

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Karen Cristina Cordeiro dos Santos

**Estudo da utilização de nanocarreador para liberação de siRNA para os genes AKT3 e
PD-L1 em linhagem celular de câncer mama triplo-negativo**

Florianópolis

2021

Karen Cristina Cordeiro dos Santos

Estudo da utilização de nanocarreador para liberação de siRNA para os genes AKT3 e PD-L1 em linhagem celular de câncer mama triplo-negativo

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Coorientador: Dra. Milene Dalmina

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Karen Cristina Cordeiro dos

Estudo da utilização de nanocarreador para liberação de siRNA para os genes AKT3 e PD-L1 em linhagem celular de câncer mama triplo-negativo / Karen Cristina Cordeiro dos Santos ; orientador, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, coorientador, Milene Dalmina, 2021.

61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. siRNA. 3. Nanopartículas. 4. Câncer de mama triplo-negativo. I. Creczynski-Pasa, Tânia Beatriz . II. Dalmina, Milene. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Karen Cristina Cordeiro dos Santos

Estudo da utilização de nanocarreador híbrido de fosfato de cálcio e copolímero para entrega segura de siRNA em linhagem celular de câncer mama triplo-negativo

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia

Florianópolis, 23 de setembro de 2021.

Prof. Dr^a. Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr^a Tânia Beatriz Creczynski-Pasa
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr^a Iara Fabricia Kretzer
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr^a Hellen Karine Stulzer
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha amada família, Albani,
Fernanda e Nicoly.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Albani, Fernanda e Nicolý, por toda a força, incentivo e amor. Vocês são tudo para mim. Obrigada por cada conselho, por cada colo nos momentos difíceis e por estarem comigo em todas horas. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Amo vocês.

Aos colegas de curso que se tornaram família, Ana, Douglas e Karol. Obrigada por todos os dias que tornaram esse período inesquecível. Vocês fizeram tudo mais leve e colorido.

Aos meus anjinhos de quatro patas, Baby e Bonnie. Obrigada por tanto amor e companhia.

Ao meu amigo Leonardo, por todos os conselhos e por sempre me motivar a continuar. Obrigada por tornar as tardes de estágio melhores.

À Professora Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, orientadora deste trabalho, por todo o apoio e incentivo desde a minha chegada ao laboratório. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos que permitiram que o amor pela pesquisa se desenvolvesse em mim também.

À Milene Dalmina, co-orientadora deste trabalho, por toda a paciência, incentivo e pelas incontáveis reuniões. Obrigada por todos os ensinamentos e conselhos que excederam a pesquisa e vou levar para a vida.

Aos colegas do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas-GEIMM, pelo ambiente incrível de pesquisa e todo o acolhimento. Agradeço a Anne, que me recebeu de braços abertos no laboratório e me acolheu em sua pesquisa. Agradeço também as pós-graduandas Adny e Júlia, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço de coração por toda a ajuda e amparo.

Às professoras Hellen e Iara, por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho e por todas as contribuições.

Ao LAMEB e professor Eduardo M. Dalmarco pelos equipamentos disponibilizados.

A todos os professores pelo ensino de qualidade.

À Universidade Federal de Santa Catarina pelo ensino de excelência, por todas as oportunidades, e por ter se tornado casa.

“Dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits préparés” (PASTEUR, 1854)

RESUMO

Câncer é o termo utilizado para referir-se a um grande grupo de doenças multifatoriais que apresentam descontrole do crescimento e da proliferação celular. Considerando todas as formas de câncer, exceto pele não-melanoma, o câncer de mama é, em nível mundial, o mais incidente no gênero feminino, e o subtipo triplo-negativo, apesar de ser diagnosticado com menor frequência, é de significativa relevância médica devido ao prognóstico frequentemente desfavorável e escassez de alternativas terapêuticas eficazes. A utilização de siRNA é uma estratégia que vem apresentando destaque recentemente, sendo baseada na inibição da expressão de proteínas essenciais para desenvolvimento e progressão da doença. Dessa forma, os genes AKT3 e PD-L1 foram selecionados com base em revisão da literatura, análise da expressão gênica no subtipo triplo-negativo e sinergismo entre os alvos. AKT3 está relacionado com o crescimento celular e a expressão desta proteína tem sido associada a fenótipos tumorais de maior agressividade. PD-L1, por sua vez, é uma proteína responsável por inibir a resposta imunológica no microambiente tumoral. Entretanto, uma vez que a entrega sistêmica de ácidos nucleicos apresenta diversas barreiras, como o reconhecimento pelo sistema imunológico, baixa estabilidade em ambiente biológico e dificuldade de captação celular, torna-se evidente a necessidade de carreadores que promovam a respectiva entrega efetiva. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi o preparo e a caracterização de duas formulações de nanopartículas híbridas de CaP-PEG-b-poli(GLU)-poliânion, com diferentes concentrações poliméricas, para posterior avaliação da eficácia de entrega de material *in vitro*. Para tanto, nanopartículas contendo fosfato de cálcio e copolímero foram preparadas a partir da técnica de *self-assembly* através de mistura estequiométrica simples de soluções aquosas, dando origem a partículas híbridas contendo componentes orgânicos (copolímero e siRNA) e inorgânicos (fosfato de cálcio). Através de medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), foi possível observar uma distribuição de tamanho estreita para ambas as formulações, sendo que o diâmetro médio foi de $58,3 \pm 1,7$ e $48,6 \pm 0,07$, e o índice de polidispersão (PdI), foi de $0,09 \pm 0,01$ e $0,11 \pm 0,01$, para os sistemas contendo copolímero nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os ensaios de estabilidade indicaram que a mudança na concentração de polímero ocasionou redução do período de estabilidade da formulação, em que nanopartículas contendo maior concentração de copolímero mantiveram-se estáveis durante 65 dias em a temperatura controlada de 4°C, enquanto o sistema contendo menor concentração polimérica apresentou estabilidade de 35 dias em condições semelhantes. Ambas as formulações permaneceram estáveis em temperatura ambiente por um período inferior a 3 dias. Assim, foi possível obter nanocarreadores adequados para aplicações biomédicas a partir de uma técnica simples e de baixo custo, sendo a nanopartícula constituída por polímero na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ selecionada para posterior avaliação *in vitro*.

Palavras-chave: siRNA. Nanopartículas. Câncer de mama triplo-negativo. AKT3. PD-L1.

ABSTRACT

The term cancer refers to a large group of diseases characterized by abnormal growth and uncontrolled proliferation. Breast cancer (BC) is the most common malignancy worldwide, except for non-melanoma skin cancer. While triple-negative breast cancer (TNBC) is responsible for a minority of BC phenotypes, there is a urgent clinical need for new therapies development, since this subtype shows an aggressive nature and poorer prognosis, with a lack of available treatments. Thus, siRNA application has been considered a promising therapeutic strategy based on specific gene silencing of essential proteins for disease development and progression. With this in mind, AKT3 and PD-L1 genes were selected based on literature review, gene expression analysis in the triple-negative subtype, and synergism between the targets. AKT3 is related to cell growth, and the expression of this protein has been associated with aggressive tumor phenotypes. PD-L1, in turn, is a protein responsible for inhibiting the tumor microenvironment immune response. However, since these nucleic acids need to overcome several barriers for systemic delivery, such as recognition by the immune system, low stability in the biological environment, and difficulty of cellular uptake, the need for carriers that promote their effective delivery becomes evident. In this context, the aim of the present study was to prepare and characterize two CaP-PEG-b-poly(GLU)-polyanion hybrid nanoparticle formulations with different polymer concentrations, aiming further evaluation of the *in vitro* siRNA delivery efficacy. To this end, nanoparticles containing calcium phosphate and copolymer were prepared using the self-assembly technique through simple stoichiometric mixing of the aqueous solutions, resulting in hybrid particles containing organic (copolymer and siRNA) and inorganic (calcium phosphate) components. Through dynamic light scattering (DLS) measurements, it was possible to observe a narrow size distribution for both formulations, with the average diameter being 58.3 ± 1.7 and 48.6 ± 0.07 , and the polydispersity index (Pdl), was 0.09 ± 0.01 and 0.11 ± 0.01 for the systems containing copolymer at concentrations of 1000 $\mu\text{g/mL}$ and 750 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The colloidal stability evaluation indicated that polymer concentration change caused a reduction in the stable time of the formulation, where nanoparticles containing a higher concentration of copolymer were stable for 65 days at a controlled temperature of 4°C , while the system containing a lower polymer concentration was stable for only 35 days under similar conditions. Both formulations remained stable at room temperature for a period inferior to 3 days. Thus, it was possible to obtain nanocarriers suitable for biomedical applications from a simple and low-cost technique, and nanoparticles containing polymer at 1000 $\mu\text{g/mL}$ concentration were selected for further *in vitro* evaluation.

Keywords: siRNA. Nanoparticles. Triple Negative Breast Cancer. AKT3. PD-L1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ativação da via PI3K/AKTmTOR no câncer.....	22
Figura 2 - Resultado de pesquisa Xena Browser.....	37
Figura 3 - Expressão de AKT3 e PD-L1 entre subtipos de câncer de mama através de escala de cor.....	38
Figura 4 - Expressão de AKT3 entre diferentes subtipos de câncer de mama.....	39
Figura 5 - Expressão de PD-L1 entre diferentes subtipos de câncer de mama.....	39
Figura 6 - Caracterização das nanopartículas.....	45
Figura 7 - Avaliação de estabilidade das nanopartículas híbridas preparadas utilizando PEG-Glu diluído a 1000 µg/mL.....	47
Figura 8 - Avaliação de estabilidade das nanopartículas híbridas preparadas utilizando PEG-Glu diluído a 750 µg/mL.....	48
Figura 9 - Curva padrão de siRNA.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação molecular do câncer de mama.....	20
Quadro 2 - Critérios avaliados para design de siRNA.....	42
Quadro 3 - Sequências de siRNA desenhadas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão de AKT3 entre subtipos de câncer de mama	40
Tabela 2 - Expressão de PD-L1 entre subtipos de câncer de mama.....	40
Tabela 3 - Expressão de AKT3 e PD-L1 entre linhagens celulares de câncer de mama.....	41
Tabela 4 - Caracterização das nanopartículas híbridas.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO2 - Proteína Argonauta 2

AKT - V-akt oncogene viral timoma murino homólogo

AKT1- V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 1

AKT2 - V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 2

AKT3 - V-akt oncogene viral timoma murino homólogo 3

ANOVA - Análise de Variância

BLAST - Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local

BRCA - *Breast Invasive Carcinoma*

CaP - Fosfato de Cálcio

CACLE - *Cancer Cell Line Encyclopedia*

CTLA-4 - Proteína T-Linfócito-Associada citotóxico 4

DLS – Espalhamento Dinâmico da Luz, do inglês, *Dynamic Light Scattering*

EPR - Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada

ER - Receptor de Estrogênio

FDA - *Food and Drug Administration*

HEPES - Ácido N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2- etanosulfônico]

HER2 - *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

IFN- γ - Interferon-gama

IL-2 - Interleucina 2

IL-10 - Interleucina 10

IMC - Índice de Massa Corporal

miRNA - microRNA

Mock - Nanopartícula vazia

mTOR - Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos, do inglês, *mammalian target of rapamycin*

PAM50 - *Prediction Analysis of Microarray 50*

PD-1 - Proteína de Morte Celular Programada 1

PdI - Índice de Polidispersão

PDK1 - 3-fosfoinositoldependente proteína quinase 1, do inglês, *phosphoinositide-dependent kinases*

PD-L1 - Ligante de Morte Celular Programada 1

PH - Domínio Homólogo a Pleclestrina, do inglês *pleckstrin homology*

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

PIP3 - Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PEG - Polietilenoglicol

PEG-Glu - Poli(etilenoglicol)- blocopoli(ácido glutâmico)

PEG-PAA - Poli(etilenoglicol)- blocopoli(ácido aspártico)

P-gp - Glicoproteína P

PR - Receptor de Progesterona

RISC - Complexo de Indução de Silenciamento de RNA

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAi - RNA de Interferência

RNAm - RNA Mensageiro

RSEM - *RNA-Seq Expression Estimation by Expectation–Maximization*

RNA-Seq - Sequenciamento de RNA

shRNA - *Short Hairpin RNA*

siRNA - *Small Interfering RNA*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas Project*

TGF- β - Fator de Transformação do Crescimento Beta

TIL - Linfócitos Infiltrados em Tumores

TNBC - *Triple Negative Breast Cancer*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	CÂNCER DE MAMA	19
2.2	AKT3 (V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3)21	
2.3	PD-L1 (LIGANTE DE MORTE CELULAR PROGRAMADA 1)	23
2.4	TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA.....	24
2.5	SISTEMAS DE ENTREGA DE SIRNA.....	27
2.6	NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CAP-PEG-B-POLI(GLU)-POLIÂNION	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	MATERIAIS.....	31
4.2	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AKT3 E PD-L1 ENTRE SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA.....	31
4.3	SELEÇÃO DE LINHAGENS CELULARES	31
4.4	DESENHO DA SEQUÊNCIA DE SIRNA	32
4.5	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CAP-PEG-B-POLI(GLU)32	
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS	33
4.7	ESTABILIDADE DO SISTEMA.....	33
4.8	ESTUDO DE EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE SIRNA.....	33
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	SELEÇÃO DOS GENES ALVO	35

5.2	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AKT3 E PD-L1 ENTRE SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA.....	37
5.3	SELEÇÃO DE LINHAGEM CELULAR	40
5.4	DESENHO DAS SEQUÊNCIAS DE SIRNA.....	42
5.5	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CAP-PEG- <i>b</i> -POLI(GLU)-POLIÂNION	43
5.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DO SISTEMA.....	46
5.7	ESTUDO DE EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE SIRNA.....	48
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	50
	REFERÊNCIAS:	51

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o termo genérico utilizado para referência a um grande grupo de doenças, podendo afetar diversos tecidos e órgãos, e que se caracteriza pelo crescimento e proliferação celular de maneira descontrolada (INCA, 2020a). A invasão de tecidos adjacentes e de outros órgãos por células tumorais caracteriza o processo de metástase, o qual está associado ao mau prognóstico dos pacientes e é uma das principais causas de morte por câncer (WHO, 2018).

