

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**PERSPECTIVAS NANOBIOTECNOLÓGICAS NO DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS OTIMIZADO NA TERAPIA GÊNICA
COM RNA INTERFERENTE (RNAI)**

Guilherme de Noronha Lima

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**PERSPECTIVAS NANOBIOTECNOLÓGICAS NO DESENVOLVIMENTO DE UM
SISTEMA DE ENTREGA DE FÁRMACOS OTIMIZADO NA TERAPIA GÊNICA
COM RNA INTERFERENTE (RNAI)**

Guilherme de Noronha Lima

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

Orientador(a):
Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo
2018

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	3
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	6
3. MÉTODOS	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
5. CONCLUSÃO	22
6. BIBLIOGRAFIA	23

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>dsRNA</i>	<i>double stranded RNA</i> (RNA fita dupla)
<i>miRNA</i>	<i>micro RNA</i>
<i>PAMAM</i>	Poliamidoamina
pb	pares de base
<i>PPI</i>	Poli (propilenoimina)
<i>RISC</i>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i> (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RNA _i	ácido ribonucleico interferente
<i>siRNA</i>	<i>small interfering RNA</i>

RESUMO

LIMA, G.N. **Perspectivas nanobiotecnológicas no desenvolvimento de um sistema de entrega de fármacos otimizado na terapia gênica com RNA interferente (RNAi)**. 2018. no. f. 25. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O processo de regulação genética pós-transcricional mediado por moléculas de RNA, através do qual a síntese da proteína alvo é inviabilizada por meio de interferência direta na tradução da mensagem codificada geneticamente, é denominado interferência por RNA e representa uma promissora ferramenta terapêutica. Dificuldades como a possibilidade de ativação imunológica pelas moléculas de RNA interferente (RNAi), se aplicadas diretamente na circulação sistêmica, a baixa biodisponibilidade via oral, sua rápida degradação, excreção e alta instabilidade frente às nucleases plasmáticas, levaram a um consenso generalizado de que o gargalo principal para a eficiência desta técnica no uso terapêutico é a ausência de um sistema adequado de entrega (*delivery system*) do RNAi. Diversos desafios ainda devem ser transpostos antes que siRNAs possam ser amplamente implementados como agentes terapêuticos. Um efetivo sistema de entrega deve ser capaz de: (a) proteger as moléculas de ácido nucleico da degradação durante a entrega sistêmica; (b) suportar circulação prolongada sem ser eliminado através da filtração renal; (c) acumular-se dentro do tecido alvo; (d) adentrar a células-alvo via um mecanismo específico de captura; (e) ter sua captura celular iniciada através de endocitose; (f) escapar do compartimento endossomal para evitar a degradação dentro do lisossomo; e (g) desmontar-se no citoplasma para efetiva liberação da sua carga de siRNA. Por meio do levantamento crítico da aplicabilidade das técnicas de nanocarreamento/nanoencapsulamento descritas na literatura científica, considerados os benefícios e desvantagens, foi traçado um cenário atualizado e abrangente sobre como tais técnicas podem ser úteis à evolução da experiência clínica com essa inovadora ferramenta biotecnológica. De acordo com o levantamento realizado, é possível concluir que as estruturas químicas mais exploradas nas pesquisas de silenciamento gênico com siRNA são os peptídeos de penetração celular, lipossomos e nanopartículas poliméricas, principalmente por conta da facilidade sintética desses materiais, sendo as nanopartículas poliméricas as mais versáteis, considerando-se a vasta gama de possíveis materiais, modificações moleculares e formas que podem ser obtidas no seu desenvolvimento.

Palavras-chave: *siRNA; sistema de entrega; nanocarreadores; RNA de interferência.*

1. Introdução

A interferência por RNA corresponde a um processo de regulação genética pós-transcricional mediado por moléculas de RNA através do qual a síntese da proteína alvo é inviabilizada por meio de interferência direta na tradução da mensagem codificada geneticamente (PARLEA et al., 2016). A descoberta deste mecanismo em células de mamíferos em 1998 e a constatação da sua real funcionalidade em 2003, angariou o Prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia aos pesquisadores Andrew Fire e Craig Mello em 2006. A instantânea evidência dada no meio científico a esta descoberta justifica-se, principalmente, por tratar-se de um mecanismo de silenciamento gênico bastante promissor ao desenvolvimento terapêutico. Especialmente nos casos em que a patologia é decorrente da superexpressão ou expressão inadequada de determinados genes, como ocorre em diversos tipos de células cancerígenas. Desta forma, vislumbrou-se a possibilidade de obtenção de fármacos cujo mecanismo de ação baseia-se na interferência específica da síntese proteica, em nível genético, o que levou diversos laboratórios no mundo inteiro a focarem seus esforços na compreensão desta nova e promissora técnica.

Foram inúmeras as vantagens identificadas frente aos compostos clássicos da terapia disponíveis na época, e, até mesmo, se comparadas às terapias disponíveis atualmente. O bloqueio direto da síntese proteica, permitindo doses menores e menos frequentes, a relativa simplicidade sintética e a complementaridade genética com o alvo terapêutico destacam-se neste sentido (PÁRRAGA et al., 2015). Contudo, impasses como a possibilidade de ativação imunológica pelas moléculas de RNA interferente (RNAi) se aplicadas diretamente na circulação sistêmica, a baixa biodisponibilidade oral, sua rápida degradação, excreção e alta instabilidade frente às nucleases plasmáticas levaram a um consenso de que o gargalo principal para a eficiência desta técnica no uso terapêutico é a ausência de um sistema adequado de entrega (*delivery system*) do RNAi (GÜNTHER et al., 2011). As dificuldades em se aperfeiçoar este tipo de terapia são consequência direta da ausência de uma compreensão mais profunda

de quais são as características realmente indispensáveis que devem estar presentes para se obter um sistema de entrega completamente funcional (PÁRRAGA et al., 2015). Assim, considerando um dos paradigmas vigentes que assume o uso de carreadores nanoestruturados para driblar a barreira da entrega ao sítio alvo, este trabalho visa abordar um panorama atualizado das principais alternativas nanobiotecnológicas disponíveis que podem viabilizar o sucesso no emprego clínico dessa promissora ferramenta terapêutica, especificamente com as moléculas sintéticas denominadas *small interfering RNA (siRNA)*.

