido suficiente para manter e aumentar o efeito promovido pela terapia por RNAi; a administração de dose única de siRNA, embora tenha sido usada com sucesso em outro estudo com administração intratumoral de hidrogel contendo nano-poliplexos para liberação de siRNA específico para fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (KIM; PARK; SONG, 2013), pode, neste estudo, não ter sido efetiva devido a alta taxa de multiplicação celular no tumor. Outro fator importante a ser considerado é que a terapia do câncer com um único gene-alvo pode resultar em efeitos terapêuticos limitados uma vez que o câncer é uma doença complexa e relacionada a diversas desordens genéticas (LEE et al., 2015). Alguns estudos estão avaliando o uso de múltiplos siRNAs na terapia do câncer e os resultados mostram que esta estratégia está sendo bem sucedida (CHEN et al., 2013; LEE et al., 2015; SHIBATA et al., 2008; TAI; QIN; CHENG, 2010).

A redução do tumor por EGFR siRNA também foi avaliada por Zhang et al. (2013) usando um complexo de siRNA com PEI linear. Camundongos nude com tumores subcutâneos de células pulmonares cancerígenas foram tratadas repetidamente (2-3 vezes por semana) por injeção intraperitoneal com o complexo de siRNA-PEI linear. Os resultados mostraram que houve diferenças significativas entre os tamanhos dos tumores dos grupos tratados com EGFR siRNA e controle após 10 dias de tratamento e que, no 22º dia de tratamento, a redução foi de 50% (ZHANG et

al., 2013). Outro estudo usou PEI ramificado para formar complexos com siRNA e demonstrou que o silenciamento de EGFR e do Receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR2) por siRNAs específicos combinados com baixa dose de cisplatina (inibe o crescimento do tumor por citotoxicidade) foi mais efetivo para inibir o crescimento do tumor e aumentar o tempo de sobrevida dos camundongos do que quando cada terapia foi utilizada separadamente (CHEN et al., 2013). Isto nos mostra que, embora o EGFR seja um alvo importante para a terapia do câncer, a inibição de outros alvos pode ser necessária para a efetiva terapia anti-câncer.

O fato de que não apenas as vias de sinalização de EGFR podem promover a proliferação celular, e de que as células cancerígenas podem utilizar múltiplas vias intracelulares para superar o bloqueio de um receptor ou proteína em particular, sinaliza que a inibição de um único receptor pode não ser o ideal. Portanto, a inibição de vias alternativas e combinações entre os inibidores de EGFR e medicamentos para inibir outros receptores são requisitados para mostrar um benefício real no tratamento de tumores. No entanto, deve-se ter em mente que a combinação de diferentes fármacos poderia dar origem às questões farmacodinâmicas e farmacocinéticas associadas com formulações, as quais devem ser cuidadosamente avaliadas. Neste contexto, o uso de siRNA parece promissor, uma vez que apenas a sequência de nucleotídeos muda enquanto o mesmo carreador pode ser utilizado para a administração deste.

6. CONCLUSÃO

Os experimentos realizados nesta pesquisa e a discussão dos seus resultados permitiram concluir que:

- A FFP composta de MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p) em excesso de água forma um gel caracterizado como uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal. A presença de siRNA complexada a FFP não altera a estrutura líquido cristalina do gel formado em excesso de água, mas aumenta o parâmetro de rede;
- O estudo de liberação *in vitro* mostrou que o gel obtido a partir da FFP libera o siRNA de maneira sustentada e o siRNA é liberado complexado ao PEI;
- A FFP pode ser eficientemente esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm;
- A FFP foi capaz de complexar até 15 mM de siRNA e de proteger o siRNA da degradação como mostrado no ensaio usando 25% de SFB;
- A citotoxicidade da FFP é proporcional ao volume de FFP administrado às células e o siRNA complexado à FFP diminui a citotoxicidade da mesma nas células A431, A549, FaDu e HeLa;
- O siRNA liberado do G-FFP foi internalizado por todas as linhagens celulares avaliadas (A431, FaDu, HeLa, A549, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GF) e a quantidade de siRNA internalizado é dependente da linhagem celular;
- O siRNA liberado do G-FFP foi capaz de promover silenciamento da expressão gênica de firefly luciferase (gene exógeno modelo) nas células HeLa e FaDu. Nas células A549 não hove diferença entre as células tratadas com siRNA não-especifico e siLuc para todos os carreadores avaliados. Esta avaliação do silenciamento gênico não foi realizada para as demais linhagens celulares (A431, WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GF);
- O siRNA liberado do G-FFP não foi capaz de promover silenciamento da expressão de EGFR (proteína endógena alvo) nas células A431, FaDu, A549 e HeLa. O complexo PEI/siRNA em tampão tris promoveu o silencimaneto desta proteína nas células A431, A549 e HeLa. Esta avaliação do silenciamento gênico não foi realizada nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GF;
- A FFP administrada intratumoralmente forma gel *in situ* que permanece no tecido tumoral por pelo menos 14 dias;
- No estudo piloto com camundongos nude administrando FFP complexada ou não com EGFR siRNA, não foi observada redução na expressão de EGFR por WB ou IHQ, nem a redução de RNAm por RT-PCR nos tumores 24 h, 7 e 14 dias após administração da FFP com siRNA. A FFP complexada com EGFR siRNA promoveu

uma redução de 30% no tamanho do tumor 3 dias após a administração intratumoral quando comparado com a FFP sem siRNA.

Estes experimentos também permitiram confirmar quão desafiador é a administração terapêutia de siRNA. Observou-se que:

- Não há uma relação direta entre a eficiência de internalização celular e eficiência de silenciamento gênico promovida pelo sistema desenvolvido;
- A falta de eficiência em silenciar a proteína de interesse pode ser devido a problemas de escape endossomal, mas também devido a características da própria proteína como tempo de meia-vida, taxa de transcrição, quantidade e localização na célula.

Em suma, o gel obtido a partir da FFP composta de MO/PEI/PG/tampão tris 7,85:0,65:76,5:15 (p/p/p/p) em excesso de água, caracterizado como uma mistura de fase cúbica e hexagonal, libera o siRNA de maneira sustentada e complexado ao PEI. A FFP é capaz de complexar e proteger altas concentrações de siRNA, promover a sua internalização celular e o silenciamento de genes de interesse. A capacidade de internalizar e promover o silenciamento gênico é célula dependente e proteína alvo dependente. Além disto, a FFP forma gel *in situ* após ser administrada intratumoralmente, e uma única dose de siRNA EGFR aplicada intratumoralmente resultou em 30% de redução no tamanho do tumor após 3 dias da administração.

Diante dos resultados obtidos, considera-se o sistema de liberação desenvolvido para administração localizada de siRNA eficiente, deixando várias perspectivas para sua otimização, incluindo a possibilidade de ser um sistema para administração de siRNAs para diferentes alvos, objetivando uma terapia anti-câncer efetiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. et al. siRNA-mediated down-regulation of P-glycoprotein in a Xenograft tumor model in NOD-SCID mice. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2516–2529, 2011.