Segundo estudos epidemiológicos, apenas no ano de 2020 foram estimados 19,3 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, com cerca de 10 milhões de mortes causadas por esta doença (SUNG, 2021). Entre todos os tipos de câncer, com exceção do câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres em todo o mundo, com aproximadamente 2,3 milhões de novos casos no ano de 2020, sendo atualmente a quinta causa de mortalidade por neoplasias considerando ambos os sexos, e a causa mais frequente de óbito por câncer do sexo feminino (INCA, 2021; SUNG, 2021). Entre os subtipos de câncer de mama, o triplo-negativo, responsável por aproximadamente 15% dos casos, é considerado o mais agressivo, apresentando maiores taxas de recidiva e menor sobrevida geral no cenário metastático em comparação com outras variantes (FOULKES, WILLIAM; SMITH, IAN; REIS-FILHO, 2010; ABRAMSON *et al.*, 2015).

Os tratamentos convencionais para o câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica ou imunoterapia. Entretanto, a maior parte dos tratamentos existentes atingem tanto células tumorais, como tecidos saudáveis, acarretando inúmeros efeitos adversos que podem levar a intoxicações graves (WAKS; WINER, 2019). Neste contexto, é evidente a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais específicas e, portanto, menos agressivas.

A terapia por RNA de interferência (RNAi), que atua através de silenciamento gênico pós-transcricional, tem sido considerada como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer mama e de diversas outras doenças. Esse tipo de terapia possibilita o controle da produção de proteínas através da interceptação de RNAs mensageiros (RNAm), de modo sequência específico, através de pequenas sequências de RNA regulatório, conhecidas como microRNAs (miRNAs) e *small interfering RNAs* (siRNAs) (HANNON, 2002; FIRE *et al.*, 1998; LARES; ROSSI; OUELLET, 2010). Para o câncer de mama triplo-negativo, o silenciamento de genes como AKT3 e PD-L1 através de siRNA poderia ser uma forma

interessante de terapia, uma vez que o primeiro gene está essencialmente relacionado à regulação de crescimento celular e a superexpressão dessa proteína tem sido relacionada a redução de sobrevida livre de doença (CHIN *et al.*, 2014; O'HURLEY *et al.*, 2014). Já o ligante de morte celular programada 1 (PD-L1) está associado a via do *checkpoint* imunológico e inibição de atuação do sistema de defesa no microambiente tumoral (SANMAMED; CHEN, 2014). Entretanto, uma vez que a entrega segura de ácidos nucleicos no tecido alvo é limitada devido a diversas barreiras extra e intracelulares que inviabilizam o uso clínico, torna-se necessário a adoção de estratégias de proteção dessas moléculas para entrega eficaz no organismo (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; HU *et al.*, 2020).

A utilização de nanocarreadores para transpor as limitações do uso da terapia por RNAi na clínica tem sido alvo de inúmeros estudos (PITTELLA *et al.*, 2011; XIN *et al.*, 2017; DE MELLO *et al.*, 2018). Neste contexto, destacam-se as nanopartículas cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP), que além de biocompatíveis, são capazes de adsorver moléculas polianiónicas, como siRNAs e miRNAs, sendo, desta maneira, promissoras para a entrega eficiente de ácidos nucleicos. A complexação com um bloco de copolímero poliânionico contendo polietilenoglicol (PEG) ao CaP permite controlar o tamanho dos cristais de fosfato de cálcio formados durante o processo de síntese, contendo o crescimento. Assim, é favorecida a obtenção de partículas em escala de tamanho nanométrica, adequadas para aplicação clínica. Ainda, a utilização de PEG promove maior estabilidade coloidal, além de evitar a captação pelo sistema monofagocitário, contribuindo para diminuir a imunogenicidade das partículas (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004; ZHANG; KATAOKA, 2009; ZHANG; LI; HUANG, 2014).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a preparação e caracterização de nanopartículas híbridas de fosfato de cálcio e copolímero para entrega efetiva de siRNA, com posterior avaliação da aplicabilidade do sistema *in vitro* em linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

Câncer é o termo genérico utilizado para referir-se ao conjunto de doenças que apresentam crescimento e proliferação celular descontrolados (INCA, 2020a). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), 19,3 milhões de novos casos dessa doença foram estimados para o ano de 2020, sendo que a estimativa de incidência para o ano de 2040 é de 28,4 milhões, o que caracteriza um aumento de 47% de acometimento da população (IARC, 2020).

O câncer de mama feminino é atualmente a malignidade mais comum em nível mundial, sendo responsável por aproximadamente dois milhões de novos casos de câncer diagnosticados a cada ano, qualificando-se desta forma como um problema público de saúde global (IARC, 2020; SUNG, 2021). No Brasil, é estimado que ocorra em torno de 66 mil casos de câncer de mama para cada ano do triênio 2020-2022, sendo esse o tipo mais incidente de câncer em mulheres, com exceção do câncer de pele não-melanoma, além de ser também a principal causa de mortalidade por neoplasias no sexo feminino (INCAb, 2020, 2021). O desenvolvimento de câncer de mama apresenta diversos fatores de risco, incluindo não somente predisposições genéticas, como também fatores não genéticos. Os fatores de risco não relacionados à hereditariedade incluem idade, índice de massa corporal (IMC) elevado, uso de terapia hormonal pós menopausa, uso de contraceptivos hormonais, consumo de álcool, sedentarismo, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, redução do período de aleitamento materno, entre outros (FENG *et al.*, 2018; BRITT; CUZICK; PHILLIPS, 2020).

O câncer de mama é um grupo de doenças altamente heterogêneo composto por diversos subgrupos associados a características histológicas e biológicas distintas que afetam diretamente a agressividade e responsividade dos tumores aos tratamentos. Deste modo, a classificação desses tumores nos respectivos subgrupos é essencial para uma abordagem terapêutica adequada (PEROU *et al.*, 2000; HARBECK *et al.*, 2019).

A classificação histológica dos tumores da mama é determinada com base na origem da célula afetada, denominando-se carcinoma quando o processo de carcinogênese é iniciado em células epiteliais. É importante ressaltar que a maior parte dos carcinomas formados na mama tratam-se de adenocarcinomas, ou seja, iniciados em tecido glandular, em células dos ductos ou lóbulos mamários. Os adenocarcinomas podem ser classificados ainda como *in situ*, quando não há invasão de tecidos adjacentes, ou invasivos, quando o tumor difunde-se a tecidos

vizinhos (ACS, 2019). Entretanto, a classificação histológica do câncer de mama apresenta inconveniências, uma vez que promove o agrupamento de tumores com características clínicas e biológicas distintas, não representando com fidelidade a diversidade das doenças e, portanto, possuindo pouca finalidade clínica preditiva (VIALE, 2012).

Neste contexto, a classificação molecular do câncer de mama tem destacado-se pelo valor prognóstico, dividindo os tumores de mama conforme a expressão de receptores hormonais de estrogênio e progesterona (ER e PR), bem como de receptores tipo HER2 (do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 - Classificação molecular do câncer de mama

Subtipo Tumoral	Receptores		
	ER	PR	HER2
Luminal A	+	+	-
Luminal B	+ ^a	+	+/-
HER2 Positivo	-	-	+
Basal Like	-	-	-
Normal-Like	Expressão dos componentes normais da mama (baixa celularidade tumoral)		

ER, Receptor de estrogênio; PR, receptor de progesterona; HER2, do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*. ^a Subtipo luminal B apresenta ER positivo em menores níveis de expressão do que luminal A. Fonte: PEROU *et al.* (2000); SORLIE *et al.* (2001) e HARBECK *et al.* (2019).

As abordagens terapêuticas convencionais utilizadas para o tratamento do câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia e tratamentos sistêmicos, como a quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. Os procedimentos cirúrgicos geralmente são a primeira escolha de tratamento nos estágios iniciais da doença, entretanto, a escolha do tratamento sistêmico deve ser personalizada considerando as características do paciente e do tumor (AYALA DE LA PEÑA *et al.*, 2019; WAKS; WINER, 2019).

O câncer de mama triplo-negativo (do inglês *triple negative breast cancer*, TNBC), que é incluído na classificação *basal like* em cerca de 50-75% dos casos (PEROU, 2010), é responsável por cerca de 15% dos diagnósticos dos tumores da mama. Esse subtipo, que não expressa ER, PR ou HER2, apesar de ser diagnosticado com menor frequência e acometer uma população mais jovem (< 50 anos), é altamente agressivo e apresenta taxas de recidiva mais

elevadas, além de possuir caráter fortemente invasivo e menor sobrevida geral após ocorrência de metástases. Esse conjunto de características confere um prognóstico frequentemente desfavorável aos pacientes com TNBC (FOULKES, WILLIAM; SMITH, IAN; REIS-FILHO, 2010; BADVE *et al.*, 2011; ABRAMSON *et al.*, 2015). Devido à ausência da expressão dos três marcadores moleculares principais, as opções de tratamento sistêmico para TNBC são mínimas, limitando-se principalmente à quimioterapia. Neste cenário, o TNBC é o tipo de câncer de mama que apresenta resposta mais completa a esta modalidade de tratamento (LIEDTKE *et al.*, 2008; COLLEONI *et al.*, 2010). Em contrapartida, os índices de recidiva e metástase são mais elevados do que o observado em outros subtipos, sendo as porcentagens de sobrevida em geral reduzidas (DENT *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2012).

2.2 AKT3 (V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 3)

AKT (do inglês, *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog*), também conhecida como proteína cinase B, é uma cinase serina-treonina pertencente à família AGC que faz parte da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, possuindo atividade essencial na regulação do crescimento, proliferação, sobrevivência, metabolismo, entre outros processos celulares (HANADA; FENG; HEMMING, 2004; BELLACOSA *et al.*, 2005). A ativação de AKT (Figura 1) envolve múltiplas etapas e é desencadeada por diversos fatores de crescimento, hipóxia, insulina, citocinas, entre outros. Resumidamente, a translocação e ancoramento de AKT para a membrana plasmática ocorre através de um fosfolípido originado por PI3K, o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que se liga ao domínio homólogo a pleclestrina (do inglês, *pleckstrin homology*, PH) de AKT, promovendo seu recrutamento. Ainda, a ligação de PIP3 a esse domínio ocasiona mudança conformacional da quinase, que permite a fosforilação de AKT nos resíduos Thr-308 e Ser-473 através das enzimas 3-fosfoinositoldependente proteína quinase 1 (do inglês, *phosphoinositide-dependent kinases*, PDK1) e proteína alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês, *mammalian target of rapamycin*, mTOR), respectivamente (BELLACOSA *et al.*, 1998; DATTA; BRUNET; GREENBERG, 1999; SARBASSOV *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2019).