2. Objetivos

Analisar criticamente as principais alternativas nanobiotecnológicas disponíveis atualmente, confirmadas e potenciais, a serem empregadas na otimização da entrega farmacológica sistêmica na terapia gênica com RNAi (siRNA, especificamente). A partir do levantamento crítico da aplicabilidade das técnicas de nanocarreamento/nanoencapsulamento descritas na literatura científica consultada, considerados os benefícios e desvantagens, traçar um cenário atualizado e abrangente sobre como tais técnicas podem ser úteis à evolução da experiência clínica com essa inovadora ferramenta biotecnológica que é a interferência genética por RNAi, visando o avanço dos medicamentos baseados em terapia gênica.

3. Métodos

A metodologia empregada para a elaboração desse trabalho constitui-se da análise de artigos científicos que descrevem a utilização de nanoestruturas carreadoras na otimização da entrega farmacológica dos siRNAs empregados na terapia gênica de diversas doenças. Também foram avaliados os trabalhos científicos considerados relevantes concernentes exclusivamente às tecnologias de nanoencapsulamento, nanoestruturas e nanomateriais disponíveis.

Este material foi recuperado através das principais bases de dados científicas: Pubmed, Web of Science, SciFinder e Scielo. As pesquisas foram

realizadas utilizando-se combinações das seguintes palavras-chave: “*Gene Therapy*”, “*RNA interference*”, “*small interfering RNA (siRNA)*”, “*Gene Silencing*”, “*Nanocarriers*”, “*Nanostructures*”, “*Nanoencapsulation*”, “*Drug Delivery Systems*” assim como seus equivalentes em português (“Terapia Gênica”, “Interferência por RNA”, “siRNA”, “Silenciamento Genético”, “Nanocarreadores”, “Nanoestruturas”, “Nanoencapsulamento”, “Sistemas de Entrega Farmacológica”) Foi realizada uma análise criteriosa dos títulos e dos resumos de todos os artigos obtidos por meio das plataformas de busca, desconsiderando aqueles cujos critérios de inclusão não foram preenchidos.

Visando complementar o embasamento teórico dos artigos recuperados com dados quantitativos e práticos relacionados ao efetivo emprego dessas técnicas, também foram consultados os estudos clínicos submetidos, aprovados, conduzidos e concluídos através da ferramenta de busca do site *clinicaltrial.gov*. Essa busca permitiu um panorama do estágio em que se encontram os esforços nesse ramo atualmente, das principais condições sendo estudadas e do sucesso já alcançado por alguns desses estudos clínicos.

3.1 Critérios de Inclusão

Foram considerados neste trabalho os artigos publicados nos últimos quinze anos (2002 a 2018) que abordam fundamentos teóricos relacionados à interferência por RNA (especificamente siRNA), biotecnologia de nanocarreadores, otimização de entrega farmacológica e terapia gênica. Foram considerados também os artigos que abordavam todos esses temas concomitantemente, assim como os artigos que abordavam biotecnologia de nanocarreadores simultaneamente com pelo menos um dos seguintes campos: interferência por RNA, otimização de entrega farmacológica e terapia gênica.

O idioma dos artigos selecionados foi o inglês ou o português.

3.2 Critérios de Exclusão

Artigos que abordavam interferência por RNA simultaneamente à otimização de entrega farmacológica e/ou terapia gênica sem tratar de biotecnologia de nanocarreadores foram excluídos da análise. O mesmo foi feito com artigos publicados anteriormente ao período mencionado nos critérios de inclusão, 2002 a 2018.

4. Resultados e Discussão

4.1 RNA interferente e barreiras terapêuticas

A interferência por RNA resulta da ação de pequenas sequências não-codificadoras de RNA. Estas sequências hibridizam-se por complementaridade com sequências de RNA mensageiro (RNAm), podendo resultar ou na inibição da tradução proteica ou na degradação da mensagem (PARLEA et al., 2016).

Os RNA interferentes consistem de pequenos RNA de fita dupla (*double stranded RNA – dsRNA*) capazes de reconhecer a sequência específica do seu RNAm alvo através da ação das proteínas *Dicer*, Argonauta e outras proteínas constituintes do complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-Induced Silencing Complex - RISC*) e, dessa forma, mediar a clivagem da molécula de RNAm ou reprimir sua tradução (STEVENSON, 2004).

Ao menos três categorias são conhecidas para os dsRNA implicados na interferência da expressão gênica e são classificadas segundo a sua origem e função: o *micro RNA (miRNA)* – origem endógena; o *short hairpin RNA (shRNA)* – origem exógena/sintética capaz de produzir um efeito mais estável; e o *small interfering RNA (siRNA)* – origem exógena/sintética com ação mais transitória. A presente revisão, entretanto, levará em conta somente os estudos conduzidos com emprego de siRNA, moléculas sintéticas de dsRNA, em geral constituídas de 19-30 pares de base (pb), as quais atuam por meio de pareamento a sequências

complementares do RNAm alvo, causando sua degradação e, assim, o silenciamento específico do gene (FRANÇA et al., 2010).

Visto que mais de 60% dos genes humanos são fisiologicamente regulados por micro RNAs (miRNA) pós-transcricionalmente, e dado também que a desregulação dos níveis de miRNAs está associada a diversas doenças (ex.: câncer), a terapia genética baseada em RNA interferente mostra-se promissora.