AGARWAL, P.; RUPENTHAL, I. D. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs. **Drug Discovery Today**, v. 18, p. 337–349, 2013.

AHMED, A. R.; DASHEVSKY, A.; BODMEIER, R. Drug release from and sterilization of in situ cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 375–380, 2010.

ALLARD, S. T. M.; KOPISH, K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. **Cell Notes - Promega wbsite**, n. 21, p. 23–26, 2008.

ALVAREZ, R. et al. RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3952–62, 2009.

AMAR-YULI, I. et al. Hexosome and hexagonal phases mediated by hydration and polymeric stabilizer. **Langmuir**, v. 23, n. 7, p. 3637–3645, 2007.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of nutraceuticals into reverse hexagonal mesophases. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, p. 10171–10180, 2008.

AMAR-YULI, I.; GARTI, N. Transitions induced by solubilized fat into reverse hexagonal mesophases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 43, n. 2, p. 72–82, 2005.

ARIMA, H. et al. Folate-PEG-appended dendrimer conjugate with alpha-cyclodextrin as a novel cancer cell-selective siRNA delivery carrier. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, p. 2591–2604, 2012.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 8–18, 2001.

BARO, M. et al. Dasatinib worsens the effect of cetuximab in combination with fractionated radiotherapy in FaDu- and A431-derived xenografted tumours. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 7, p. 1310–1318, 2014.

BERG, K. et al. Photochemical Internalization : A Novel Technology for Delivery of Macromolecules into Cytosol. **Cancer Research**, v. 59, p. 1180–1183, 1999.

BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2–25, 2014.

BEYERLE, A. et al. Comparative in vivo study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 1, p. 51–56, 2011.

BITKO, V. et al. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. **Nature**

Medicine, v. 11, p. 50–55, 2005.

BORGES, A. C. **Expressão de um fragmento da Miosina Va inibe o crescimento de tumores de melanoma induzidos em modelo animal**. [s.l.] Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2012.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. In situ gelling for sustained drug delivery. In: **Recent Advances in Drug Delivery Research**. [s.l.] Nova Sciences Publishers, Inc., 2013. p. 97–126.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. Self-assembling gelling formulation based on a crystalline-phase liquid as a non-viral vector for siRNA delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 1, p. 72–82, 2014.

BORGHETI-CARDOSO, L. N. et al. An in situ gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, p. 103–117, 2015.

BORNÉ, J.; NYLANDER, T.; KHAN, A. Phase Behavior and Aggregate Formation for the Aqueous Monoolein System Mixed with Sodium Oleate and Oleic Acid. **Langmuir**, v. 17, n. 25, p. 7742–7751, 2001.

BORRA, R. C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 3, p. 255–262, 2009.

BOUCEK, J. et al. In vitro efficacy of HPMA based conjugates containing doxorubicin and anti-EGFR mAb. **Molecular Cancer Therapeutics - Novel Drug Delivery Systems: Poster Presentations**, v. 6, p. C116, 2007.

BROWN, M. S. et al. CK2 modulation of NF-kappaB, TP53, and the malignant phenotype in head and neck cancer by anti-CK2 oligonucleotides in vitro or in vivo via sub-50-nm nanocapsules. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 2295–2307, 2010.

BUMCROT, D. et al. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 711–719, 2006.

CAMPOCHIARO, P. A. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. **Gene therapy**, v. 13, n. 6, p. 559–562, 2006.

CAPECCHI, M. R. Altering the Genome Homologous Recombination. **Science**, v. 244, n. 1, p. 1288–1292, 1989.

CHANG, C. M.; BODMEIER, R. Binding of drugs to monoglyceride-based drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 147, n. 2, p. 135–142, 1997a.

CHANG, C. M.; BODMEIER, R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p. 747–752, 1997b.

CHANG, C. M.; BODMEIER, R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. **International Journal of**

Pharmaceutics, v. 173, n. 1-2, p. 51–60, 1998.

CHEN, G. et al. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells : the effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab. **BMC Medicine**, v. 10, n. 28, p. 1–15, 2012.

CHEN, S. et al. Combination therapy with VEGFR2 and EGFR siRNA enhances the antitumor effect of cisplatin in non-small cell lung cancer xenografts. **Oncology Reports**, v. 29, n. 1, p. 260–8, 2013.

CHO, H. J. et al. Poly-L-arginine and dextran sulfate-based nanocomplex for epidermal growth factor receptor (EGFR) siRNA delivery: its application for head and neck cancer treatment. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1007–1019, 2012.

CHOI, E. J. et al. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor – Associated Signaling Pathways in Non – Small Cell Lung Cancer Cells: Implication in Radiation Response. **Molecular Cancer Research**, v. 8, p. 1027–1036, 2010.

CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 1160–1174, 2008.

CLARKE, P. Nonmelanoma skin cancers: Treatment options. **Australian Family Physician**, v. 41, n. 7, p. 476–480, 2012.

CONDE, J. et al. 15 years on siRNA delivery : Beyond the State-of-the-Art on inorganic nanoparticles for RNAi therapeutics. **Nano Today**, v. 10, p. 421–450, 2015.

D'ORAZIO, J. et al. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12222–12248, 2013.

DAKA, A.; PEER, D. RNAi-based nanomedicines for targeted personalized therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1508–1521, 2012.

DAVID, S. et al. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 100–114, 2010.

DAY, C. L. et al. Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands. **The Biochemical Journal**, v. 377, p. 597–605, 2004.

DE PAULA, D.; BENTLEY, M. V; MAHATO, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. **RNA**, v. 13, p. 431–456, 2007.

DEVINCENZO, J. et al. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). **Antiviral Research**, v. 77, n. 3, p. 225–231, 2008.

DEVINCENZO, J. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of an RNAi-based therapy directed against respiratory syncytial virus. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 107, p. 8800–8805, 2010.

EIBLMAIER, M. et al. Correlating EGFR Expression with Receptor-Binding Properties and Internalization of 64Cu-DOTA-Cetuximab in 5 Cervical Cancer Cell Lines. **Journal**

of Nuclear Medicine, v. 49, n. 9, p. 1472–1479, 2008.

ELBASHIR, S. M. et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods**, v. 26, p. 199–213, 2002.

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

ENGSTROM, S.; ENGSTROM, L. Phase behaviour of the lidocaine-monoolein-water system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, p. 113–122, 1992.

ERNFORS, P. Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1397–1407, 2010.

FERGUSON, K. M. Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, p. 742–745, 2004.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. E359–E386, 2015.

FERREIRA, L. A. B. et al. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149–166, 2014.