Figura 1 - Mecanismo de ativação da via PI3K/AKTmTOR no câncer

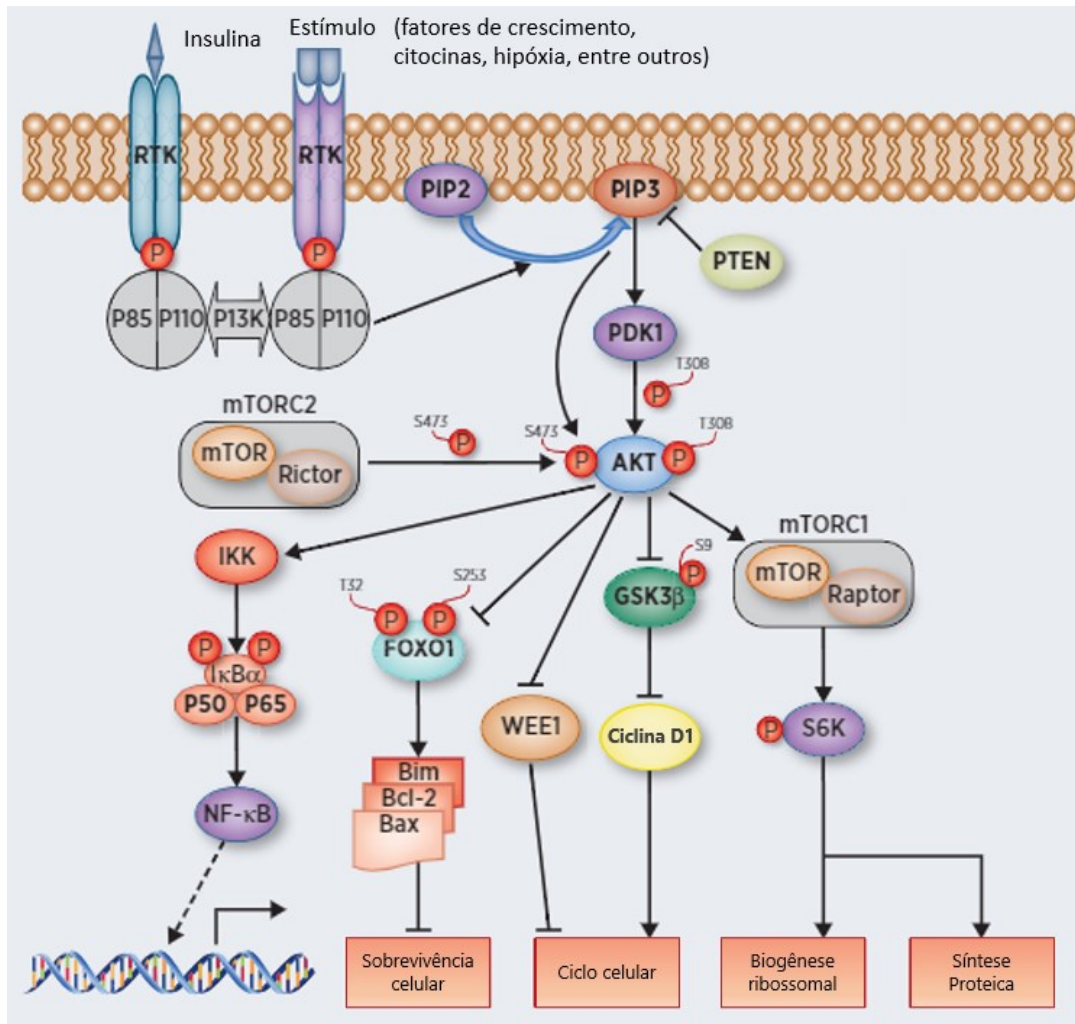


Diagrama sistemático da via de sinalização PI3K/AKT. Estímulos promovem a ativação de PI3K, que, por sua vez, converte PIP2 em PIP3, responsável por ligar-se ao domínio PH de AKT e promover a fosforilação de seus resíduos Thr-308 e Ser-473 através das cinases PDK1 e mTOR. A AKT ativada promove a fosforilação de seus substratos a jusante, estimulando a sobrevivência celular, alterações no ciclo celular, biogênese ribossomal e síntese proteica. RTK, receptor tirosina-quinase; PI3K, fosfoinositídeo 3-cinase; PIP2, fosfatidilinositol difosfato; PIP3, fosfatidilinositol trifosfato; PTEN, fosfatase homóloga e tensina; PDK1, 3-fosfoinositoldependente proteína cinase 1; AKT, V-akt oncogene viral timoma murino homólogo; IKK, proteína cinase de IκB; IκBα, Inibidor alfa de NF-κB; NF-κB, fator nuclear kappa B; FOXO1, proteína *forkhead box O1*; BIM, proteína tipo Bcl-2 11; Bcl-2, do inglês, *B-cell lymphoma 2*; Bax, Proteína X associada a BCL-2; GSK3β, Glicogênio sintase cinase 3β; S6K, proteína ribossômica S6 cinase. Adaptado de: Song *et al.*, 2019.

AKT apresenta três isoformas chamadas de AKT1, 2 e 3, que possuem elevada homologia entre si e são codificadas por genes diferentes, possuindo funções distintas e, por vezes, até mesmo opostas, nos diferentes tipos de câncer. Neste contexto, é importante ressaltar que apesar das diferenças, os respectivos sítios de fosforilação por PDK1 e mTOR são semelhantes: Thr-308 e Ser473, Thr-309 e Ser-474, Thr-305 e Ser-472 para AKT1, AKT2 e AKT3, respectivamente (BELLACOSA *et al.*, 2005; HINZ; JÜCKER, 2019).

O aumento de expressão ou de ativação de AKT já foi relatado em diversos tipos de câncer, como de mama, ovário, pâncreas, pulmão, próstata, entre outros (FRANKE *et al.*, 2003; FRESNO VARA *et al.*, 2004). A ativação de AKT estimula processos chave no câncer, como sobrevivência, proliferação e invasão celular (BELLACOSA *et al.*, 2005), além de estar associada ao desenvolvimento de resistência a radioterapia (LANG *et al.*, 2020) e quimioterapia (GAO *et al.*, 2019; ABEDINI *et al.*, 2010). Neste cenário, a inibição de AKT pode ser considerada um alvo terapêutico importante, e diversas pesquisas sobre o tema vem sendo realizadas (SASAKI *et al.*, 2010; BLAKE *et al.*, 2012; SAURA *et al.*, 2018; FATEMIAN; MOGHIMI; CHOWDHURY, 2019).

O aumento da AKT3 parece estar relacionado a tumores negativos para receptores de estrogênio ou resistentes a andrógenos, conforme demonstrado em pesquisas de câncer de mama e próstata, respectivamente. Sendo assim, a expressão dessa isoforma tem sido associada a fenótipos tumorais de maior agressividade (NAKATANI *et al.*, 1999). De acordo com um estudo realizado pelo projeto *The Cancer Genome Atlas Project* (TCGA), a isoforma AKT3 apresenta aumento substancial de expressão em tumores do tipo *basal like* (KOBOLDT *et al.*, 2012). Ainda, outros autores revelam que esta superexpressão pode estar relacionada à maior promoção de crescimento celular, assim como à redução do tempo de sobrevida livre de doença em casos de câncer de mama triplo-negativo (CHIN *et al.*, 2014; O'HURLEY *et al.*, 2014). Neste contexto, a inibição específica de AKT3 pode ser uma alternativa interessante para o tratamento do TNBC, conforme demonstrado em estudo já realizado por nosso grupo de pesquisa (SOUZA, 2016).

2.3 PD-L1 (LIGANTE DE MORTE CELULAR PROGRAMADA 1)

O ligante de morte celular programada 1, PD-L1 (do inglês, *Programmed Cell Death Ligand 1*), é expresso tanto em células tumorais, quanto imunes, e faz parte da via imunológica de *checkpoint*, sendo responsável por mediar sinais inibitórios em células T que resultam em escape à vigilância imunológica (SANMAMED; CHEN, 2014). A inibição da expressão dessas proteínas produz um aumento da resposta imunológica antitumoral, e é denominada imunoterapia. Apesar de o câncer de mama não ser inicialmente considerado um câncer imunogênico, ou seja, que apresenta possibilidade de destruição pelo próprio sistema imunológico, estudos têm demonstrado a importância e o valor prognóstico dos linfócitos infiltrados em tumores (TIL), principalmente quando relacionado ao TNBC, subtipo conhecido por apresentar maior imunogenicidade do que os outros e estar associado a presença de TILs. Entretanto, a ocorrência desses infiltrados linfocitários no câncer de mama triplo-negativo é

frequentemente acompanhada pela expressão elevada de PD-L1, responsável por reduzir a resposta imunológica no tumor. Dessa forma, a inibição ou bloqueio dessa proteína tem sido considerada uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento dos tumores triplo-negativos, e diversas pesquisas sobre o tema já foram realizadas recentemente envolvendo o uso de anticorpos (LOI *et al.*, 2014; STANTON; DISIS, 2016).

Ensaio clínico utilizando Atezolizumab, um anticorpo monoclonal humanizado que visa inibir PD-L1 no microambiente tumoral e reativar a resposta imune através do impedimento da ligação dessa molécula com o respectivo receptor (PD-1), mostraram resultados promissores. Entre os promissores resultados, foi observado um aumento na sobrevida livre de progressão da doença nos pacientes com TNBC metastático tratados com imunoterapia associada a quimioterapia (SCHMID *et al.*, 2018). A terapia com Atezolizumab em associação com paclitaxel nanoparticulado ligado a albumina humana (nab-paclitaxel) foi aprovada pelo FDA para uso em pacientes com TNBC metastático ou localmente avançado em 2019 (NIH, 2019). Ainda, no final de 2020 foi aprovado também o uso de Pembrolizumab, um anticorpo bloqueador de PD-1, associado a quimioterapia para o tratamento de TNBC localmente recorrente, não cirurgicamente tratável ou metastático (FDA, 2020). Devido ao elevado custo dessas medicações, podendo alcançar até mesmo \$US 8,762.00 por dose (valor atualmente equivalente à aproximadamente R\$46.000,00) (HUANG *et al.*, 2017), o acesso a essas terapias é limitado, e alguns estudos já evidenciam uma relação custo-efetividade desfavorável (PHUA *et al.*, 2020; WU; MA, 2020). Ainda, uma vez que a aplicação terapêutica dos anticorpos monoclonais aqui mencionados vêm sendo relacionada a uma ampla gama de efeitos adversos como prurido, náuseas, diarreia, distúrbios da tireoide, miocardites, pericardites, pneumonias, hepatites e até mesmo óbito (BOUTROS *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; BARAIBAR *et al.*, 2019), novas abordagens terapêuticas são justificáveis. Assim, abordagem de RNAi visando inibir PD-L1 pode vir a ser uma alternativa atraente para o tratamento do câncer de mama triplo-negativo.

2.4 TERAPIA POR RNA DE INTERFERÊNCIA

A busca por novas estratégias para o tratamento do câncer envolve o uso de terapia alvo, que consiste na aplicação de moléculas alvo-específicas que interferem na progressão do câncer, bloqueando o crescimento do tumor e metástases. Essa abordagem terapêutica busca atingir maior eficácia do que as terapias convencionais através de atuação em vias moleculares específicas, objetivando, assim, reduzir a ocorrência de efeitos adversos e toxicidade quando comparado à tratamentos convencionais (ABOU-JAWDE *et al.*, 2003; DE PALMA;

HANAHAN, 2012). Um dos tipos de terapia-alvo refere-se a aplicação de RNA de interferência (RNAi), a qual tem sido foco de diversas pesquisas visando o tratamento do câncer através da inibição da expressão de genes relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer (NISHIMURA *et al.*, 2013; XUE *et al.*, 2016; DE MELLO *et al.*, 2017). Neste contexto, esta estratégia terapêutica é particularmente interessante para o tratamento do TNBC, uma vez que, diferente dos outros subtipos de tumores de mama, não possui alternativa de tratamento específico, como hormonioterapia ou terapia alvo aos receptores de HER-2 (LIEDTKE *et al.*, 2008; PARVANI; JACKSON, 2017).

O uso de RNAi foi descrito pela primeira vez por Andrew Fire e Craig Mello em 1998, quando pesquisas envolvendo o nematódeo *Caenorhabditis elegans* revelaram que a introdução de dupla fita de RNA exógeno possuía capacidade de interferir na expressão gênica via inibição da expressão de determinadas proteínas de modo sequência-específico (FIRE *et al.*, 1998). Essa descoberta, que concedeu para tais pesquisadores o Prêmio Nobel de Medicina de 2006 (THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE, 2006), deu sequência a numerosos estudos sobre o tema. Em 2001, foi publicado um artigo por Elbashir e colaboradores que demonstrou o silenciamento gênico *in vitro* em linhagens celulares de mamíferos utilizando pequenas sequências sintéticas de RNAi contendo 21 nucleotídeos, chamadas *small interfering RNA* (siRNA). Este estudo demonstrou que a utilização de sequências sintéticas de siRNA possibilitariam a modulação da expressão gênica em células de mamíferos, sugerindo o potencial terapêutico desta estratégia molecular (ELBASHIR *et al.*, 2001).

O mecanismo de silenciamento gênico por meio de RNAi normalmente é desencadeado a partir da presença de RNA longo de fita dupla (dsRNA), que é clivado através da enzima Dicer em siRNA, uma estrutura menor com aproximadamente 22 pares de bases (FIRE *et al.*, 1998; BERNSTEIN *et al.*, 2001). As sequências curtas de siRNA apresentam uma fita *sense* e uma *antisense*, as quais são incorporadas ao complexo proteico RISC (Complexo de Indução de Silenciamento de RNA), sofrendo posterior ação catalítica através da nuclease argonauta (AGO2), que cliva a fita *sense*. A fita *antisense* (sequência complementar ao RNA mensageiro alvo - RNAm) permanece associada ao RISC e serve como guia, permitindo a ligação, clivagem e degradação do RNAm complementar, o que resulta no silenciamento gênico específico (LIU *et al.*, 2004; MATRANGA *et al.*, 2005; AMERES; MARTINEZ; SCHROEDER, 2007; KOBAYASHI; TOMARI, 2016) O complexo RISC ativado, ou seja, associado à fita *antisense*, possui uma alta capacidade de *turn-over*, o que permite que continue

a busca e degradação de RNAm através da complementariedade de bases por um certo período (HALEY; ZAMORE, 2004).