De fato, diversos avanços já foram descritos e desde a descoberta da possibilidade de emprego de RNA interferente como uma ferramenta terapêutica até hoje, registram-se mais de 50 estudos, entre clínicos e pré-clínicos, nos quais foram avaliados pelo menos 26 siRNA diferentes (PARLEA et al., 2016). Apenas em estudos clínicos, já se contabilizam mais de 35, se considerarmos os estudos completos e em condução, nos quais o produto investigacional trata-se de um fármaco baseado em RNAi (XU; WANG, 2015). Em sua maioria, as condições tratadas nos estudos realizados envolvem diversos tipos de câncer e condições oftalmológicas degenerativas [FIGURA 1-1; FIGURA 1-2], esta última deve-se principalmente à facilidade de aplicação da terapia: ausência de barreiras e resposta imunológica. Ainda, outros estudos avaliam os efeitos do emprego de RNA interferente em hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, cicatrização hipertrófica etc. (PARLEA et al., 2016; clinicaltrials.gov/Search Results, 27/03/2018).

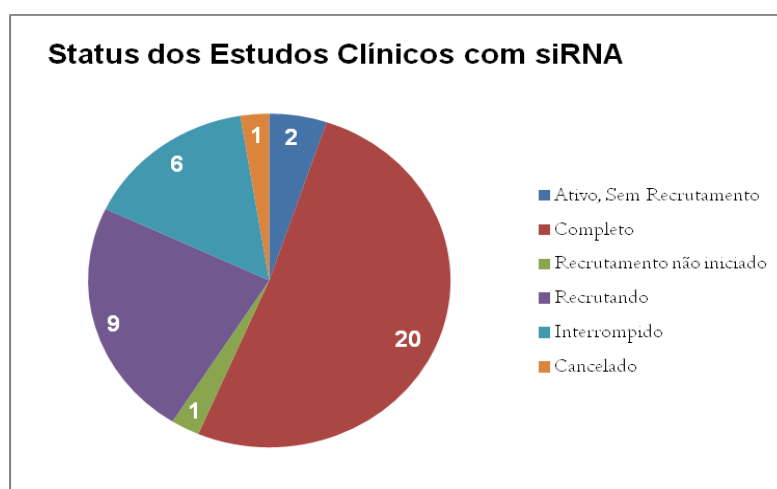


Figura 1-1. Estudos clínicos com siRNA de acordo com a fase/status (Ref.: clinicaltrials.gov/Search Results 27/03/2018)

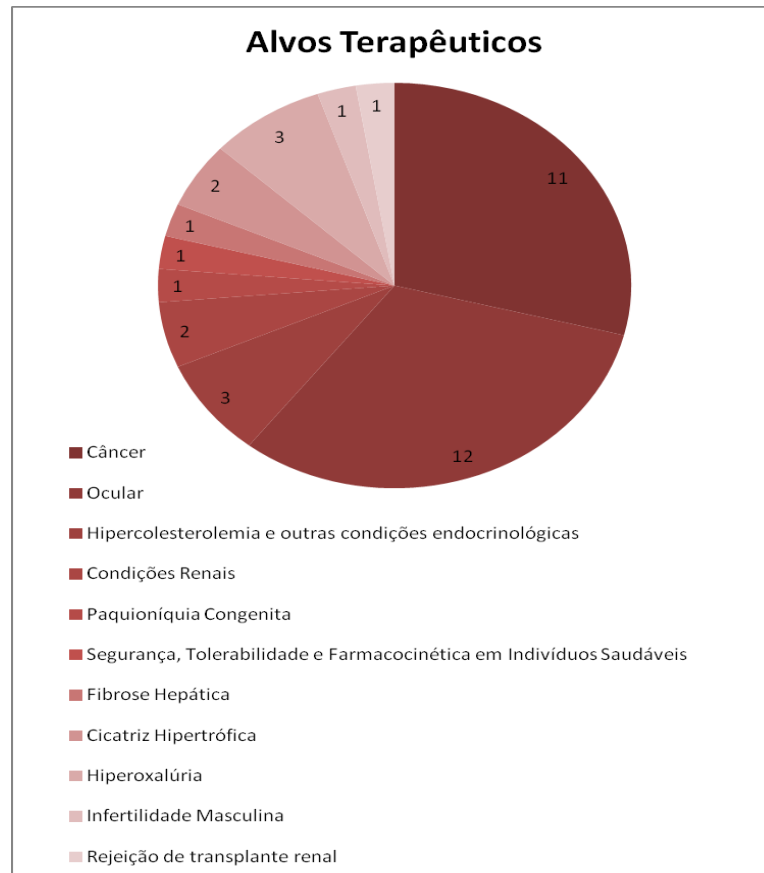


Figura 1-2. Distribuição dos estudos clínicos com siRNA de acordo com as condições dos pacientes/alvos terapêuticos (Ref.: [clinicaltrials.gov/Search Results](https://clinicaltrials.gov/Search/Results) 27/03/2018)

Contudo, o que se verificou em diversas pesquisas sobre os efeitos do siRNA em pequenos animais no início das investigações terapêuticas foi que uma grande parcela dos efeitos terapêuticos observados deviam-se, em grande parte, aos chamados efeitos *off-target* (fora do alvo) e não à interferência exclusiva de um único gene alvo, uma vez que a seleção inadequada do siRNA específico para o mRNA alvo pode permitir sua interação com outras sequências onde o pareamento é homólogo, mas não-idêntico (PEER; LIEBERMAN, 2011). É importante ressaltar também que os siRNA sendo avaliados como potenciais fármacos não se tratam somente de siRNAs desenvolvidos para suprimir um gene específico por vez, mas também estão sendo utilizadas moléculas que mimetizam os miRNA ao suprimir, ainda que em menor intensidade, se consideradas individualmente, a expressão de vários genes de forma simultânea, ocasionando resultados sinérgicos e mais estáveis.