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

FONG, W. K.; HANLEY, T.; BOYD, B. J. Stimuli responsive liquid crystals provide “on-demand” drug delivery in vitro and in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 135, n. 3, p. 218–226, 2009.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH , neutral red , MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171–177, 2006.

FRÖHLICH, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5577–5591, 2012.

GARCIA-URIBE, A. et al. In Vivo Diagnosis of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer Using Oblique Incidence Diffuse Reflectance Spectrometry. **Cancer Research**, v. 72, n. 11, p. 1–8, 2012.

GATZEMEIER, U. et al. Phase III Study of Erlotinib in Combination With Cisplatin and Gemcitabine in Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer: The Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 12, p. 1545–1552, 2007.

GHOSN, B. et al. Efficient gene silencing in lungs and liver using imidazole-modified chitosan as a nanocarrier for small interfering RNA. **Oligonucleotides**, v. 20, n. 3, p. 163–172, 2010.

GILLERON, J. et al. Image-based analysis of lipid nanoparticle – mediated siRNA delivery , intracellular trafficking and endosomal escape. **Nature Biotechnology**, v.

31, n. 7, p. 638–646, 2013.

GÜNTHER, M. et al. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 438–449, 2011.

GUO, J. et al. Can non-viral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics? **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 4, p. 402–417, 2011.

GUO, S.; KEMPHUES, K. J. par-1, a Gene Required for Establishing Polarity in C . elegans Embryos , Encodes a Putative Ser/Thr Kinase That Is Asymmetrically Distributed. **Cell**, v. 81, p. 611–620, 1995.

GUZMAN-VILLANUEVA, D. et al. Formulation approaches to short interfering RNA and MicroRNA: Challenges and Implications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 11, p. 4046–4066, 2012.

HAN, H. D. et al. Chitosan hydrogel for localized gene silencing. **Cancer Biology and Therapy**, v. 11, n. 9, p. 839–845, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HATEFI, A.; AMSDEN, B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 80, p. 9–28, 2002.

HERBST, R. S. et al. Gefitinib in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Non – Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial — INTACT 2. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 5, p. 785–794, 2004.

HOLMES, K. et al. Detection of siRNA induced mRNA silencing by RT-qPCR: considerations for experimental design. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 53, p. 1–5, 2010.

HOUBEN, E.; DE PAEPE, K.; ROGIERS, V. A keratinocyte's course of life. **Skin pharmacology and physiology**, v. 20, n. 3, p. 122–32, 2007.

HSU, S. H. et al. Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. **Nanomedicine**, v. 9, p. 1169–1180, 2013.

HUNG, C. et al. A novel siRNA validation system for functional screening and identification of effective RNAi probes in mammalian cells. v. 346, p. 707–720, 2006.

INVITROGEN CORPORATION. **Transfecting siRNA into Mammalian Cells Using Lipofectamine™ 2000**. Disponível em: <www.thermofisher.com>. Acesso em: 7 fev. 2014.

IZIDORO-TOLEDO, T. C. et al. A myosin-Va tail fragment sequesters dynein light chains leading to apoptosis in melanoma cells. **Cell death & disease**, v. 4, n. e547, p. 1–14, 2013.

JACOBSON, G. B. et al. Biodegradable nanoparticles with sustained release of functional siRNA in skin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 4261–4266, 2010.

JOHNSON, M. Loading Controls for Western Blots. **Mater Methods**, v. 2, p. 114, 2012.

JORGENSEN, R. A. et al. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 31, p. 957–973, 1996.

KALINOWSKI, F. C. et al. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling and Erlotinib Sensitivity in Head and Neck Cancer Cells by miR-7. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47067, 2012.

KAPOOR, M.; BURGESS, D. J. Cellular Uptake Mechanisms of Novel Anionic siRNA Lipoplexes. **Pharmaceutical Research**, v. 30, p. 1161–1175, 2013.

KIM, S. H. W. H. W. et al. Local and systemic delivery of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles for effective treatment of cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 129, n. 2, p. 107–116, 2008.

KIM, Y. M.; PARK, M. R.; SONG, S. C. Injectable polyplex hydrogel for localized and long-term delivery of siRNA. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 5757–5766, 2012.

KIM, Y. M.; PARK, M. R.; SONG, S. C. An injectable cell penetrable nano-polyplex hydrogel for localized siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 34, n. 18, p. 4493–4500, 2013.

KOYNOVA, R.; TENCHOV, B.; MACDONALD, R. C. Nonlamellar Phases in Cationic Phospholipids, Relevance to Drug and Gene Delivery. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 1, p. 130–138, 2015.

KREBS, M. D.; ALSBERG, E. Localized, targeted, and sustained siRNA delivery. **Chemistry European Journal**, v. 17, n. 11, p. 3054–3062, 2011.

KREBS, M. D.; JEON, O.; ALSBERG, E. Localized and sustained delivery of silencing RNA from macroscopic biopolymer hydrogels. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 26, p. 9204–9206, 2009.

LARA, M. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; COLLETT, J. H. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 241–250, 2005.

LARSSON, K. Cubic Lipid-Water Phases: Structures and Biomembrane Aspects. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 93, n. 21, p. 7304–7314, 1989.

LAZARETH, V. Management of non-melanoma skin cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 3, p. 182–194, 2013.

LEE, S. J. et al. Co-delivery of VEGF and Bcl-2 dual-targeted siRNA polymer using a single nanoparticle for synergistic anti-cancer effects in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 220, p. 631–641, 2015.

LI, B. J. et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. **Nature Medicine**, v. 11, n. 9, p. 944–951, 2005.

LI, J. M. et al. Local arterial nanoparticle delivery of siRNA for NOX2 knockdown to prevent restenosis in an atherosclerotic rat model. **Gene Therapy**, v. 17, n. 10, p. 1279–1287, 2010.

LI, S.-D. et al. Tumor-targeted Delivery of siRNA by Self-assembled Nanoparticles. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 1, p. 163–169, 2008.

LIBSTER, D. et al. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporin A: physical characterization. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 308, p. 514–524, 2007.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 356, p. 375–386, 2011.

LINDBLOM, G.; RILFORS, L. Cubic phase and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 988, p. 221–256, 1989.

LIU, W. et al. Quantification of siRNA using competitive qPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 1, p. e4, 2009.

LIU, Z. et al. Non-viral gene transfection in vitro using endosomal pH-sensitive reversibly hydrophobilized polyethylenimine. **Biomaterials**, v. 32, n. 34, p. 9109–9119, 2011.

LOPES, L. B. **Estratégias para o aumento da penetração cutânea de fármacos peptídicos: avaliação in vitro e in vivo de sistemas de liberação e moléculas carreadoras**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

LOPES, L. B. et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1332–1342, 2006a.

LOPES, L. B. et al. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of in vitro and in vivo delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 146–155, 2006b.

LOPES, L. B.; SPERETTA, F. F. F.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 3, p. 209–215, 2007.