O uso de interferência pós-transcricional específica tem atraído interesse de pesquisadores há mais de duas décadas e revolucionou o entendimento de regulação gênica. Nesse sentido, tem sido considerada uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento de múltiplas doenças que apresentam genes superexpressos (HANNON, 2002; HU *et al.*, 2020). Essa modalidade de tratamento torna-se muito atraente devido às vantagens quando comparada a outras formas de terapia, principalmente no que se refere aos chamados alvos *undruggable*, ou seja, inalcançáveis por meio de estratégias terapêuticas comuns (WU *et al.*, 2014; LAZO; SHARLOW, 2016). Além disso, siRNAs apresentam uma boa segurança de uso, visto que atuam de forma pós-transcricional, evitando mutações em nível de DNA, bem como riscos teratogênicos ainda comuns à terapia gênica. A terapia com siRNA é capaz de silenciar genes com elevada especificidade devido ao mecanismo de pareamento Watson-Crick, de forma que, teoricamente, qualquer gene poderia ser silenciado através do conhecimento da sequência do respectivo RNAm, o que resultaria em um menor período de pesquisa e desenvolvimento quando comparado a outras terapias, como fármacos convencionais ou anticorpos monoclonais (XU; WANG, 2015; HU *et al.*, 2020).

Atualmente, dois medicamentos utilizando RNAi são acessíveis para uso no Brasil, ambos já aprovados no ano de 2020 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa); um deles trata-se do ONPATTRO (patisirana sódica), indicado para o tratamento da amiloidose hereditária mediada por transtirretina; o segundo é o fármaco GIVLAARI (givosirana sódica), indicado para o tratamento da porfíria hepática aguda (PHA), que é considerada uma doença rara (HOY, 2018; BRASIL, 2020a, 2020b).

Apesar do potencial terapêutico que a terapia por RNAi apresenta, há algumas barreiras que devem ser superadas para permitir sua aplicação clínica. Moléculas de siRNA apresentam elevado peso molecular, caráter aniônico e hidrofobicidade, o que impede que atravessem a bicamada lipídica que constitui as membranas celulares. Ainda, alguns problemas associados a exposição de siRNAs à circulação sanguínea podem ser citados, incluindo agregação com proteínas plasmáticas e instabilidade frente a nucleases, podendo resultar na degradação destas moléculas (ALEXIS *et al.*, 2008). Outros pontos importantes incluem rápido *clearance* renal e a captura pelo sistema fagocitário mononuclear, o que acarreta em um período de meia-vida plasmática que pode variar de alguns minutos a até uma hora. Neste contexto, é possível compreender que a administração direta da molécula de siRNA não é adequada, e,

portanto, há necessidade de desenvolvimento de alternativas para entrega efetiva e segura de ácidos nucleicos (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; XU; WANG, 2015).

2.5 SISTEMAS DE ENTREGA DE SIRNA

Uma vez que a administração de siRNA livre e sem modificações não é adequada por apresentar adversidades relacionadas ao caráter intrínseco da molécula, como instabilidade plasmática, rápido *clearance* renal e captura pelo sistema fagocitário mononuclear, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de estratégias para entrega segura e eficaz para aplicação clínica de RNAi. Nesse sentido, uma abordagem frequentemente adotada consiste no uso de sistemas de entrega nanoparticulados, que podem ser divididos em dois grandes grupos: virais e não virais (WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; XU; WANG, 2015). Apesar de vetores virais disporem da habilidade natural de entrega de material genético e serem utilizados para transfecção de ácidos nucleicos há mais de 30 anos, a aplicação desses sistemas é limitada devido a problemas de segurança e imunogenicidade, sendo, portanto, as abordagens não virais mais seguras (THOMAS; EHRHARDT; KAY, 2003; BARQUINERO; EIXARCH; PÉREZ-MELGOSA, 2004).

Partículas sintéticas estruturadas na escala nano apresentam maior facilidade de síntese, capacidade de carga superior e são mais seguras do que vetores virais, e, portanto, têm sido alvo de diversas pesquisas. Tais vetores são frequentemente classificados conforme o material de constituição das nanopartículas, podendo ser orgânicos (lipossomas, dendrímeros e micelas poliméricas), inorgânicos (óxido de ferro, ouro, sílica, carbono) ou híbridos, que constituem uma mistura de componentes orgânicos e inorgânicos (YIN *et al.*, 2014; YOUNG; STENZEL; JIA-LIN, 2016).

Todavia, mesmo com uso de nanocarreadores, há diversas barreiras que devem ser superadas para que ocorra a entrega efetiva aos tecidos desejados após administração sistêmica de ácidos nucleicos. Dessa forma, para superar tais barreiras fisiológicas, nanocarreadores devem ser projetados para promover maior estabilidade plasmática e manter a integridade estrutural e funcional, apresentar baixa toxicidade e imunogenicidade, além de resistir ao rápido *clearance* renal e entregar moléculas de siRNA especificamente para células alvo, poupando tecidos saudáveis. Por fim, nanocarreadores devem aumentar captação celular e o escape endossomal, garantindo a liberação rápida e eficaz do siRNA no citoplasma celular, permitindo que ocorra o silenciamento gênico (CHEN *et al.*, 2018; SUBHAN; TORCHILIN, 2019).

2.6 NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS DE CAP-PEG-B-POLI(GLU)-POLIÂNION

Nanocarreadores cerâmicos de fosfato de cálcio (CaP) são sistemas inorgânicos de síntese fácil, baixo custo, e que apresentam excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade, uma vez que o fosfato de cálcio é presente naturalmente no corpo humano e faz parte da constituição de ossos e dentes (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; MAITRA, 2005; ZHANG; KATAOKA, 2009). Estudos utilizando a transfecção de ácidos nucleicos através de precipitados de CaP vem sendo realizados desde a década de 70 (GRAHAM; VAN DER EB, 1973), e essas partículas já demonstraram eficiência na terapia com RNAi tanto *in vitro*, como *in vivo* em trabalhos realizados previamente por nosso grupo de pesquisa, evidenciando um caráter promissor (PITTELLA *et al.*, 2011; SOUZA, 2016; DE MELLO *et al.*, 2018).

A capacidade de adsorção de ácidos nucleicos por precipitados de CaP foi observada pela primeira vez há mais de 40 anos, e forma hoje a base para a síntese de diversos nanocarreadores envolvendo esses compostos (GRAHAM; VAN DER EB, 1973; LI *et al.*, 2010; LEVINGSTONE *et al.*, 2020). Um dos grandes pontos positivos de sistemas baseados em CaP é a sensibilidade ao pH, o que permite o escape endossomal e liberação do material genético no citoplasma através do efeito “esponja protônica”, no qual a dissolução do CaP no interior do endossomo leva a ruptura da membrana endossomal (BISHT *et al.*, 2005; MA, 2014). Entretanto, um problema que impede o uso desses carreadores é a contínua formação e crescimento de cristais de fosfato de cálcio após a síntese, resultando na formação de grandes agregados e consequente redução da eficiência de transfecção. Uma possível solução para esse problema é a adição de um bloco de copolímero polianiónico PEG-*b*-poli(GLU), no qual a porção PEG é responsável por melhorar a estabilidade coloidal e reduzir imunogenicidade das nanopartículas, enquanto a porção poli(Glu) é capaz de aumentar o escape endossomal, uma vez que eleva carga iônica e consequentemente induz um aumento da pressão osmótica e subsequente ruptura da membrana endossomal (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; OWENS; PEPPAS, 2006; PITTELLA *et al.*, 2011). O controle do tamanho de partícula proporcionado pelo uso de copolímeros é essencial, uma vez que partículas menores possuem uma maior eficácia de transfecção (JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996; KAKIZAWA; KATAOKA, 2002), além da capacidade de *targeting* passivo através do chamado efeito de permeabilidade e retenção aumentada (do inglês *enhanced permeability and retention effect*, EPR).

O efeito EPR é um fenômeno causado pelo próprio processo de tumorigênese, no qual a rápida proliferação de células endoteliais, visando promover o crescimento do tumor, resulta

na formação de vasos sanguíneos com arquitetura anormal. A angiogênese acelerada, juntamente com o número reduzido de perícitos, origina uma vasculatura rica em fenestrações de elevado diâmetro, promovendo uma maior permeabilidade a moléculas que podem variar de algumas dezenas, até centenas de nanômetros. Ainda, com o crescimento do tumor, ocorre compressão e colapamento de vasos linfáticos, o que ocasiona no aumento do tempo de retenção de moléculas, resultando em concentrações maiores do que em outros tecidos. Dessa forma, esse efeito pode ser considerado no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de tumores, objetivando acúmulo seletivo de moléculas nos tecidos alvo através da aplicação de estruturas nanométricas (MATSUMURA; MAEDA, 1986; JAIN; STYLIANOPOULOS, 2010; WANG; LANGER; FAROKHZAD, 2012).

Desta forma, este trabalho propõe a utilização de um sistema nanocarreador híbrido, constituído por uma porção orgânica (copolímero) e uma inorgânica (CaP), para a incorporação e entrega de siRNA que possui como alvo os RNAm que codificam os genes AKT3 e PD-L1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Preparo e avaliação de sistema nanocarreador híbrido em diferentes formulações para incorporação de siRNA (siPD-L1 ou siAKT3) e avaliação de viabilidade de aplicação em ensaios *in vitro* utilizando linhagem celular humana de câncer de mama triplo negativo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a expressão de AKT3 e PD-L1 nos diferentes subtipos de câncer de mama através do uso de base de dados;
- b) Preparar e caracterizar nanopartículas híbridas de CaP-PEG-*b*-poli(GLU)
- c) Construir sequências efetivas e específicas de siRNA complementar a PD-L1;
- d) Construir sequências efetivas e específicas de siRNA complementar a AKT3;
- e) Realizar estudos de estabilidade e eficiência de incorporação das nanopartículas;
- f) Selecionar linhagem celular humana de câncer mama triplo-negativo a partir de pesquisa em base de dados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Cloreto de cálcio (CaCl_2) e fosfato de sódio tribásico (Na_3PO_4) foram adquiridos da Nuclear. TRIS (Tris(hidroximetil)aminometano) e cloreto de sódio foram obtidos da Synth (Diadema, SP). HEPES (ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazin etanol sulfônico) foi adquirido da Ludwig Biotec (Alvorada, RS). O polímero PEG-*b*-poli(GLU) foi obtido da Alamanda Polymers, Inc.® (Huntsville, AL, EUA). O *kit* Quanti-iT miRNA assays foi adquirido da Thermo Scientific®. Sequências de siRNA foram adquiridas da SigmaAldrich®.

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AKT3 E PD-L1 ENTRE SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA

Os genes PD-L1 e AKT3 foram selecionados com base em revisão da literatura e avaliação da expressão gênica entre os diferentes subtipos de câncer de mama através de dados extraídos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) mediante uso da plataforma *Xena Functional Genomics Explorer* ([https://https://xena.ucsc.edu/](https://xena.ucsc.edu/)).

Resumidamente, para demonstração da expressão de AKT3 e PD-L1 entre os diferentes subtipos de câncer de mama, a plataforma Xena foi acessada (GOLDMAN *et al.*, 2020), e listas de amostras de casos de câncer de mama foram extraídas e analisadas. Para tanto, o estudo selecionado foi o TCGA, um programa de referência em genômica do câncer que caracterizou molecularmente mais de 20.000 cânceres primários (NIH, 2021). Assim, o termo ‘TCGA *Breast Cancer* (BRCA)’ foi utilizado para seleção de estudos deste projeto objetivando a visualização somente de amostras de câncer de mama (BRCA, *Breast Invasive Carcinoma*). Para separação fenotípica dos tumores em luminal A, luminal B, HER2 positivo, *basal-like* ou *normal-like*, a classificação PAM50, descrita por Koboldt e colaboradores (2012) em um projeto relacionado ao TCGA, foi aplicada através do filtro (‘PAM50_mRNA_nature2012’), e os resultados que não foram enquadrados em nenhum dos subtipos citados (demonstrados pelo sistema como campos nulos), foram excluídos. Por fim, as variáveis genômicas foram incluídas, sendo selecionadas para representar os níveis de expressão dos genes de interesse, ou seja, AKT3 e PD-L1 na unidade $\log_2(\text{norm_count}+1)$.