Ainda são diversos os desafios envolvidos na efetiva implementação desta técnica na terapêutica, dentre estes, os mais evidentes envolvem a barreira da entrega específica destas moléculas ao seu sítio de ação *in vivo* (PARLEA et al., 2016). Como mencionado anteriormente, a maior parte dos estudos clínicos e pré-clínicos sendo conduzidos atualmente buscam lidar com o desafio de tratar doenças que requerem um eficiente método para a entrega sistêmica, sendo o câncer um dos principais exemplos.

Para se atingir o sítio ativo por meio da administração sistêmica é necessário lidar com mais do que o desafio da internalização, liberação (ex.: escape endossomal) e acumulação de siRNAs no citoplasma. Outros desafios também estão presentes em diversos níveis do processo de entrega e incluem as próprias barreiras extracelulares: as interações com os componentes sanguíneos, implicando numa baixa estabilidade e sua conseqüente degradação no plasma sanguíneo (com uma meia-vida variando de alguns minutos até uma hora); captura inespecífica por outros órgãos e capilares, e, por conta disso, efeitos fora do alvo; grande variabilidade no padrão de biodistribuição; *clearance* hepato-renal; assim como o desencadeamento de respostas imunológicas (PEER; LIEBERMAN, 2011; PARLEA et al., 2016).

Assim, os esforços para se desenvolverem estratégias de entrega de siRNA precisam lidar com os diversos estágios mencionados: proteção contra a degradação e ativação imunológica na fase de circulação, entrega dirigida ao sítio de ação, internalização através da membrana celular, escape endossomal e silenciamento gênico no citoplasma (PEER; LIEBERMAN, 2011).

Em resumo, diversos desafios ainda devem ser transpostos antes que siRNAs possam ser implementados como agentes terapêuticos. Um efetivo sistema de entrega deve ser capaz de: (a) proteger as moléculas de ácido nucleico da degradação durante a entrega sistêmica; (b) suportar circulação prolongada sem ser eliminado através da filtração renal; (c) acumular dentro do tecido alvo; (d) adentrar a células-alvo via um mecanismo específico de captura; (e) ter sua captura celular iniciada através de endocitose; (f) escapar do compartimento endossomal para evitar a degradação dentro do lisossomo; e (g)

desmontar-se no citoplasma para efetiva liberação da sua carga de siRNA (GUJRATI; VAIDYA; LU, 2016).

4.2 Panorama das técnicas de entrega farmacológica aplicadas à terapia com siRNA

4.2.1 Evitando a degradação plasmática: métodos físicos, modificações moleculares e conjugação

RNA exógeno administrado sistemicamente pode desencadear resposta imune através da ativação de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) via mecanismos *toll-like receptors* dependentes (TLR7, TLR8 e TLR3) ou independentes (PKR – proteína quinase R; RIG-I - gene induzido por ácido retinoico-I). A proteína RIG-I medeia uma resposta imune ao reconhecer *uncapped* RNA 5'-fosforilado (ASAI; OKU, 2014; PARLEA et al., 2016). O *naked* RNA, ou RNA “desprotegido”, pode ser administrado diretamente no sítio alvo por meio de uma diversidade de métodos físicos, frequentemente auxiliados por alta concentração ou por uma força mecânica, magnética ou elétrica. Microinjeções nucleares ou citoplasmáticas, mediação elétrica, compressão celular, sonoporação (ultrassom), e transfecção óptica, são os meios convencionais de transfecção que possibilitam a entrega das moléculas de ácido nucleico diretamente ao sítio alvo (PARLEA et al., 2016)

Na entrega sistêmica, dado que a estrutura de ribose-fosfato do RNA fica altamente suscetível à hidrólise enzimática, uma das possibilidades para se aumentar sua estabilidade plasmática é justamente através de modificações moleculares. A alta versatilidade química do RNA possibilita modificações simples na posição ribose 2', assim como na posição 3' no término do oligonucleotídeo. Nessa extremidade, o grupo fosfato pode ser substituído por fosfotioato ou boranofosfato. No entanto, demonstra-se que embora essa última modificação seja eficaz em prolongar a meia-vida do siRNA, pode resultar em redução da

atividade de interferência, além de toxicidade causada por metabólitos (ASAI; OKU, 2014; PARLEA et al., 2016).

A utilização de nucleotídeos modificados pode reduzir a ativação da resposta imune inata. Por exemplo, a troca da 2'-hidroxila das uridinas por 2'-fluor, 2'-deoxi ou 2'-O-metil reduz drasticamente o reconhecimento de RNA exógeno por receptores *Toll-like* (ASAI; OKU, 2014; PARLEA et al., 2016).

Dentre as técnicas de modificação molecular mais eficazes na entrega de siRNA, a conjugação com outras pequenas moléculas, como o colesterol, por exemplo, permite que ocorra a ligação direta com receptores celulares e foi a primeira demonstração desta técnica a obter sucesso terapêutico (PEER; LIEBERMAN, 2011). Além disso, tal modificação ocasiona um aumento na retenção do siRNA na circulação por conta da ligação com partículas de albumina, LDL e HDL. Uma técnica similar são os *policonjugados dinâmicos* de siRNA. Tratam-se de siRNA conjugados a polímeros penetradores de membrana (como por exemplo um poli(viniléter) anfipático – polibutil-aminovinil éter (PBAVE) nos quais os grupos amino são modificados com anidrido málico formando ligações maleato ácido-lábeis). Para esses conjugados, a atividade só é iniciada após exposição ao ambiente ácido do endossomo. Ainda que a potencial toxicidade não tenha sido completamente compreendida, sugere-se que estes policonjugados dinâmicos causem estimulação imune e algum nível de toxicidade hepática. Porém, em determinados quadros clínicos tais efeitos colaterais podem até ser considerados clinicamente aceitáveis (PEER; LIEBERMAN, 2011).