LU, J. J.; LANGER, R.; CHEN, J. A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 3, p. 763–771, 2009.

LYNCH, T. J. et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. **The New England Journal of Medicine**, v. 35, n. 21, p. 2129–2139, 2004.

MANAKA, T. et al. Local delivery of siRNA using a biodegradable polymer application to enhance BMP-induced bone formation. **Biomaterials**, v. 32, p. 9642–9648, 2011.

MASIERO, M. et al. RNA interference: implications for cancer treatment. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 143–166, 2007.

MATSUI, K. et al. RNAi Silencing of Exogenous and Endogenous Reporter Genes Using a Macrocyclic Octaamine as a “Compact” siRNA Carrier . Studies on the Nonsilenced Residual Activity. **Bioconjugate Chem.**, v. 17, p. 132–138, 2006.

MITCHELL, D. J.; NINHAM, B. W. Micelles, Vesicles and Micro-Emulsions. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions 2**, v. 77, n. 4, p. 601–629, 1981.

MITTNACHT, U. et al. Chitosan/siRNA nanoparticles biofunctionalize nerve implants and enable neurite outgrowth. **Nano letters**, v. 10, p. 3933–9, 2010.

MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Cubic phase-forming dry powders for controlled drug delivery on mucosal surfaces. **Jounal of Controlled Release**, v. 157, p. 206–215, 2012.

MORAES, M. H. DE. **Interferência na expressão de DLC2 afeta processos essenciais relacionados à umorigênetse e metástase em células de melanoma**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochernical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343–356, 2004.

NABEL, G. J. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. **Nature Medicine**, v. 10, n. 2, p. 135–141, 2004.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 978–986, 2010.

NAVARRO, G. et al. Phospholipid-modified polyethylenimine-based nanopreparations for siRNA-mediated gene silencing: Implications for transfection and the role of lipid components. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 411–419, 2014.

NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5296–5303, 2011.

NELSON, C. E. et al. Sustained local delivery of siRNA from an injectable scaffold. **Biomaterials**, v. 33, n. 4, p. 1154–1161, 2012.

NGUYEN, K.; DANG, P. N.; ALSBERG, E. Functionalized, biodegradable hydrogels for control over sustained and localized siRNA delivery to incorporated and surrounding cells. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4487–4495, 2013.

NORMANNO, N. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. **Gene**, v. 366, p. 2–16, 2006.

NYS, K.; AGOSTINIS, P. Bcl-2 family members: Essential players in skin cancer. **Cancer Letters**, v. 320, p. 1–13, 2012.

OISHI, M. et al. Smart PEGylated Gold Nanoparticles for the Cytoplasmic Delivery of siRNA to Induce Enhanced Gene Silencing. **Chemistry Letters**, v. 35, n. 9, p. 1046–1047, 2006.

OLIVEIRA, S. et al. Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 6, n. 6, p. 605–617, 2006.

OLIVEIRA, S. et al. Photochemical internalization enhances silencing of epidermal growth factor receptor through improved endosomal escape of siRNA. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1211–1217, 2007.

OLIVEIRA, S. et al. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. **Journal of Controlled Release**, v. 145, p. 165–175, 2010.

OVERHOFF, M.; WUNSCHE, W.; SCZAKIEL, G. Quantitative detection of siRNA and single-stranded oligonucleotides: relationship between uptake and biological activity of siRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 21, p. e170, 2004.

OZCAN, G. et al. Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 89, p. 108–119, 2015.

PACKHAEUSER, C. B. et al. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 445–455, 2004.

PACKHAEUSER, C. B.; KISSEL, T. On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 123, n. 2, p. 131–140, 2007.

PEER, D.; LIEBERMAN, J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. **Gene Therapy**, v. 18, p. 1127–1133, 2011.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157–165, 2008.

PHAN, S. et al. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, n. 1, p. 176–182, 2011.

PUTHALAKATH, H. et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. **Science**, v. 293, p. 1829–1832, 2001.

QIAN, Y. et al. Enhanced cytotoxic activity of cetuximab in EGFR-positive lung cancer by conjugating with gold nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 4, n. 7490, p. 1–8, 2014.

RABEN, D. et al. The Effects of Cetuximab Alone and in Combination With Radiation

and/or Chemotherapy in Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 795–805, 2005.

RAEMDONCK, K. et al. Biodegradable Dextran Nanogels for RNA Interference: Focusing on Endosomal Escape and Intracellular siRNA Delivery. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 9, p. 1406–1415, 2009.

REISCHL, D.; ZIMMER, A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 8–20, 2009.

REJMAN, J.; BRAGONZI, A.; CONESE, M. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. **Molecular Therapy**, v. 12, n. 3, p. 468–474, 2005.

REJMAN, J.; CONESE, M.; HOEKSTRA, D. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. **Journal of Liposome Research**, v. 16, n. 3, p. 237–247, 2006.

RIZWAN, S. B. et al. Liquid crystalline systems of phytantriol and glyceryl monooleate containing a hydrophilic protein: Characterisation, swelling and release kinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 11, p. 4191–4204, 2009.

RUJITANAROJ, P. O. et al. Controlling fibrous capsule formation through long-term down-regulation of collagen type I (COL1A1) expression by nanofiber-mediated siRNA gene silencing. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4513–4524, 2013.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 182–195, 2010.

SALVA, E. et al. Local Delivery of Chitosan/VEGF siRNA Nanoplexes Reduces Angiogenesis and Growth of Breast Cancer In Vivo. **Nucleic Acid Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 40–48, 2012.

SARETT, S. M.; NELSON, C. E.; DUVALL, C. L. Technologies for controlled, local delivery of siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 218, p. 94–113, 2015.

SCHERER, L. J.; ROSSI, J. J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1457–1465, 2003.

SCHIFFELERS, R. M. et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 19, p. e149, 2004.

SCHROEDER, A. et al. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p. 9–21, 2010.

SEBASTIAN, S. et al. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1766, p. 120–139, 2006.

SEGOVIA, N. et al. Hydrogel Doped with Nanoparticles for Local Sustained Release of siRNA in Breast Cancer. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, p. 271–280, 2015.

SELBO, P. K. et al. Photochemical internalization provides time- and space-controlled endolysosomal escape of therapeutic molecules. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 2–12, 2010.

SHAH, J. C.; SADHALE, Y.; CHILUKURI, D. M. Cubic phase gels as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 229–250, 2001.

SHEN, Y. et al. A novel tumor-targeted delivery system with hydrophobized hyaluronic acid-spermine conjugates (HHSCs) for efficient receptor-mediated siRNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, p. 233–243, 2011.

SHIBATA, M. et al. Combination therapy with short interfering RNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. **Cancer Gene Therapy**, v. 15, p. 776–786, 2008.

SIFUENTES-ROMERO, I.; MILTON, S. L.; GARCÍA-GASCA, A. Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand? **Mutation Research**, v. 728, n. 3, p. 158–171, 2011.