4.3 SELEÇÃO DE LINHAGENS CELULARES

A linhagem celular MDA-MB-231 foi selecionada através de pesquisas realizadas na base de dados Expression Atlas (<http://www.ebi.ac.uk/gxa>), do Instituto Europeu de

Bioinformática. Resumidamente, os genes de escolha foram pesquisados considerando somente a espécie *Homo sapiens* e a condição biológica *breast cancer* (câncer de mama). Neste trabalho, foram considerados somente os estudos provindos do projeto *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), que estão separados conforme a classificação histológica do câncer de mama em: Adenocarcinoma, adenocarcinoma ductal, carcinoma, carcinoma ductal invasivo e variante acantolítica de carcinoma de células escamosas.

4.4 DESENHO DA SEQUÊNCIA DE SIRNA

As sequências de siRNA foram desenhadas tendo como referência os genes PD-L1 e AKT3 humanos. Dessa forma, as sequências completas dos transcritos primários foram obtidas do site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, e a ferramenta de design *Whitehead siRNA Selection Server* disponível no site <http://sirna.wi.mit.edu/home.php> foi utilizada com finalidade de obter a estrutura dos siRNAs. As estruturas oligonucleotídicas resultantes foram avaliadas em relação a diferentes propriedades estruturais, assim como no que se refere a homologia das sequências obtidas para cada gene, através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Ainda, propriedades termodinâmicas, que podem favorecer a formação de estruturas secundárias, foram avaliadas através da ferramenta Oligoanalyzer[®].

4.5 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CAP-PEG-*b*-POLI(GLU)

As nanopartículas híbridas CaP-PEG-*b*-poli(GLU), contendo siRNA e *mock* (nanopartículas sem adição de siRNA), foram preparadas em capela de fluxo laminar através da técnica de *self-assembly*, na qual ocorre a auto-associação dos componentes através de interações eletrostáticas, conforme descrito por Kakizawa, Furukawa e Kataoka (2004).

Resumidamente, as seguintes soluções foram preparadas: 2,5M de CaCl₂, 10mM de TRIS pH 10 e TRIS-HCl pH 7,4, 50mM de HEPES-fosfato pH 7,4 (contendo 1,5mM de Na₃PO₄ e 140mM de NaCl) e 10mM de HEPES pH 7,4. Após preparo, essas soluções foram esterilizadas através de filtração em membrana PVDF 0,22 μ e separadas em alíquotas para uso posterior. O copolímero PEG-*b*-poli(Glu) (5K-50DP) foi diluído em solução tampão TRIS nas concentrações de 750 e 1000 μg/mL, enquanto o siRNA foi diluído em tampão HEPES 10mM pH 7,4 para concentração de 15 μM.

Para síntese das nanopartículas híbridas, duas soluções foram preparadas, conforme descrito por Souza (2016). A solução 1 consiste de uma mistura de solução de cloreto de cálcio e tampão TRIS pH 10 e siRNA. A solução 2 é obtida através da mistura de PEG-*b*-poli(Glu) e

tampão HEPES-fosfato. Para obtenção final das nanopartículas, a solução 2 é incorporada a solução 1 com auxílio de micropipeta, e misturadas vigorosamente por 30 segundos. Para síntese das nanopartículas *mock* o mesmo procedimento foi aplicado, porém sem adição de siRNA.

Neste trabalho, duas diluições diferentes de polímero PEG-*b*-poli(Glu) foram testadas (750 e 1000 µg/mL) para síntese das nanopartículas, entretanto, o restante do procedimento de preparo não foi alterado.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS

Para caracterização das nanopartículas híbridas foi determinado o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl) através de medidas de espalhamento dinâmico de luz, DLS (*Dynamic Light Scattering*) no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) em cubeta de quartzo (ZEN2112), a 25°C, ângulo de detecção de 173° com um laser HeNe (633 nm).

4.7 ESTABILIDADE DO SISTEMA

A estabilidade coloidal das nanopartículas híbridas contendo diferentes concentrações de polímero foi avaliada em temperatura ambiente e de geladeira (4°C) através de medidas de DLS no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), conforme descrito no item 4.6 nos dias 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 e 65 após o preparo.

4.8 ESTUDO DE EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE SIRNA

Para conhecimento da eficiência de incorporação de siRNA, nanopartículas híbridas foram preparadas conforme descrito no item 4.5 e submetidas à centrifugação no equipamento Thermo Scientific Sorvall ST 16R durante 4 h, 25.800 × g e temperatura controlada a 4°C para evitar degradação de ácidos nucleicos. Após esse período, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e verificado para determinar a ausência de nanopartículas no meio através do equipamento Zetasizer Nano ZS através de medidas de DLS.

O *kit* Quanti-iT miRNA assays (Thermo Scientific®), utilizado para detecção de pequenos RNAs, foi aplicado para determinação da quantidade de material genético não incorporado na nanopartícula conforme instruções do fabricante. Sucintamente, a solução de trabalho foi preparada seguindo a proporção 1:200 v/v de reagente:tampão, e uma curva de calibração foi estabelecida com padrões nas concentrações de 0; 0,25; 0,5; 1,5; 3,0 e 4,0 µM. Assim, para leitura da fluorescência em placa, foi adicionado 100 µL da solução de trabalho em

cada poço, seguido da adição de 5 µL dos padrões ou amostras dos sobrenadantes previamente coletadas. A fluorescência foi analisada em Multileitora Infinite M200 TECAN do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMEB/UFSC), com comprimentos de onda de excitação/emissão máximas em 500/525 nm. Com base nos resultados obtidos das medidas de curva de calibração, foi possível obter a equação da reta e quantificar a presença de siRNAs nas amostras, com posterior obtenção da eficiência de incorporação da nanopartícula através do seguinte cálculo:

$$E.I. \% = 100 - \left(\frac{\text{concentração obtida no sobrenadante}}{\text{concentração teórica inicial}} \right) \times 100$$

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram expressos como a média ± desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando GraphPad Prism 8 e análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DOS GENES ALVO

Os genes AKT3 e PD-L1 foram selecionados com base em revisão da literatura e análise na base de dados Xena Browser, descrita posteriormente. Neste contexto, foi considerado não somente a importância da ativação de determinadas vias bioquímicas no câncer de mama triplo-negativo, como também o sinergismo entre os alvos.

PI3K/AKT é uma das vias intracelulares mais comumente desreguladas no câncer e, portanto, um dos mecanismos mais comuns de oncogênese (LAWRENCE *et al.*, 2014; JANKU; YAP; MERIC-BERNSTAM, 2018). Essa via está diretamente associada a regulação de diversos processos chave, como crescimento, motilidade, sobrevivência e metabolismo celular (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006). No câncer de mama, o aumento da expressão de AKT3 parece estar relacionado aos tumores que não expressam receptores de estrogênio ou HER2, fenótipos que, em geral, são caracterizados por apresentar maior agressividade (NAKATANI *et al.*, 1999; KOBOLDT *et al.*, 2012). Neste contexto, alguns estudos visando a inibição de AKT3 já foram realizados. Segundo Chin e colaboradores (2014), a inibição específica de AKT3 através do uso de *short hairpin* RNA (shRNA) foi capaz de inibir crescimento celular, tanto *in vitro*, quanto em xenotransplantes de TNBC *in vivo*. Ainda, em estudo publicado por Souza (2016), o silenciamento de AKT3 através da aplicação de siRNA promoveu a redução na viabilidade celular em linhagem MDA-MB-231, proveniente de câncer de mama triplo-negativo.

Adicionalmente, a via imunológica do *checkpoint* tem atraído cada vez mais interesse em relação ao tratamento de diferentes tipos de câncer, e diversos tratamentos biológicos aprovados recentemente utilizam essa estratégia, como pembrolizumabe, nivolumabe (inibidores de PD-1), atezolizumabe, avelumabe, durvalumabe (inibidores de PD-L1) e ipilimumabe (inibidor de Proteína T-Linfócito-Associada citotóxica 4 - CTLA-4). Todavia, o uso de anticorpos monoclonais está associado a ocorrência de uma ampla gama de efeitos adversos que podem variar desde complicações leves como prurido, náuseas, diarreia e distúrbios da tireoide, até efeitos mais graves, como miocardites, pericardites, pneumonias, hepatites, entre outros, podendo levar ao óbito (BOUTROS *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; BARAIBAR *et al.*, 2019). Desta forma, considerando a expressão elevada de PD-L1 no câncer de mama triplo-negativo, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais seguras, com o menor número de efeitos adversos possível, torna-se necessário.

Neste contexto, Lotfinejad e colaboradores (2021) demonstrou que o silenciamento de PD-L1 através da aplicação de siRNA foi capaz de diminuir a proliferação, induzir a apoptose e a reduzir migração celular em linhagem de câncer de mama triplo-negativo. Ainda, o mesmo estudo revelou que a inibição desse ligante foi capaz de induzir a função citotóxica de células T através do aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IFN- γ e TNF- α , e redução de expressão da citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β em co-cultura de linhagem celular de TNBC, MDA-MB-231 e linfócitos T.

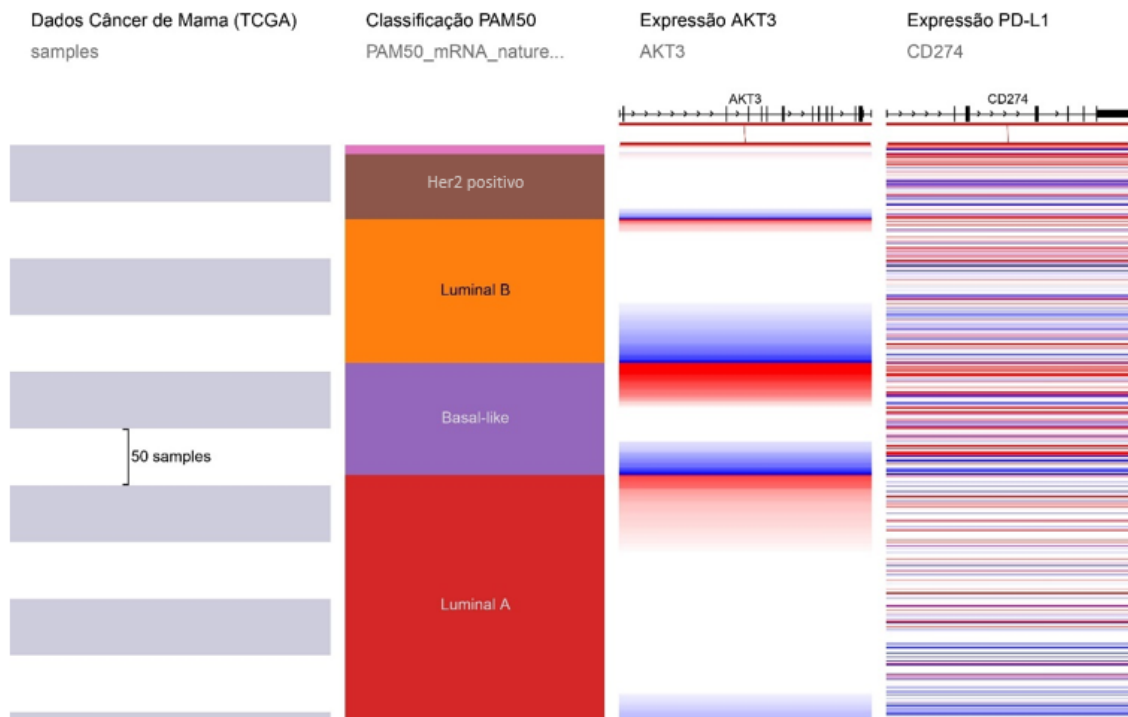
Neste cenário, considerando a diversidade e complexidade das vias de sinalização reguladas pela quinase AKT e a importância da ativação do sistema imune no microambiente tumoral, a inibição concomitante das proteínas AKT3 e PD-L1 pode ser uma alternativa interessante para atingir tumores do tipo TNBC (WYSOCKI; MACKIEWICZ-WYSOCKA; MACKIEWICZ, 2002; HANADA; FENG; HEMMINGS, 2004). De acordo com Liu *et al* (2017), os níveis de expressão de PD-L1 estão diretamente relacionados com a ativação de AKT, e o aumento da expressão dessas duas proteínas no microambiente tumoral parece estar ligada ao desenvolvimento de resistência a quimioterápicos, como a doxorrubicina, através do aumento de expressão de glicoproteína P (P-gp). Considerando que a quimioterapia consiste na principal alternativa terapêutica disponível para o tratamento dos tumores da mama do tipo triplo-negativo, o desenvolvimento de resistência implica em uma parte crucial na ocorrência de metástase, recidivas e progressão da doença (KHAN *et al.*, 2019).

Segundo Mittendorf *et al* (2014), a aplicação de MK-2206, um inibidor não seletivo de AKT, leva a diminuição da expressão de PD-L1, demonstrando a regulação dessa proteína através da via PI3K/AKT. Ainda, AKT3 já foi validada como um regulador a montante do ligante de morte celular programada, e a deleção desta cinase em células de câncer de ovário diminuiu a expressão de PD-L1 *in vitro* (DUAN *et al.*, 2020). Assim, é possível concluir que agentes terapêuticos que atuam na via PI3K/AKT são capazes de modular as respostas imunes adaptativas antitumorais. Considerando ainda que a ativação de PD-L1 pode, também, resultar em estímulo de AKT (ALMOZYAN *et al.*, 2017), a inibição de ambas as proteínas possui potencial de promover efeitos farmacológicos potencializados quando em comparação com a monoterapia.