Outra variação da técnica são as quimeras aptâmero-siRNA que fundem um siRNA com uma outra estrutura sintética de RNA, o aptâmero, a qual pode ser selecionada visando uma ligação de alta afinidade e especificidade a um ligante de superfície celular, uma vez que apresentam propriedades de reconhecimento molecular comparável a anticorpos. Pelo fato de conterem apenas RNA, não é esperado que essas quimeras estimulem respostas mediadas por anticorpos e também, por não se tratarem de elementos citotóxicos, que não estimulem a produção de *interferons* e/ou citocinas inflamatórias (PEER; LIEBERMAN, 2011).

4.2.2 Perspectivas nanotecnológicas na entrega farmacológica de siRNA terapêutico

Por conta do rápido *clearance* renal, quando não submetidos a modificações moleculares ou conjugados a outras moléculas, siRNAs administrados sistemicamente requerem um carreador para garantir uma meia-vida razoável de circulação, exceto, possivelmente, se o alvo se tratar do próprio túbulo renal proximal, onde os siRNAs tendem a se acumular espontaneamente. Porém, estes carreadores devem preferencialmente ser feitos de um material totalmente biodegradável para evitar acumulação indesejada e provavelmente tóxica no corpo (PEER; LIEBERMAN, 2011). As nanopartículas possuem diversas vantagens com relação a outros sistemas de entrega farmacológica: pequena dimensão, grande área de superfície, estabilidade em meio fisiológico, e superfícies imunologicamente inertes que lhes garantem boa retenção *in vivo* (AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018).

Nanoestruturas carreadoras têm se mostrado promissoras em diversos estudos para driblar as barreiras da entrega sistêmica dirigida de siRNAs e, de acordo com sua composição, podem ser exploradas duas modalidades distintas de entrega: *passiva* ou *ativa*.

A entrega passiva explora a tendência inerente das nanoestruturas de acumularem-se em órgãos do sistema retículo-endotelial, devido aos capilares fenestrados e células fagocíticas presentes nestes, como os monócitos e macrófagos (PEER; LIEBERMAN, 2011). Além disso, é necessário que haja uma manipulação racional de suas propriedades biofísicas, como tamanho, forma e potencial *zeta* (indicador de carga de superfície). No transporte ativo, por sua vez, a superfície externa do nanotransportador pode ser decorada com grupos direcionadores, tais como proteínas, peptídeos, pequenas moléculas, anticorpos ou aptâmeros, capazes de desencadear a endocitose mediada por receptores (AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018).

Em geral, quanto menor e mais hidrofóbica for a molécula, mais rapidamente ela irá se difundir através da bicamada lipídica da membrana. Dado

que a pinocitose ocorre virtualmente em todas as células e envolve a internalização de vesículas com tamanhos que variam de 50nm a 5µm, estas tenderiam a ser as dimensões limítrofes em se tratando de moléculas desenvolvidas para a entrega de siRNA. Contudo, atualmente há um consenso entre diversos autores de que o sistema de entrega deve possuir menos de 200nm para que haja uma eficiente captura tecidual e celular (AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018). A endocitose, entretanto, é a modalidade mais próspera à exploração terapêutica da interferência por RNA e se dá quando a partícula de entrega interage com receptores específicos e é seletivamente internalizada. Há dois subtipos principais de mediação por receptores: endocitose mediada por clatrina (partícula com ~120nm) e endocitose mediada por caveolina (~80nm). (AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018). O escape endossomal e a desagregação seletiva da nanoestrutura no citoplasma são outras duas barreiras a serem superadas no desenvolvimento de sistemas de entrega celular de siRNA.

A forma das partículas finais também afeta o comportamento e captura celular. Uma cinética de liberação de ordem zero, o objetivo de muitas estruturas de liberação controlada, foi alcançada com uma partícula semiesférica que só permitia a degradação em sua face plana. As partículas observadas, entretanto, possuíam dimensões milimétricas e, portanto, não se mostraram viáveis para muitas aplicações *in vivo*. O transporte das partículas no corpo, independente da forma de administração, será afetado pela forma das partículas: partículas não-esféricas podem tanto se alinhar ou turbilhonar no fluxo sanguíneo. Um exemplo prático da implicação das formas das partículas pode ser observado no baço, órgão no qual as unidades filtrantes são descritas como fendas, pressupondo-se a presença de assimetrias. No baço, partículas esféricas devem ser menores que 200nm em diâmetro para serem filtradas, contudo hemácias (forma discal e flexível) com diâmetros de ~10µm passam comumente através do baço, demonstrando a importância não apenas da forma e tamanho, mas também da maleabilidade das estruturas. O extravasamento das partículas através das fenestras entre as células endoteliais, predominantes na vasculatura tumoral, também irá depender das propriedades reológicas das partículas, especialmente

da orientação e contato com as paredes dos vasos, que devem ser significativamente afetadas pela forma. Além disso, a forma das partículas também irá influenciar na habilidade de direcionamento/tempo de interação com o alvo; em particular, a face que se estende da célula para dentro do fluxo, determinando assim a longevidade da interação com o alvo (CHAMPION; KATARE; MITRAGOTRI, 2007). Contudo os resultados encontrados por diferentes autores ainda são conflitantes quanto à forma ideal das partículas carreadoras. Outro ponto importante é que sistemas de entrega com maior carga superficial positiva, representada pelo potencial zeta, ligam-se com maior força à membrana celular e apresentam maior taxa de captura celular (AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018).

Uma vez driblada a barreira da captura celular, o sistema de entrega deve ser capaz de escapar a via endocítica. A nanotecnologia pode também auxiliar na concepção de nanocarreadores que incorporem características que facilitem o escape endossomo-lisossomal, como ilustrado na Figura 2.