SILVA, J. A. G. DA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância**, p. 1–122, 2015.

SIMÕES, M. C. F.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. A. C. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. **Cancer Letters**, v. 357, n. 1, p. 8–42, 2015.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, v. 324, p. 107–269, 2000.

SORKIN, A.; DUEX, J. E. Quantitative analysis of endocytosis and turnover of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor. **Current Protocols in Cell Biology**, v. Chapter 15, p. Unit 15.14, 2010.

TAI, W.; QIN, B.; CHENG, K. Inhibition of Breast Cancer Cell Growth and Invasiveness by Dual Silencing of HER-2 and VEGF. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 2, p. 543–556, 2010.

TAKAHASHI, Y. et al. Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: Quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. **Journal of Controlled Release**, v. 105, p. 332–343, 2005.

TARATULA, O. et al. Multifunctional nanomedicine platform for cancer specific delivery of siRNA by superparamagnetic iron oxide nanoparticles-dendrimer complexes. **Current Drug Delivery**, v. 8, p. 59–69, 2011.

UI-TEI, K. et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 3, p. 936–948, 2004.

URIBE, P.; GONZALEZ, S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous

cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. **Pathology – Research and Practice**, v. 207, p. 337–342, 2011.

VADER, P. et al. A method for quantifying cellular uptake of fluorescently labeled siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 148, n. 1, p. 106–109, 2010.

VAN DER KROL, A. R. et al. Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. **The Plant Cell**, v. 2, p. 291–299, 1990.

VERCAUTEREN, D. et al. On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 566–581, 2012.

VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16–24, 2013a.

VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Delivery Systems and Local Administration Routes for Therapeutic siRNA. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p. 915–931, 2013b.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227–232, 2012.

WANG, H. et al. Disruption of clathrin-dependent trafficking results in the failure of grass carp reovirus cellular entry. **Virology Journal**, v. 13, n. 25, p. 1–10, 2016.

WEECHARANGSAN, W.; OPANASOPIT, P.; LEE, R. J. In Vitro Gene Transfer Using Cationic Vectors, Electroporation and their Combination. **Anticancer Research**, v. 27, p. 309–314, 2007.

WELLS, A. EGF receptor. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 637–643, 1999.

WHEELER, D. L.; DUNN, E. F.; HARARI, P. M. Understanding resistance to EGFR inhibitors—impact on future treatment strategies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 7, n. 9, p. 493–507, 2010.

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 129–138, 2009.

WIRTH, T.; PARKER, N.; YLA-HERTTUALA, S. History of gene therapy. **Gene**, v. 525, p. 162–169, 2013.

WOLFRUM, C. et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1149–1157, 2007.

WONG, S. Y.; PELET, J. M.; PUTNAM, D. Polymer systems for gene delivery-past, present, and future. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 799–837, 2007.

XU, C.; WANG, J. Direct delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015.

YAGHMUR, A. et al. Characterization of bupivacaine-loaded formulations based on liquid crystalline phases and microemulsions: The effect of lipid composition. **Langmuir**, v. 28, p. 2881–2889, 2012.

YAGHMUR, A.; RAPPOLT, M.; LARSEN, S. W. In situ forming drug delivery systems based on lyotropic liquid crystalline phases: structural characterization and release properties. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 325–332, 2013.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. S3–S8, 2001.

YARIV, D. et al. In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 2, p. 185–192, 2010.

YIN, H. et al. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, p. 541–555, 2014.

ZAMORA, M. R. et al. RNA Interference Therapy in Lung Transplant Patients Infected with Respiratory Syncytial Virus. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 4, p. 531–538, 2011.

ZHANG, F. et al. Quantification of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level and Binding Kinetics on Cell Surfaces by Surface Plasmon Resonance Imaging. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 9960−9965, 2015.

ZHANG, P. et al. A linear polyethylenimine mediated siRNA-based therapy targeting human epidermal growth factor receptor in SPC-A1 xenograft mice. **Translational Respiratory Medicine**, v. 1, n. 2, p. 1–11, 2013.

ZHOU, J. et al. Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 85–107, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE 1: Avaliação da eficiência do silenciamento de DLC2-GFP em células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP por siRNA específico para DLC-2 liberado do G-FFP.

Metodologia:

Os estudos de silenciamento *in vitro* de DLC2-GFP foram investigados usando as células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP e Western Blotting (WB). As células foram plaqueadas com uma densidade de $2x10^5$ células/poço em placas de 06 poços com 2,0 mL de meio por 24 h e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2. Após as 24 h, o meio foi substituído por um novo e as células foram tratadas com FFP ou os controles (Lipofectamina 2000 ou 0,65 % de PEI em tampão tris ou HiPerfect) complexados com siRNA específico para DLC-2 (DLC2 siRNA) ou ns-siRNA (7,5 pmol siRNA/$1x10^5$ células) e incubadas a 37 ºC e 5% de CO_2 por 48 h. A concentração de siRNA utilizada foi seguindo a concentração de silenciamento definida na tese de Moraes M.H. (2011) (MORAES, 2011). Após 48 h de incubação, as células foram então lavadas com PBS e lisadas usando o tampão de lise (Halt™ Protease Inhibitor Cocktail/Ripa Buffer), após 10 min de incubação com o tampão de lise em gelo, as células foram removidas usando “scraper celular”. O lisado foi transferido para eppendorf, agitado em vortex e centrifugado por 15 min, 14.000 g e 4 ºC. O sobrenadante foi armazenado a –20 ºC até o uso.

A quantidade de proteína total do lisado celular foi determinada usando Micro BCA™ Protein Assay. 10 µg de proteína total foi adicionada em cada poço do gel de acrilamida 16 %. A eletroforese foi realizada a 60 V por 30 min, seguido de 100 V por 120 min. Subsequentemente, as proteínas foram eletro-transferidas para a membrana de nitrocelulose a 60 V por 120 min. Proteínas não-especificas foram bloqueadas da membrana usando solução de bloqueio (Leite Molico Desnatado 5%) por 60 min a temperatura ambiente com constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada por 60 min a temperatura ambiente, agitação constante, com anticorpo primário *anti-GFP (rabbit)* na diluição de 1:500 em solução de bloqueio:agua (1:1). A membrana foi incubada com anticorpo secundário *anti-rabbit peroxidase* na diluição de 1:10000 em solução TBS-Tween por 60 min. Para visualização, a membrana foi revelada com solução de revelação contendo luminol (250 mM), ácido cumárico (90 mM) e H_2O_2 (30%). Depois de revelado a banda referente a proteína DLC2-GFP, o procedimento foi repetido para a revelação da γ-Tubulina (usada como controle do WB). Para tal, a

membrana foi incubada por 60 min a temperatura ambiente, agitação constante, com anticorpo primário ϒ-Tubulina *mouse* na diluição de 1:10000 em solução de bloqueio:agua (1:1). Finalmente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário *anti-mouse peroxidase* na diluição de 1:3000 em solução TBS-Tween por 60 min. Para visualização, a membrana foi revelada com solução de revelação contendo luminol, ácido cumárico e H_2O_2. A visualização foi feita pelo Image Quant LAS 4000. A intensidade das bandas foi quantificada pelo NIH ImageJ software (http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Antes da lise das células, as mesmas foram avaliadas por microscopia de fluorescência usando o Microscópio de Fluorescência Leica DMI 6000B.