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AKT3 E PD-L1 ENTRE SUBTIPOS DE CÂNCER DE MAMA

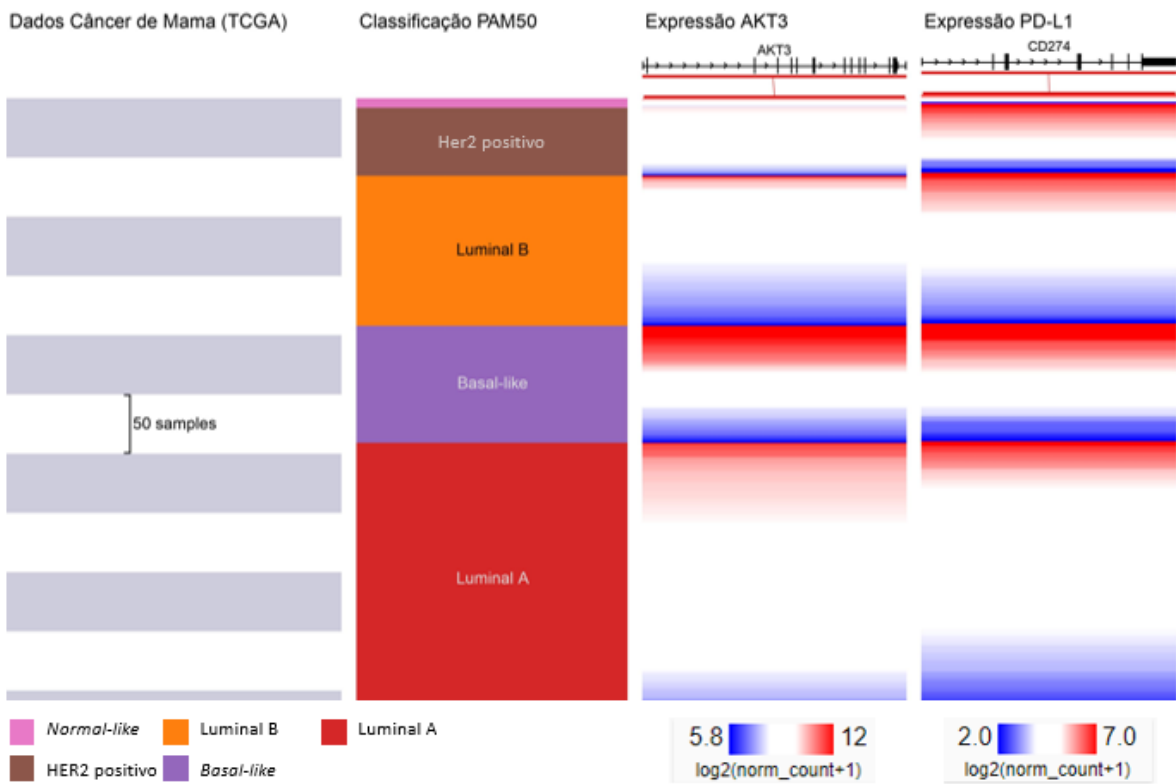
A partir da utilização de *Xena Browser* para triagem específica de dados do TCGA abrangendo o câncer de mama e aplicação do PAM50 para classificação molecular dos tumores, foi possível avaliar a expressão de AKT3 e PD-L1 entre os diferentes subtipos de cânceres mamários. Inicialmente, o sistema retornou 1247 amostras, que foram triadas para 522 resultados a partir da exclusão de campos nulos, sendo obtida a tela demonstrada na figura 2. Organizando os resultados obtidos, é possível visualizar a expressão de ambos os genes em diferentes tumores de mama através da escala de cor, que representa expressão gênica na unidade $\log_2(norm_count+1)$ (Figura 3), na qual *norm_count* refere-se à estimativa de expressão de RNA, obtida através da aplicação de contagem normalizada de expectativa-maximização (do inglês, *RNA-Seq expression estimation by expectation-maximization*, RSEM), aliada a técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq).

Figura 2 - Resultado de pesquisa Xena Browser



Tela obtida em resultado de pesquisa Xena Browser. Fonte: Xena Browser, acesso em 16 de agosto de 2021.

Figura 3 - Expressão de AKT3 e PD-L1 entre subtipos de câncer de mama através de escala de cor



Fonte: Xena Browser, acesso em 16 de agosto de 2021.

Com base nos resultados obtidos, *Xena Browser* gerou os gráficos demonstrados nas figuras 4 e 5, demonstrando que ambos os genes selecionados possuem expressão elevada no subtipo *basal-like*, e, portanto, são adequados para a aplicação de terapia através de silenciamento gênico. Ainda, as tabelas 1 e 2 demonstram os valores das cinco estatísticas observadas em diagramas de caixa: valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e valor máximo. Considerando que o retângulo formado pelo intervalo entre Q1 e Q3 representa 50% do conjunto dos valores de dados, e que os maiores valores máximos de expressão gênica foram observados para o fenótipo *basal-like*, é possível concluir, com base em dados da literatura e levando em consideração a heterogeneidade genômica apresentada por este subtipo, que a expressão de ambos os genes pode estar aumentada em tumores negativos para receptores de ER, PR e HER2. Em uma análise realizada por Koboldt e colaboradores (2012), foi relatado aumento de AKT3 em aproximadamente 28% dos tumores *basal-like*. Ainda, a expressão de PD-L1 foi relatada em aproximadamente 20% dos tumores triplo-negativos em uma análise realizada por Mittendorf e colaboradores (2014).

Figura 4 - Expressão de AKT3 entre diferentes subtipos de câncer de mama

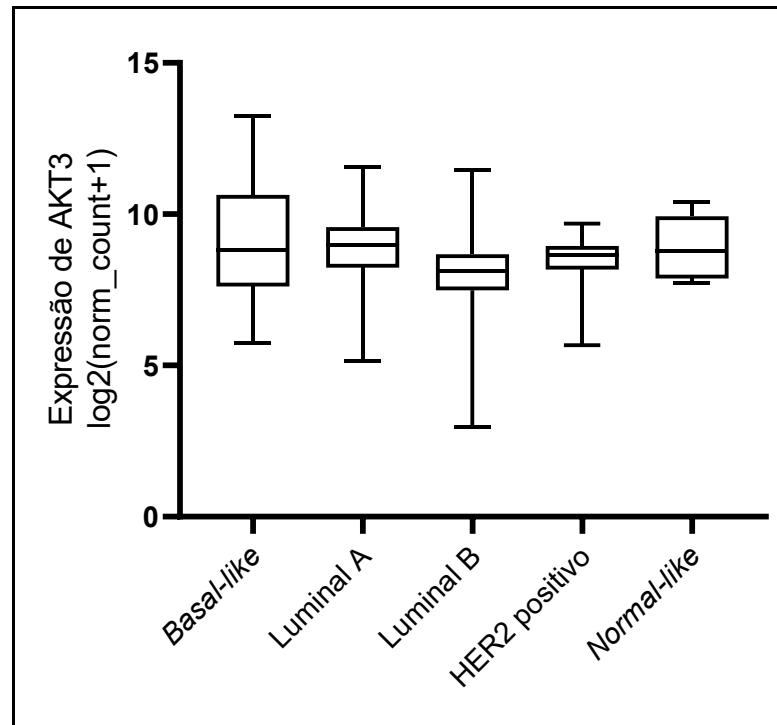


Diagrama de caixa representando expressão de AKT3 entre os subtipos de câncer de mama considerando as cinco estatísticas apresentadas neste modelo de gráfico: valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e valor máximo. Adaptado de: Xena Browser, acesso em 16 de agosto de 2021.

Figura 5 - Expressão de PD-L1 entre diferentes subtipos de câncer de mama

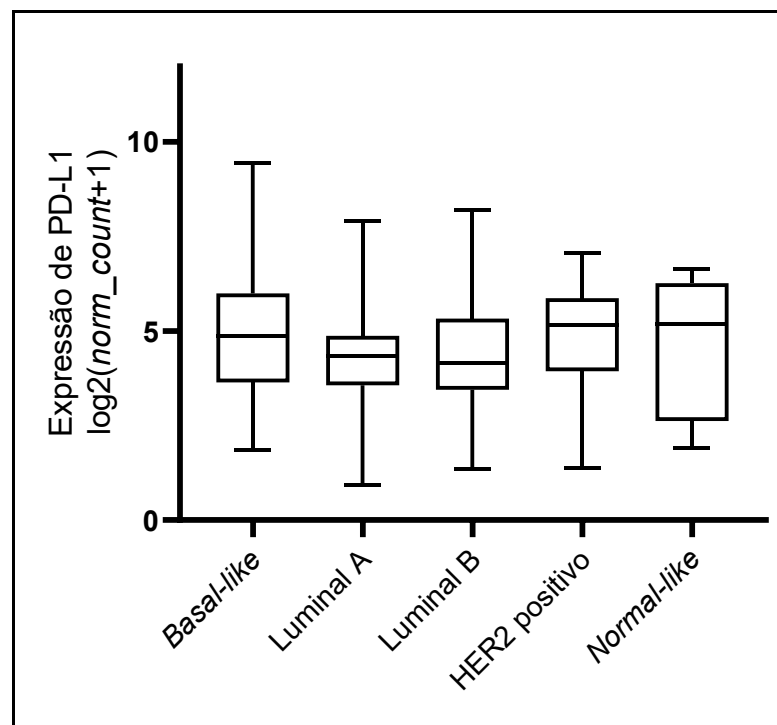


Diagrama de caixa representando expressão de PD-L1 entre os subtipos de câncer de mama considerando as cinco estatísticas apresentadas neste modelo de gráfico: valor mínimo, primeiro quartil (Q1), mediana, terceiro quartil (Q3) e valor máximo. Adaptado de: Xena Browser, acesso em 16 de agosto de 2021.

Tabela 1 - Expressão de AKT3 entre subtipos de câncer de mama

Níveis de Expressão AKT3 $\log_2(\text{norm_count}+1)$					
	Luminal A	Luminal B	HER2 positivo	<i>Basal-like</i>	<i>Normal-like</i>
Mínimo	6,29	5,83	7,08	5,74	7,72
Q1	8,23	7,49	8,19	7,62	8,04
Mediana	8,97	8,11	8,67	8,84	9,38
Q3	9,57	8,68	8,94	10,6	9,97
Máximo	11,6	10,3	9,69	13,2	10,4
n	231	127	58	98	8

Diferenças de expressão do gene AKT3 entre os subtipos de câncer de mama. Q1: primeiro quartil; Q2: segundo quartil; n: número amostral. Adaptado de: Xena Browser, acesso em 16 de agosto de 2021.

Tabela 2 - Expressão de PD-L1 entre subtipos de câncer de mama

Níveis de Expressão PD-L1 $\log_2(\text{norm_count}+1)$					
	Luminal A	Luminal B	HER2 positivo	<i>Basal-like</i>	<i>Normal-like</i>
Mínimo	1,74	1,35	1,38	1,85	1,90
Q1	3,57	3,45	3,95	3,64	3,79
Mediana	4,34	4,15	5,18	4,89	5,41
Q3	4,88	5,33	5,87	5,99	6,38
Máximo	6,69	7,31	7,07	9,45	6,63
n	231	127	58	98	8

Diferenças de expressão do gene PD-L1 entre os subtipos de câncer de mama. Q1: primeiro quartil; Q2: segundo quartil. Adaptado de: Xena Browser, acesso em 16 de agosto de 2021.

Considerando que o subtipo triplo-negativo é classificado como *basal-like* em aproximadamente 50-75% dos casos (PEROU, 2010), é possível supor que expressões semelhantes de AKT3 e PD-L1 seriam observadas para TNBC, e que os genes selecionados tratam-se de bons alvos para o tratamento de tumores triplo-negativos.

5.3 SELEÇÃO DE LINHAGEM CELULAR

A seleção de linhagem celular foi elaborada a partir de pesquisas realizadas no banco de dados Expression Atlas (<http://www.ebi.ac.uk/gxa>), do Instituto Europeu de Bioinformática.

Para seleção, foi considerada a expressão dos genes de escolha, assim como fenótipo desejado, no caso, triplo-negativo, e estabelecimento da linhagem na literatura.

Neste trabalho, foram considerados somente os estudos originados do projeto *Cancer Cell Line Encyclopedia* (CCLE), que estão divididos conforme a classificação histológica do câncer de mama em: Adenocarcinoma, adenocarcinoma ductal, carcinoma, carcinoma ductal invasivo e variante acantolítica de carcinoma de células escamosas. Entretanto, uma vez que o foco desta pesquisa é voltado para a classificação molecular tumoral, os dados de expressão de AKT3 e PD-L1 nas diferentes linhagens celulares foram compilados na tabela 3.