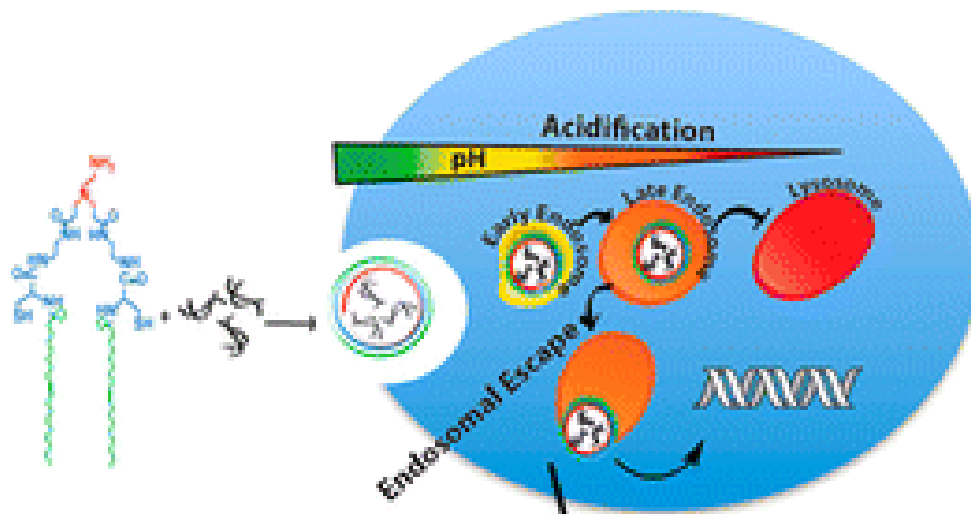


Figura 2. Exemplo de escape endossomal por desagregação da nanoestrutura pH-sensível, liberando o siRNA (GUJRATI; VAIDYA; LU, 2016)

A. Nanopartículas lipídicas

Lipossomos:

Lipossomos são vesículas artificiais formadas por uma bicamada lipídica e possuem um interior aquoso. São caracterizados por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e habilidade de carregar tanto fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos. Os lipossomos catiônicos são os que apresentam a maior eficiência de encapsulação de siRNA (AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018). Entretanto, sua aplicação na entrega de material genético terapêutico é limitada por variações na eficiência de transfecção e pela toxicidade sistêmica quando injetados. A técnica de peguilação, um processo através do qual moléculas de polietilenoglicol (PEG) são ligadas covalentemente à superfície externa do lipossomo, aumenta o tempo de circulação das vesículas no organismo, dado que as moléculas de PEG são “ignoradas” pelo sistema imune e a velocidade de eliminação passa assim a ser muito mais lenta. Demonstrou-se também a capacidade em proteger as cargas positivas dos lipossomos catiônicos e o aumento da estabilidade *in vivo*. (PÁRRAGA et al., 2015) Outros desafios dessas vesículas envolvem o alto custo de produção e escalonamento de manufatura.

A escolha do lipídio com os domínios hidrofóbico, hidrofílico e o *linker* desejados ditará as interações resultantes com os siRNA e o *design* da partícula em geral. Exemplos de lipossomos empregados em estudos pré-clínicos de entrega de siRNA são os SNALPs (*Stable Nucleic Acid-Lipid Particles*). Tratam-se de nanopartículas lipídicas dirigidas de aproximadamente 100nm com baixa proporção de lipídios catiônicos, capazes de incorporar siRNA e são cobertos com um conjugado difuso do lipídio-polietilenoglicol (PEG). A cobertura por lipídio-PEG estabiliza as partículas durante a formação e garante um exterior neutro e hidrofílico que previne contra o rápido *clearance* sistêmico (PEER; LIEBERMAN, 2011). Embora lipídios catiônicos sejam conhecidamente tóxicos, o único evento adverso reportado em estudos pré-clínicos com SNALPs foi a liberação transiente de enzima hepática. Outras formulações com lipossomos catiônicos, com maior

concentração de lipídeos que as *SNALPs*, não induziram somente um efetivo silenciamento genético, mas também elevaram os níveis de citocina e toxicidade e, portanto, não demonstraram relevante aplicação clínica (PEER; LIEBERMAN, 2011).

B. Nanopartículas Não-Lipídicas:

Nanopartículas poliméricas:

Tratam-se de sistemas coloidais sólidos e biodegradáveis (YANG et al., 2016; MISHRA; BALEKAR; MISHRA, 2017) que podem ocorrer em duas formas principais: como nanoesferas, que consiste de uma minuciosa dispersão do fármaco em uma matriz polimérica; e na forma de nanocápsulas, nas quais o fármaco é contido em cavidades delimitadas por uma cobertura polimérica [FIGURA 3].

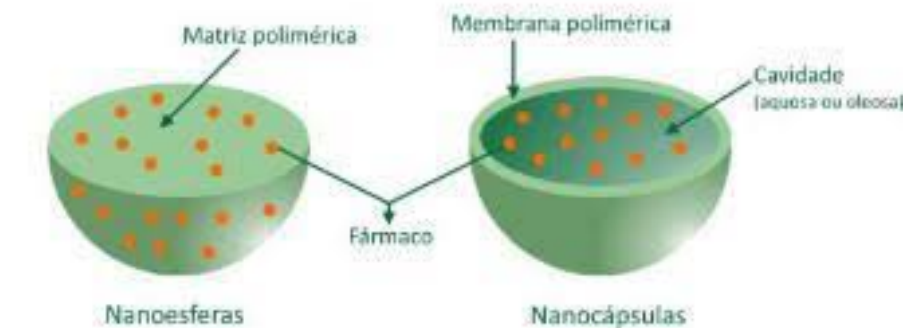


Figura 3. Esquemática das estruturas de uma nanoesfera polimérica à esquerda e de uma nanocápsula à direita, carregadas com o fármaco em sua matriz e em seu núcleo, respectivamente. (QADIR, 2017)

Nanopartículas compostas por polímeros catiônicos complexados com siRNA por meio de interações eletrostáticas constituem os materiais dominantes utilizados na entrega, devido principalmente à relativa simplicidade de síntese. Outras vantagens envolvem as propriedades químicas passíveis a modificações que aumentem sua captura, a alta estabilidade química e a biocompatibilidade (PARLEA et al., 2016).