Resultados e Discussão:

As proteínas DLCs (DLC1 e DLC2) são altamente conservadas entre os eucariotos e compartilham 93% de identidade na sequência de aminoácidos. Elas estão envolvidas no transporte de organelas citoplasmáticas, mitose e migração nuclear. Além destas funções dependentes de motores moleculares, outras que independem têm sido identificadas, tais como a promoção de sobrevivência celular e potencial tumorogênico. É descrito que a DLC2 tem papel crítico em regular a apoptose. A DLC2 se liga a Bmf (*Bcl-2-modifying fator*) e em resposta a estímulos apoptóticos, o complexo DLC2-Bmf são liberados no citoplasma, onde podem interagir com proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, inativando-os, levando assim a morte celular via liberação de citocromo C (Figura 31) (DAY et al., 2004; IZIDORO-TOLEDO et al., 2013; PUTHALAKATH et al., 2001). Quando se tem um excesso ou alteração de DLC2 que impede que o complexo DLC2-Bmf seja liberado no citoplasma, tem-se a inibição da apoptose por esta via. Além disto, as células de melanona que super expressam DLC2 tem um aumento da capacidade de invasão e aumento do potencial clonogênico (MORAES, 2011). Portanto, a terapia com DLC2 siRNA é uma promissora abordagem para o tratamento de cânceres de pele do tipo melanoma. E por este motivo foi avaliada neste trabalho.

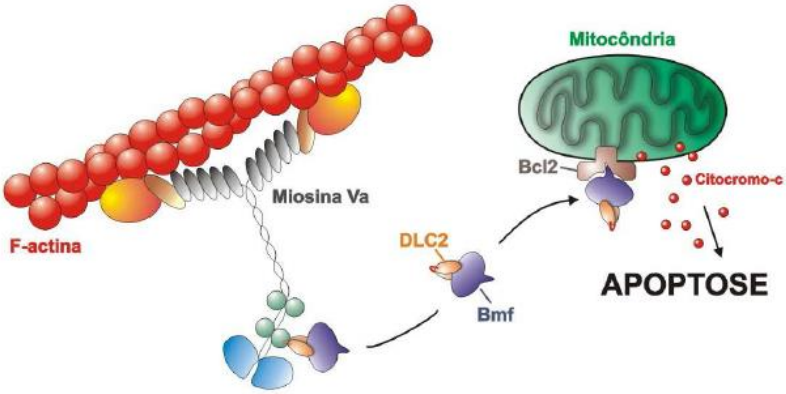

Figura 31. Representação esquemática da participação da proteína DLC2 na apoptose (BORGES, 2012).

A construção plasmidial utilizada para expressão da proteína DLC2 contém uma sequência para expressão da proteína GFP, que foi usada como repórter fluorescente da proteína DLC2. Assim, a eficiência do silenciamento de DLC2 foi avaliada pela proteína fusionada (GFP). A presença da GFP também permite visualizar a expressão da proteína de interesse pelo microscópio de fluorescência. Como observado na Figura 32, as células WM35/DLC2-GFP tratadas com DLC2 siRNA complexadas a FFP apresentaram uma pequena redução na intensidade de fluorescência comparadas as células não-tratadas.

A expressão do DLC2-GFP (37 kDa) nas células WM35/DLC2-GFP e MCF-7/DLC2-GFP foi determinado por WB. γ-Tubulina (~50 kDa) também foi detectada por WB e utilizada como controle interno. A quantificação da proteína DLC2-GFP foi determinada por intensidade das bandas obtidas no WB, e corrigidas pela intensidade de γ-Tubulina (Intensidade da banda de DLC2-GFP / Intensidade da banda de γ-Tubulina) pelo NIH ImageJ.

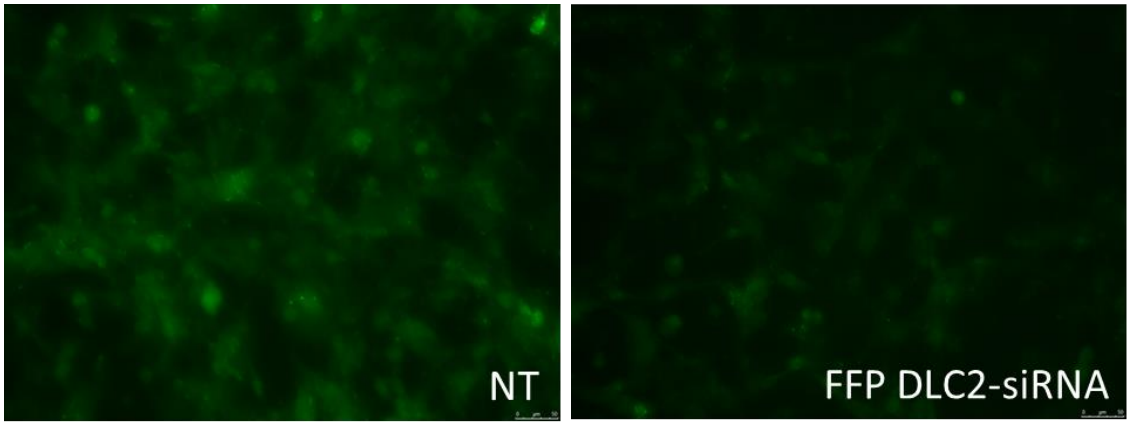

Figura 32. Imagens ilustrativas (microscopia de fluorescência) das células WM35/DLC2-GFP não-tratadas (NT), tratadas com FFP complexada com DLC2 siRNA (FFP DLC2-siRNA). Aumento 200 x.

Primeiro, foi realizado um experimento piloto usando como controle HiPerfect, Lipofectamina 2000 e PEI. HiPerfect foi utilizado por Moraes, M.H. (2011) para determinar a concentração de siRNA necessária para inibir a expressão de DLC2-GFP usando a técnica de tratamento reveso, o qual consiste em adicionar o siRNA complexado ao HiPerfect na placa de cultura antes de plaquear as células. No presente trabalho, esta técnica não foi utilizada devido a formação de gel *in situ*, que dificultaria a parte prática do experimento. Como se pode observar na Figura 33, o siRNA liberado da FFP e PEI promoveu uma redução na expressão de DLC2-GFP (71% e 57%, respectivamente), corroborando com a visualização por microscopia de fluorescência. Porém, não se observou redução quando as células foram tratadas com siRNA complexado ao HiPerfect e Lipofectamina. A falta de silenciamento quando complexado a Lipofectamina e ao HiPerfect é bastante intrigante, pois estes carreadores são altamente eficientes para promoverem a transfecção *in vitro* do siRNA. Neste experimento piloto, o siRNA não-específico foi complexado somente ao HiPerfect e não ocorreu nenhum silenciamento de DLC2-GFP. Porém, neste caso, como também não se observou silenciamento com o DLC2 siRNA complexado ao HiPerfect, não se pode afirmar que isto é devido a especificidade do siRNA.