Tabela 3 - Expressão de AKT3 e PD-L1 entre linhagens celulares de câncer de mama

Linhagem Celular	Expressão Gênica (TPM)		Linhagem Celular	Expressão Gênica (TPM)	
	AKT3	PD-L1		AKT3	PD-L1
AU565	0,1	3,0	CAL-120	106,0	126,0
CAL-148	0,1	0,1	CAL-85-1	7,0	72,0
CAMA-1	0,1	0,3	HCC1428	0,2	2,0
MDA-MB-231	20,0	36,0	MDA-MB-415	0,2	1,0
MDA-MB-453	0,1	0,1	MDA-MB-468	17,0	2,0
SK-BR-3	0,1	2,0	EFM-19	0,4	-
HCC1143	38,0	1,0	HCC1187	0,3	0,4
HCC1395	10,0	1,0	HCC1419	0,2	0,2
HCC1500	0,3	0,8	HCC1569	52,0	0,4
HCC1599	61,0	0,1	HCC1937	16,0	5,0
HCC1954	0,5	19,0	HCC202	0,1	0,4
HCC2157	4,0	0,2	HCC2218	0,1	0,1
HCC38	0,5	8,0	HCC70	0,1	19,0
CAL-51	1,0	0,3	DU4475	71,0	2,0
EFM-192A	0,2	0,3	HDQ-P1	15,0	4,0
HMC-1-8	27,0	0,7	Hs 281.T	39,0	23,0
Hs 343.T	39,0	6,0	Hs 606.T	35,0	4,0
Hs 739.T	49,0	11,0	Hs 742.T	27,0	25,0
JIMT-1	27,0	25,0	MDA-MB-157	53,0	0,5
BT-20	21,0	8,0	BT-474	0,5	0,1
BT-483	0,4	1,0	BT-549	26,0	6,0
Hs 578T	74,0	10,0	KPL-1	0,2	0,1
MCF-7	0,1	0,2	MDA-MB-175-VII	1,0	0,1
MDA-MB-436	30,0	3,0	T-47D	0,1	0,2
UACC-812	6,0	0,4	UACC-893	0,1	0,7
ZR-75-1	15,0	0,1	ZR-75-30	0,2	0,1
HCC1806	3,0	1,0	MDA-MB-361	10,0	11,0

Diferenças de expressão de AKT3 e PD-L1 entre as distintas linhagens celulares de câncer de mama demonstradas por unidades de TPM. Dados extraídos de: Papatheodorou *et al.* (2020)

Considerando os maiores níveis de expressão de ambos os genes, as linhagens CAL-120, MDA-MB-231, Hs 281.T, Hs 742.T e JIMT-1 foram selecionadas para análise. Entretanto, a linhagem Hs 742.T foi excluída por apresentar classificação molecular luminal A. JIMT-1 e Hs 281.T apresentam amplificação de HER2, e por isso também foram descartadas (TANNER *et al.*, 2004; JIANG *et al.*, 2016). Por último, quando comparadas às informações descritas na literatura de CAL-120 e MDA-MB-231 que apresentaram fenótipo triplo-negativo (JIANG *et al.*, 2016), foi possível concluir que a última se trata de uma linhagem muito bem estabelecida, que é amplamente utilizada em pesquisas sobre o câncer de mama, sendo assim selecionada para estudos posteriores. Derivada de derrame pleural de paciente do sexo feminino com adenocarcinoma mamário metastático, MDA-MB-231 apresenta características como fenótipo invasivo e elevado potencial metastático, que favorecem sua utilização para pesquisas *in vitro* (LIU *et al.*, 2019; MINN *et al.*, 2005).

5.4 DESENHO DAS SEQUÊNCIAS DE SIRNA

Para obtenção do transcrito primário dos genes AKT3 e PD-L1, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> foi acessado. Os íntrons foram descartados, e os éxons em comum entre todas as variantes de transcrição dos genes de interesse foram selecionados, com objetivo de atingir a melhor inibição de RNAm possível. Uma vez que nem todos os siRNAs que apresentam complementariedade aos RNAm respectivos são eficazes, é necessário considerar uma série de requisitos aliados a bioinformática visando aumentar a probabilidade de obtenção de uma sequência oligonucleotídica eficaz e específica (REYNOLDS *et al.*, 2004; BIRMINGHAM *et al.*, 2007; FAKHR; ZARE; TEIMOORI-TOOLABI, 2016). Dessa forma, as sequências desenhadas através da ferramenta *Whitehead siRNA Selection Server* foram avaliadas em relação a diversos critérios, como os apresentados no quadro 2.

Quadro 2 - Critérios avaliados para design de siRNA

continua		
Propriedade	Função	Referência
Blast das sequências senso e antisenso	Aumentar especificidade. Avaliar homologia da sequência de siRNA com o gene alvo; evitar sequências com homologia $\geq 78\%$ com demais genes.	(KIM, 2010)
Não estar localizado em centro de SNP	Evitar diferenças no silenciamento gênico em diferentes linhagens celulares que apresentem SNPs distintos.	(BIRMINGHAM <i>et al.</i> , 2007)

Teor de guanina e citosina entre 30-52%	Estabilizar dupla fita de siRNA e melhorar ligação ao complexo RISC.	(BIRMINGHAM <i>et al.</i> , 2007)
---	--	-----------------------------------

continuação

Pareamento assimétrico	Aumentar eficiência da sequência de siRNA, permitindo que RISC reconheça a fita-guia.	(SCHWARZ <i>et al.</i> , 2003)
Presença de vale energético entre o 9º e 14º nucleotídeo	Aumentar a funcionalidade do complexo RISC; induz a conformação mais desejável durante a clivagem do mRNA.	(KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2003)
Não formar <i>hairpins</i> ou estruturas internas	A formação dessas estruturas reduz a concentração efetiva e potencial de silenciamento do siRNA.	(REYNOLDS <i>et al.</i> , 2004)
Presença de adenina/uracila na porção 5' da fita antisense	Fornecer desenrolar adequado do duplex de siRNA e entrada no complexo RISC.	(FAKHR; ZARE; TEIMOORI-TOOLABI, 2016)
Presença de adenina e uracila na terceira e décima base da fita senso, respectivamente.	Aumenta funcionalidade do siRNA desenhado	(REYNOLDS <i>et al.</i> , 2004)
Ausência de guanina/citosina na 13ª posição da fita senso	Aumenta funcionalidade do siRNA desenhado	(REYNOLDS <i>et al.</i> , 2004)
Ausência de guanina na 19ª posição da fita senso	Aumenta funcionalidade do siRNA desenhado	(REYNOLDS <i>et al.</i> , 2004)

Propriedades avaliadas no design de siRNAs. SNP: do inglês, Single-nucleotide polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único); RISC: Complexo de Indução de Silenciamento de RNA. Fonte: Próprio autor (2021).

Baseando-se nas propriedades citadas, as sequências de siRNA complementares ao RNAm de AKT3 e PD-L1 foram desenhadas (quadro 3).

Quadro 3 - Sequências de siRNA desenhadas

Gene	Sequência Senso (5'–3')	Sequência Antisense (5'–3')
AKT3	CAAACCCUAAAGCUGAUUAUdCdA	AUAUCAGCUUUAGGGUUUGdGdA
PD-L1	GGAGAUUAGAUCUGAGGAdTdT	UCCUCAGGAUCUAAUCUCCdTdT

Sequências de siRNA desenhadas para serem incorporadas aos nanocarreadores híbridos.

Fonte: Próprio autor (2021).

5.5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS CAP-PEG-*b*-POLI(GLU)

A capacidade de transfecção de ácidos nucleicos através de cristais de CaP é uma propriedade bem estabelecida e aplicada desde a década de 70 (GRAHAM; VAN DER EB, 1973), todavia, a co-precipitação de íons cálcio e fosfato é um método sujeito à rápida agregação entre estes cristais, resultando em partículas de tamanho heterogêneo com eficácia de

transfecção variável. Neste contexto, a aplicação de revestimento de bloco de copolímero PEG-poliânion é capaz de aumentar a estabilidade dos cristais de CaP, mantendo-os em escala nanométrica (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996). Assim, diversos trabalhos têm baseado-se nessa abordagem para sintetizar nanopartículas de CaP revestidas com polímeros através da técnica de *self-assembly* (KAKIZAWA; KATAOKA, 2002; KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004; PITTELLA *et al.*, 2011; SOUZA, 2016). Neste trabalho, essa técnica foi abordada a partir da simples mistura estequiométrica de soluções aquosas de CaCl₂ em tris pH 10 na presença de siRNA e PEG-*b*-poli(Glu) em tampão HEPES-fosfato, que permite a auto-associação dos componentes através de interações eletrostáticas, dando origem a um sistema nanocarreador de tamanho controlado e eficaz para transfecção de ácidos nucleicos (SOUZA, 2016; HABERBECK, 2019). Ainda, além de melhorar a estabilidade coloidal da formulação de nanopartículas, o copolímero PEG-poliânion também é capaz de fornecer estabilidade biológica, reduzindo a imunogenicidade e aumentando o tempo de meia vida dos carreadores (GREF *et al.*, 2000; OWENS; PEPPAS, 2006).

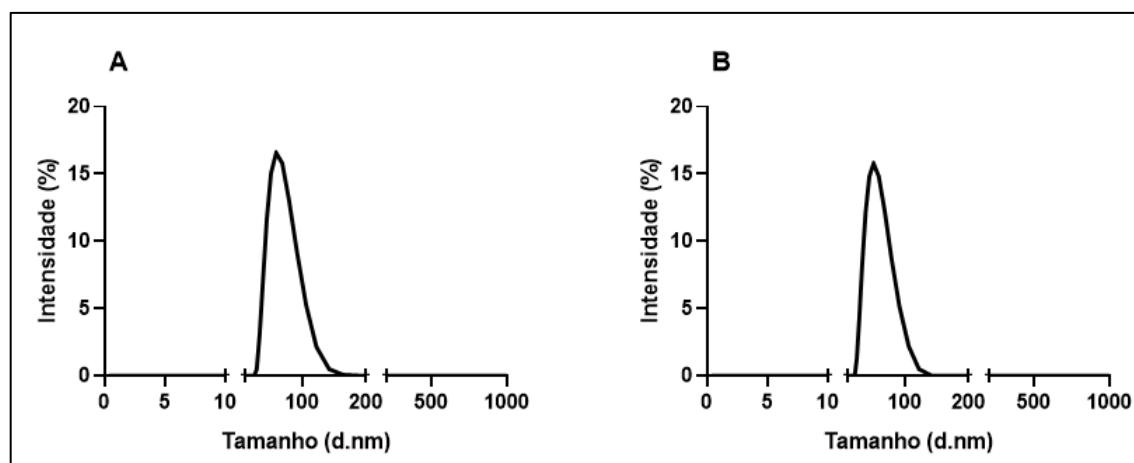
As nanopartículas híbridas de CaP são constituídas através da associação de componentes orgânicos e inorgânicos. Cálcio e fosfato são os componentes que constituem a porção inorgânica, enquanto o bloco de copolímero e siRNA constituem a porção orgânica do sistema. Duas concentrações distintas de copolímero foram utilizadas durante o preparo das nanopartículas, com objetivo de caracterização e comparação das diferentes formulações. O primeiro sistema, sintetizado com solução de PEG-*b*-poli(Glu) a 1000 µg/mL, apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de $58,3 \pm 1,7$ d.nm e PdI de $0,09 \pm 0,01$ através da técnica de DLS realizada em equipamento zetasizer (Tabela 4 e Figura 6A). Já o segundo sistema, preparado com solução de PEG-*b*-poli(Glu) diluída a 750 µg/mL, exibiu tamanho de $48,6 \pm 0,07$ d.nm e PdI de $0,11 \pm 0,01$ (Tabela 4 e Figura 6B).

Tabela 4 - Caracterização das nanopartículas híbridas

Formulação	Tamanho¹ (d.nm)	PdI¹
Nanopartícula híbrida 1 (bloco de copolímero 1000 µg/mL)	$58,3 \pm 1,7$	$0,09 \pm 0,01$
Nanopartícula híbrida 2 (bloco de copolímero 750 µg/mL)	$48,6 \pm 0,07$	$0,11 \pm 0,01$

⁽¹⁾n=3; Nanopartícula 1: Sintetizada com copolímero PEG-*b*-poli(Glu) diluído a 1000 µg/mL; Nanopartícula 2: Sintetizada com copolímero PEG-*b*-poli(Glu) diluído a 750 µg/mL. Todas as medidas foram realizadas a partir da técnica de *Dynamic Light Scattering*; PDI, índice de polidispersão. Fonte: Próprio autor (2021).

Figura 6 - Caracterização das nanopartículas



(A) Distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas sintetizadas com PEG-*b*-poli(Glu) a 1000 µg/mL; (B) Distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas sintetizadas com PEG-*b*-poli(Glu) a 750 µg/mL. Resultados obtidos a partir da técnica de *Dynamic Light Scattering*. PDI, índice de polidispersão.

Fonte: Próprio autor (2021).