Polímeros polissacarídeos naturais, como a quitosana, receberam grande atenção como nanocarreadores justamente porque apresentam alta biocompatibilidade associada a uma baixa toxicidade. No entanto, nanopartículas de quitosana possuem estabilidade coloidal subótima em meio fisiológico, além de possuírem alto *clearance* plasmático. Desta forma, e devido a suas inerentes propriedades mucoadesivas, a entrega farmacológica a mucosas apresenta-se como a mais adequada aplicação dos nanocarreadores baseados em quitosana (PÁRRAGA et al., 2015). Apesar de suas vantagens, trata-se de um polímero que não possui capacidade de tamponamento do pH, dificultando o seu escape endossomal por meio de técnicas como o efeito *esponja de prótons* (MISHRA; BALEKAR; MISHRA, 2017).

O efeito *esponja de prótons*, uma técnica comumente empregada, baseia-se na hipótese de que o tamponamento do pH pode facilitar o escape da via endocítica ao evitar a acidificação do endossomo. Demonstra-se que quando o endossomo se esforça para se tornar ácido, a célula continuamente bombeia prótons para o seu interior seguida pela entrada passiva de íons cloreto, e assim, por conta do aumento da concentração iônica, ocorre o influxo aquoso seguido por ruptura do endossomo por pressão osmótica (GUJRATI; VAIDYA; LU, 2016). A capacidade de tamponamento desses polímeros deve-se à presença de grupos amiínicos secundários e terciários, os quais podem ser protonados e assim diminuir a acidificação do endossomo e sua evolução em lisossomo, o que acarretaria numa conseqüente degradação do material genético terapêutico.

Dendrímeros:

Correspondem a macromoléculas altamente ramificadas, *auto-montáveis* num padrão globular, tipicamente simétricas, como por exemplo carbosilana com amônio terminal carregado positivamente, poliamidoamida (PAMAM), polipropilenimina (PPI), entre outros. A estrutura típica de um dendrímero consiste de três partes: um “núcleo” central, que define o tamanho do interior e a quantidade e direção das ramificações; as unidades repetidas das ramificações,

as quais determinam o tamanho molecular e sua flexibilidade; e os grupos terminais, que, por fim, determinam a propriedade química e habilidade de interação (GANESH et al., 2013; AHMADZADA; REID; MCKENZIE, 2018). Os RNA a serem entregues formam um complexo com o dendrímero (chamado de *dendriplex*) baseado em interações eletrostáticas.

Dendrímeros de PAMAM acabaram demonstrando-se como uma das melhores alternativas para o transporte de ácidos nucleicos devido, principalmente a sua facilidade de síntese e acessibilidade comercial. Embora apresente evidências de citotoxicidade, esta pode ser minimizada através de algumas manipulações de síntese sem comprometer a capacidade de silenciamento genético. Dendrímeros de PPI também demonstraram-se eficientes no silenciamento genético (MISHRA; BALEKAR; MISHRA, 2017) Desta forma, as vantagens dos dendrímeros envolvem a proteção do conteúdo de RNA contra degradação, habilidade de carregar uma variada gama de compostos e biocompatibilidade. Por outro lado, as desvantagens são citotoxicidade não-específica, acumulação hepática devida à alta densidade de carga, assim como rápido *clearance* e limitado controle sobre liberação do fármaco.

Nanopartículas metálicas/inorgânicas:

Numerosas nanopartículas inorgânicas são consideradas prospectivas como transportadores de entrega de siRNA para aplicação terapêutica. Dentre elas estão o nanotubos de carbono (CNTs) e materiais metálicos como óxido de ferro, *quantum dots* (QDs) e ouro. Os CNTs são nanométricos em tamanho e possuem características físicas e químicas que se apresentam como uma nova escolha em aplicações como a terapia gênica e bioengenharia. Considera-se que esses tubos são capazes de atravessar facilmente as membranas plasmáticas das células, alocando-se diretamente no citoplasma dos seus alvos. Tal capacidade é explicada através da configuração nanométrica, de um método de internalização que não requer endocitose e que não induz a morte celular. Usualmente, esses tubos são classificados como dotado de mono ou multi-paredes. Podem ser

especialmente desenvolvidos em função da funcionalização para entrega de siRNA.

Nanopartículas magnéticas também têm surgido como agentes nanoteranósticos (agente nanométrico que possui funções terapêuticas e diagnósticas integradas) para exames de imagens em tumores e como carreadores de fármacos devido às suas propriedades diversas. Essas partículas consistem de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético (SPIOs) e partículas de tetróxido de ferro. A maior área superficial dos SIOs tornam a alteração funcional possível e possibilitam também a conjugação com moléculas de direcionamento, fármacos e agentes de imagem.

Quantum Dots semicondutores são nanopartículas emissoras de luz que estão sendo progressivamente mais aplicadas como agentes de imagem biológicos e identificadores de provas. Também possuem a capacidade de servir como direcionadores fotoestáveis para a entrega de siRNA. O maior desafio no uso dos *Quantum Dots* como provas de imagem multifuncionais e vetores de entrega farmacológica é sua toxicidade. Isto deve-se ao fato de sua composição contar com elementos muito tóxicos como cádmio, selênio e telúrio.