Após este experimento piloto, o experimento foi repetido, porém, desta vez não houve silenciamento com nenhum dos tratamentos. Outros experimentos também foram realizados alterando a concentração de siRNA (37,5 pmol siRNA/1x10^5 células) e o tempo de incubação para 72 h, porém, novamente nenhum silenciamento foi observado. Com as células MCF-7/DLC2-GFP também não se observou silenciamento de DLC2-GFP quando as células foram tratadas com DLC2-GFP siRNA complexado aos carreadores.

A realização destes experimentos tinha como principal objetivo observar se o siRNA veiculado pela FFP era capaz de silenciar a expressão desta proteína endógena, porém a falta de reprodutibilidade dos experimentos e problemas técnicos não permitiram esta avaliação.

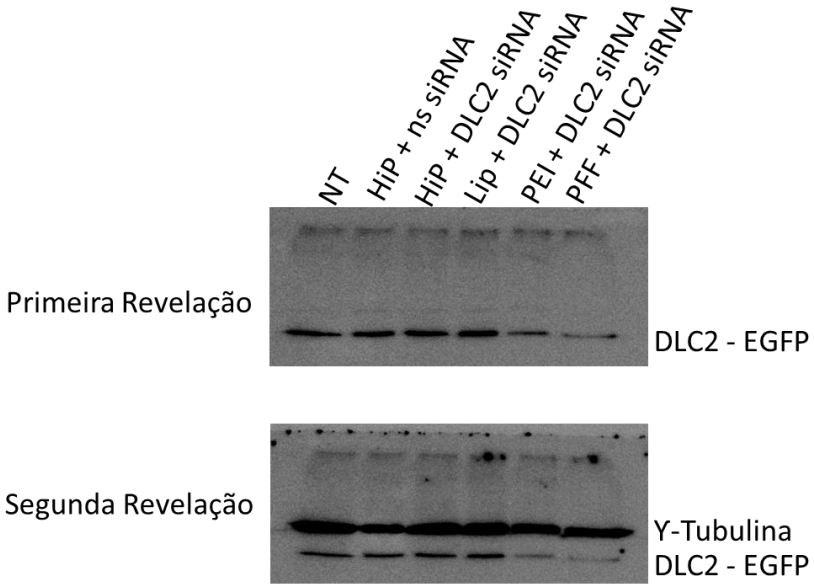

Figura 33. Western Blotting das células tratadas com diferentes carreadores e DLC2 siRNA. NT: células não-tratadas. HiP: HiPerfect; Lip: Lipofectamina. PEI: 0,65% de PEI em tampão tris. ns siRNA: siRNA não específico; DLC2 siRNA: siRNA específico para DLC2.

ANEXO

Anexo I: Certificado de aprovação dos experimentos com animais - Comitê de Ética da Universidade de Utrecht (Dierexperimentencommissie Utrecht), número 2014.III.04.037.

DEC UTRECHT

Mevr. L.N.B.C. Neves Borgheti Cardoso, MSc.
Divisie Laboratorium en Apotheek
Afdeling Klinische Chemie en Haematologie
Huispost G03.550

Datum	**: 25 april 2014**
Ons kenmerk	**: SO/14/0**
Onderzoeksplan	**: Vorming van een gel voor afgifte van siRNA na intratumorale injectie**
DEC-nummer	**: 2014.III.04.037**
Deelvergunningsnr.	**: 11538**
Advies d.d. 23-04-2014	**: Intentie posities advies, ambtelijk afhandelen mogelijk.**
Aantal en soort	**: n.v.t.**
Geldstroom	**: intern**
Status	**: nieuw**

Behandeling:
☒ **in DEC-vergadering d.d. 23 april 2014**
☐ **na advies proefdierdeskundige**
☐ **ambtelijke afhandeling**
☐ **anders:**

De DEC erkent dat het belang van uw onderzoek opweegt tegen het ongerief voor de dieren en heeft de intentie deze aanvraag van een positief advies te voorzien.

De DEC ontvangt graag uw reactie op de volgende punten:

- A5, opzet van de studie: De DEC verzoekt u hier in plaats van de vraagstellingen te noemen, te beschrijven wat de daadwerkelijke opzet is van de studie, m.a.w.: Wat doet u precies tijdens uw onderzoek? Graag aanpassen.
- A5, opzet van de studie: De DEC vraagt zich af wat de achtergrond is van uw keuze om u te richten op de EGF-receptor, gezien hier al goede therapeutica voor bestaan. Graag toelichten.
- B1b: Gezien het feit dat u een mechanistische studie uitvoert, begrijpt de DEC niet wat u bedoelt met de opmerking dat er 'alleen vrouwelijke muizen worden gebruikt, omdat het gebruikte tumormodel (A431) afkomstig is van een vrouwelijke patiënt'. Graag toelichten of verwijderen.
- B2a: U spreekt over 'nog goed onderzocht'. Dit zou volgens de DEC 'niet goed onderzocht' moeten zijn. Graag aanpassen.
- WP1, 1: De DEC vraagt zich af hoe u de gelvorming vaststelt en of er geen risico bestaat dat de bloedcirculatie in de tumor volledig wordt geïnhibeerd door de gel. Graag toelichten en visueel maken.
- WP1, 1:De DEC vraagt zich af of de bijmenging met siRNA en het effect daarvan op de
- gelvorming, die u onderzoekt in vivo, niet in vitro kan worden uitgevoerd. Graag toelichten.

Dierexperimentencommissie Utrecht | Heidelberglaan 100 | Huispostnummer D 01.343 | 3584 CX Utrecht
Telefoon 088 755 9247 | Fax 088 755 5022 | info@dec-utrecht.nl | www.dec-utrecht.nl

- WP2, 1: U noemt het gebruik van Nanogel. De DEC neemt aan dat dit gebeurt bij wijze van controle en vraagt zich af wat de meerwaarde is van het gebruik van PFF ten opzichte van de kennelijk al bekende en werkzame Nanogel. Graag toelichten.
- WP2, 1: De DEC vraagt zich af of u post mortem nader onderzoek doet naar de celtypeverdeling, bijvoorbeeld met behulp van confocale microscopie. Graag toelichten.
- WP3, 1 en 5: De DEC vraagt zich af wat de ratio is van het gebruik van polyethylenimine en het uitsluitend in groep 2 gebruiken van polyethylenimine. Graag toelichten en tevens opnemen in vraag 5.