Entretanto, apesar da eficiência na entrega e direcionamento, essas duas últimas técnicas tratam-se de nanoestruturas que não possuem capacidade de encapsulação das moléculas de siRNA e conseqüente proteção contra degradação, reconhecimento imune, escape endossomal etc. e não são consideradas como, boas alternativas para driblar os desafios da aplicação terapêutica dos siRNA especificamente.

Por fim, nanopartículas de ouro (AuNPs) também demonstraram grande potencial como sistemas de entrega de siRNAs devido à sua alta biocompatibilidade, facilidade de síntese, elevada razão área-volume e funcionalização de superfície simplista. Recentemente, uma variedade de AuNPs tem sido avaliada para a entrega de siRNA. Podem ser funcionalizadas com amônio catiônico quaternário ou recobertas com uma bicamada do lipídio catiônico PEI e modificação de oligonucleotídeos. Adicionalmente, nanopartículas de ouro

têm a capacidade de entrega dirigida de siRNA às células alvos.(MISHRA; BALEKAR; MISHRA, 2017)

5. Conclusão

Os estudos revisados demonstram que dificilmente existirá uma formulação ideal de nanocarreador e siRNA, porém podem ser identificadas características ideais de cada complexo para a entrega adequada em diferentes locais e doenças. A estratégia ideal de entrega pode variar dependendo do tecido alvo, do tipo celular e da doença sendo tratada. Uma vez desenvolvidas, cada uma dessas plataformas pode ser aplicada na entrega de qualquer sequência de siRNA.

De acordo com o levantamento realizado, é possível concluir que as estruturas químicas mais exploradas nas pesquisas de silenciamento gênico com siRNA são os peptídeos de penetração celular, lipossomos e nanopartículas poliméricas, principalmente por conta da facilidade sintética desses materiais, sendo as nanopartículas poliméricas as mais versáteis, considerando-se a vasta gama de possíveis materiais, modificações moleculares e formas que podem ser obtidas no seu desenvolvimento.

Portanto, conclui-se que diversos fatores devem ser considerados críticos no desenvolvimento de sistemas de entrega de RNA *in vivo*: a capacidade de proteger o RNA; especificidade pelo tecido e permeabilidade celular *in vivo*; liberação do RNA do carreador e distribuição homogênea dos RNAs no citossol após a liberação.

Ainda assim, uma característica é indispensável a um eficiente sistema de entrega: este deve ser capaz de liberar seu conteúdo do compartimento ácido do endossomo tardio e evitar a exposição deste às enzimas contidas dentro dos lisossomos.

6. Bibliografia

AHMADZADA, T.; REID, G.; MCKENZIE, D. R. Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 1, p. 69–86, 2018.

ASAI, T.; OKU, N. Systemic Delivery of Small RNA Using Lipid Nanoparticles. **Biol. Pharm. Bull**, v. 37, n. 2, p. 201–205, 2014.

CHAMPION, J. A.; KATARE, Y. K.; MITRAGOTRI, S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 121, n. 1–2, p. 3–9, 2007.

CHOI, K. Y.; SILVESTRE, O. F.; HUANG, X.; MIN, K. H.; HOWARD, G. P.; HIDA, N.; JIN, A. J.; CARVAJAL, N.; LEE, S. W.; HONG, J.-I.; CHEN, X. A Versatile RNA-Interference Nanoplatfrom for Systemic Delivery of RNAs. **ACS nano**, n. Xx, p. 4559–4570, 2014.

clinicaltrials.gov Search Results 04/12/2018. p. 1–8, 2018. Disponível em: <clinicaltrials.gov>.

FRANÇA, N. R. De; MESQUITA JÚNIOR, D.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 695–702, 2010.

GANESH, S.; IYER, A. K.; MORRISSEY, D. V.; AMIJI, M. M. Hyaluronic acid based self-assembling nanosystems for CD44 target mediated siRNA delivery to solid tumors. **Biomaterials**, v. 34, n. 13, p. 3489–3502, 2013.

GUJRATI, M.; VAIDYA, A.; LU, Z. R. Multifunctional pH-Sensitive Amino Lipids for siRNA Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 19–35, 2016.

GÜNTHER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W.; AIGNER, A. 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.

MISHRA, D. K.; BALEKAR, N.; MISHRA, P. K. Nanoengineered strategies for

siRNA delivery: from target assessment to cancer therapeutic efficacy. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 2, p. 346–358, 2017.

PARLEA, L.; PURI, A.; KASPRZAK, W.; BINDEWALD, E.; ZAKREVSKY, P.; SATTERWHITE, E.; JOSEPH, K.; AFONIN, K. A.; SHAPIRO, B. A. Cellular Delivery of RNA Nanoparticles. **ACS Combinatorial Science**, v. 18, n. 9, p. 527–547, 2016.

PÁRRAGA, J. E.; RAVINA, M.; SEIJO, B.; SANCHEZ, A. Nanocarriers: siRNA Delivery. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**, n. May, p. 5045–5061, 2015.

PEER, D.; LIEBERMAN, J. Special delivery: Targeted therapy with small RNAs. **Gene Therapy**, v. 18, n. 12, p. 1127–1133, 2011.

QADIR, M. I. Nanopreparations for better drug delivery. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 6, p. 2301–2309, 2017.

STEVENSON, M. Therapeutic potential of RNA interference. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 17, p. 1772–1777, 2004.

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

YANG, Y.; XIA, X.; DONG, W.; WANG, H.; LI, L.; MA, P.; SHENG, W.; XU, X.; LIU, Y. Acid Sensitive Polymeric Micelles Combining Folate and Bioreducible Conjugate for Specific Intracellular siRNA Delivery. **Macromolecular Bioscience**, v. 16, n. 5, p. 759–773, 2016.

Guilherme de N. Luis 27/09/2018
Data e assinatura do aluno(a)

Gyayn Paragel 27/09/2018
Data e assinatura do orientador(a)