De DEC verzoekt u op de vragen en/of opmerkingen puntsgewijs te reageren via het tabblad "reacties/bijlagen" of in een apart toegevoegde bijlage en dit ook te verwerken in de aanvraag.

Met vriendelijke groet,

mw. S. Oosterhoff, LL.M
secretaris DEC Utrecht

Dierexperimentencommissie Utrecht | Heidelberglaan 100 | Huispostnummer D 01.343 | 3584 CX Utrecht
Telefoon 088 755 9247 | Fax 088 755 5022 | info@dec-utrecht.nl | www.dec-utrecht.nl

Universitair Medisch Centrum
Utrecht

Mevr. L.N.B.C. Neves Borgheti Cardoso, MSc.
Divisie Laboratorium en Apotheek
Afdeling Klinische Chemie en Haematologie
Huispost G03.550

Ons kenmerk FM/SO/14/0
Datum 4 juni 2014
Betreft Uw DEC aanvraag 2014.III.04.037

Raad van Bestuur

Prof. dr. F. Miedema
Decaan en vice-voorzitter Raad
van Bestuur UMC Utrecht

Tel 088-7559408
Fax 088-7555400
F.Miedema@umcutrecht.nl

Geachte mevrouw Neves Borgheti Cardoso,

Op 4 juni 2014 heeft de dierexperimentencommissie (DEC) aan de raad van bestuur advies uitgebracht over uw onderzoeksproject *Vorming van een gel voor afgifte van siRNA na intratumorale injectie*, DEC nummer 2014.III.04.037. De DEC is tot de conclusie gekomen dat het belang van het onderzoek opweegt tegen het ongerief voor de dieren en geeft een positief advies. Een afschrift daarvan treft u bijgevoegd aan.

De raad van bestuur is van mening dat de DEC op zorgvuldige wijze tot haar standpunt is gekomen. Conform het advies van de DEC verleen ik u daarom bij deze toestemming voor het verrichten van dierproeven in het kader van bovengenoemd onderzoeksproject. Ik wijs u erop, dat u bij eventuele wijzigingen in de aard van het onderzoek - met name als het gaat om de gebruikte experimentele technieken, aantal dieren, soort dieren en dergelijke - onmiddellijk opnieuw een oordeel van de DEC dient te vragen. Daarnaast dient u er zelf voor zorg te dragen dat C-deel en werkprotocol met elkaar in overeenstemming zijn.

Met vriendelijke groet,

Prof.dr. F. Miedema
Decaan en vice-voorzitter Raad van Bestuur

Bijlage(n) Brief met advies van de DEC Utrecht
Kopie aan Secretariaat DEC

Bezoekadres:
Heidelberglaan 100
3584 CX UTRECHT

Postadres:
Huispostnummer D 01.343
Postbus 85500
3508 GA UTRECHT

www.umcutrecht.nl

Pagina's 1/1

3000466

DEC UTRECHT

Vergunninghouder UMC Utrecht
Prof. dr. F. Miedema
Huispostnummer D 01.343

Datum	**: 4 juni 2014**
Ons kenmerk	**: SO/14/0**
Onderzoeksplan	**: Vorming van een gel voor afgifte van siRNA na intratumorale injectie**
DEC-nummer	**: 2014.III.04.037**
Deelvergunningsnr.	**: 11538**
Advies d.d. 04-06-0214	**: Positief advies tot 1 juli 2016**
Aantal en soort	**: WP1: 42, WP2: 51 en WP3: 56 (allen vrouwelijke) NU/NU nude muizen**
Geldstroom	**: intern**
Status	**: nieuw**

Behandeling:
☒ **in DEC-vergadering d.d. 23 april 2014**
☐ **na advies proefdierdeskundige**
☒ **ambtelijke afhandeling**
☐ **anders:**

Maatschappelijk en/of wetenschappelijk belang:
De commissie onderschrijft het maatschappelijk en/of wetenschappelijk belang zoals door de onderzoeker is verwoord in het onderzoeksplan.

Doel:
Het ontwikkelen van een optimale depot formulering (gel) voor gecontroleerde afgifte van siRNA voor de behandeling van kanker.

Aantal en soort dieren en verantwoording daarvan (inclusief herkomst en hergebruik):
De DEC onderschrijft de onderbouwing van het aantal en soort dieren voor bovengenoemd project.

Maximaal verwachte cumulatieve mate van ongerief: conform aangegeven, per experimentele groep, in goedgekeurd(e) werkprotocol(len).

Ethische afweging:
In haar afweging heeft de commissie de volgende aspecten betrokken:
1. het al dan niet aanwezig zijn van reele alternatieven;

Dierexperimentencommissie Utrecht | Heidelberglaan 100 | Huispostnummer D 01.343 | 3584 CX Utrecht
Telefoon 088 755 9247 | Fax 088 755 5022 | info@dec-utrecht.nl | www.dec-utrecht.nl

2. het belang van het experiment;
3. het verwachte ongerief voor de dieren (als gevolg van zowel de experimentele handelingen, als huisvesting, eventuele genetische aanleg, duur van de proef, de toestand van het dier na afloop van de proef en alle andere factoren die het ongerief van het dier kunnen beinvloeden);
4. eventuele andere ethische aspecten ten aanzien van het gebruik van de dieren.

De commissie is ervan overtuigd dat voor het bereiken van de doelstelling van dit onderzoeksplan het gebruik van de aanvraagde dieren onvermijdelijk is en dat die doelstelling niet te realiseren is met minder dieren en/of met minder ongerief voor de dieren. Voorts is de commissie van oordeel dat het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van deze dierproeven opweegt tegen het ongerief voor het betrokken dier.
De commissie heeft kennis genomen van de wijze waarop de toetsing van de wetenschappelijke kwaliteit heeft plaatsgevonden en heeft geen twijfel over de deugdelijke opzet van het onderzoek.

Advies en voorwaarde(n):
Op grond van bovenstaande komt de commissie tot het oordeel dat de haar voorgelegde dierexperimenten ethisch toelaatbaar zijn en geeft een positief advies af.

De onderzoeker dient iedere wijziging van het onderzoeksplan ten opzichte van dit advies, alsmede onverwachte gebeurtenissen, onverwijld te melden aan de DEC en de proefdierdeskundige.

De DEC geeft geen advies af over de niet voor haar bestemde grijs gemarkeerde delen van het werkprotocol/C-deel.

Met vriendelijke groet,

mw. S. Oosterhoff, LL.M
secretaris DEC Utrecht

Dierexperimentencommissie Utrecht | Heidelberglaan 100 | Huispostnummer D 01.343 | 3584 CX Utrecht
Telefoon 088 755 9247 | Fax 088 755 5022 | info@dec-utrecht.nl | www.dec-utrecht.nl