Os resultados referentes ao diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas são compatíveis com aqueles obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa, em que partículas preparadas com a concentração de copolímero de 1000 µg/mL apresentaram tamanho em torno de 53 nm (SOUZA, 2016). Dessa forma, as duas concentrações de polímeros testadas foram adequadas para assegurar a obtenção de nanopartículas em escala nanométrica. Adicionalmente, segundo Kakizawa, Furukawa e Kataoka (2004), o tamanho de partícula é diretamente correlacionado às concentrações aplicadas de fosfato e bloco de copolímero, sendo que, para cada concentração utilizada de fosfato, uma concentração mínima de copolímero é requerida para o controle de tamanho de partícula. Outro estudo realizado por Kakizawa e Kataoka (2002) propôs ainda que o efeito do copolímero poli(etilenoglicol)-*bloco*-poli(ácido aspártico) (PEG-PAA) na regulação de tamanho de partículas de CaP é coordenado por dois fatores conflitantes. Em uma primeira etapa, ocorre diminuição do tamanho de partícula conforme há aumento na concentração de copolímero nas formulações, demonstrando sua capacidade em controlar o crescimento e formação contínua de cristais. Entretanto, em dado momento, a adição de copolímero passa a aumentar novamente o diâmetro das nanopartículas, provavelmente devido ao aumento na concentração da porção PAA, que possui carga negativa.

Desta forma a diferença observada para o tamanho de partícula pode ser explicada pelo aumento das concentrações de poli(Glu), no sistema preparado com copolímero 1000 µg/mL quando comparado ao segundo sistema que possuía menor concentração de copolímero na formulação.

Ainda, as formulações preparadas apresentaram dispersão homogênea, visto que os valores de índice de polidispersão (PDI) foram inferiores a 0,2. O PDI de uma amostra reflete a distribuição de tamanho das populações em uma dada dispersão, cujos valores podem variar de 0.0 até 1.0, sendo o último sugestivo de amostra altamente polidispersa, ou seja, com múltiplos tamanhos de partícula. Normalmente, valores inferiores a 0.2 são considerados adequados e refletem a homogeneidade das nanopartículas em uma suspensão (DANAEI *et al.*, 2018).

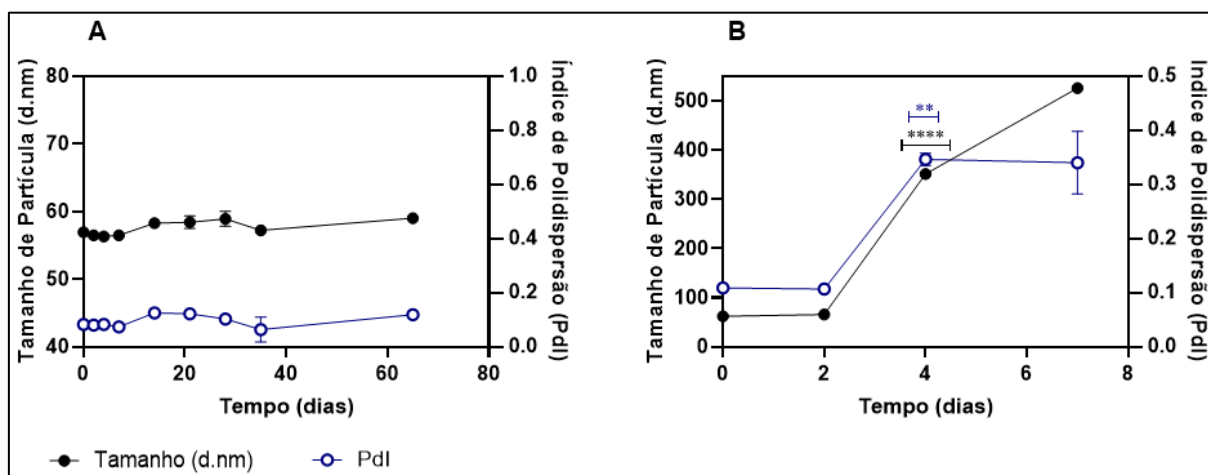
5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO SISTEMA

A estabilidade coloidal de sistemas em escala nanométrica é uma característica essencial, uma vez que determina as propriedades como biodistribuição, farmacocinética e toxicidade *in vivo* (BORM *et al.*, 2006; NEL *et al.*, 2006). Resumidamente, a estabilidade de nanopartículas depende das respectivas propriedades de dispersão ou agregação. Caso forças de repulsão sejam predominantes no sistema, este permanecerá disperso, ou seja, estável. Por outro lado, caso forças atrativas sejam predominantes, ocorrerá a agregação das partículas, implicando em perda de estabilidade, podendo afetar a reprodutibilidade experimental, além de ocasionar efeitos tóxicos severos, uma vez que se tratam de materiais para aplicação medicinal. Uma segunda forma de fornecer a estabilidade necessária para a manutenção do sistema nanocoloidal é através do impedimento estérico. Esta estratégia utiliza o revestimento de nanopartículas com polímeros ou biopolímeros, previne que forças atrativas sejam formadas, evitando a perda da estabilidade (NAPPER, 1977; FRITZ *et al.*, 2002; HOTZE; PHENRAT; LOWRY, 2010; MOORE *et al.*, 2015).

Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o sistema nanoparticulado utilizando polímero PEG-*b*-poli(Glu) diluído a 1000 µg/mL havia apresentado estabilidade de 28 dias em temperatura controlada de 4°C (SOUZA, 2016). Neste trabalho, um período mais longo foi avaliado, demonstrando a estabilidade das nanopartículas por 65 dias, a 4°C. O tamanho de partícula e PDI (Figura 7A) foram monitorados, e mudanças no aspecto macroscópico durante o intervalo em questão não foram observadas. Conforme descrito por Souza (2016), esses resultados indicam a funcionalidade do bloco de copolímero PEG-poliânion não somente como agente regulador de tamanho de partícula, como também demonstra a capacidade em fornecer estabilidade coloidal ao sistema.

Em temperatura ambiente as nanopartículas híbridas demonstraram estabilidade não satisfatória de apenas dois dias (Figura 7B), corroborando os dados já relatados anteriormente (SOUZA, 2016).

Figura 7 - Avaliação de estabilidade das nanopartículas híbridas preparadas utilizando PEG-Glu diluído a 1000 $\mu\text{g/mL}$

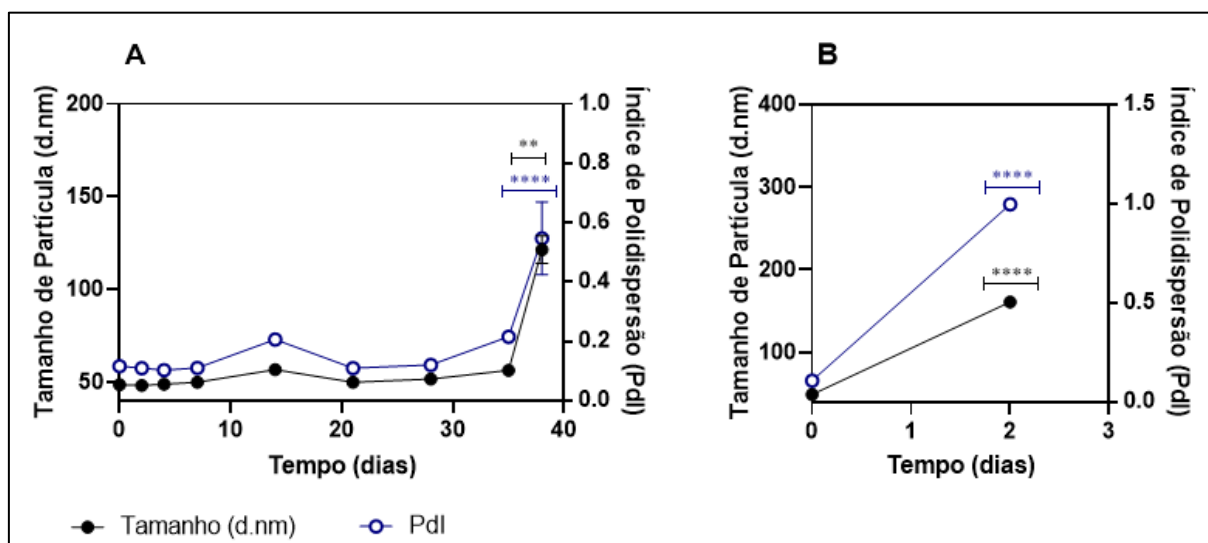


Medidas de DLS. (A) Estabilidade do sistema em temperatura controlada de 4°C. (B) Estabilidade do sistema em temperatura ambiente; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; Estatística: ANOVA seguida do pós teste de Bonferroni.

Fonte: Próprio autor (2021).

As nanopartículas híbridas preparadas utilizando polímero diluído a 750 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram estabilidade de 35 dias em temperatura controlada de geladeira (Figura 8A), evidenciando menor estabilidade quando comparadas ao sistema anterior. Em relação a temperatura ambiente, mostraram-se instáveis (Figura 8B).

Figura 8 - Avaliação de estabilidade das nanopartículas híbridas preparadas utilizando PEG-Glu diluído a 750 µg/mL



Medidas de DLS. (A) Estabilidade do sistema a temperatura controlada de 4°C. (B) Estabilidade do sistema a temperatura ambiente; **p < 0.01 ****p < 0,0001; Estatística: ANOVA seguida do pós teste de Bonferroni. Fonte: Próprio autor (2021).

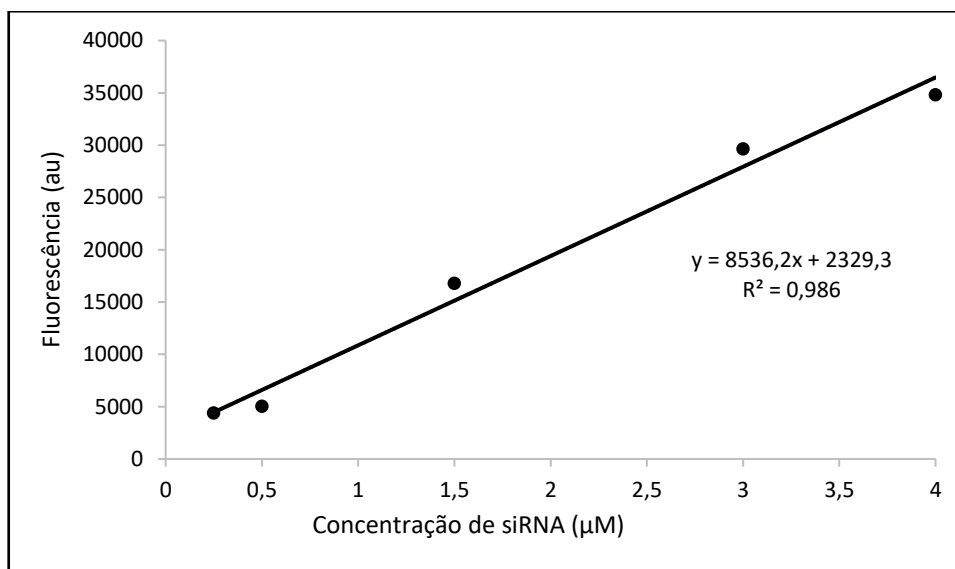
Considerando a função atribuída ao copolímero PEG-poliânion de aumentar a estabilidade do sistema nanoparticulado através de impedimento estérico (FRITZ *et al.*, 2002), é possível que a diminuição de concentração dessa molécula no segundo sistema estudado tenha ocasionado a redução de estabilidade observada. Uma vez que uma diferença significativa de estabilidade entre as duas formulações foi constatada, o sistema contendo a maior concentração de polímero foi determinado como o mais adequado para os objetivos propostos. Ainda, estudos posteriores devem ser realizados durante períodos prolongados e em diferentes circunstâncias, objetivando demonstrar a estabilidade das nanopartículas em condições semelhantes ao ambiente fisiológico, e também para determinar a estabilidade final da formulação, considerando que a mesma foi estável durante todo o período estudado.

5.7 ESTUDO DE EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO DE SIRNA

Para determinação da eficiência de incorporação das nanopartículas híbridas preparadas com copolímero na concentração de 1000 µg/mL, foi utilizado um *kit* que permite a quantificação de pequenos RNAs de aproximadamente 20 nucleotídeos ou pares de bases, podendo ser utilizado tanto para detecção de miRNAs, quanto de siRNAs. Dessa forma, o sobrenadante foi coletado e analisado quantitativamente através de fluorescência para detecção de ácidos nucleicos, utilizando excitação/emissão máxima de 500/525 nm. A partir dessas medidas foi possível obter a equação da reta (Figura 9), sendo então calculada a eficiência de

incorporação com base na relação da concentração de siRNA dosada no sobrenadante e da concentração teórica de siRNA nas nanopartículas.

Figura 9 - Curva padrão de siRNA



Curva padrão de siRNA realizada através da técnica de espectrofluorimetria com monitorização da molécula fluorescente intercalada ao siRNA. λ excitação= 500 nm e λ de emissão= 525nm. Fonte: Próprio autor (2021).

A eficiência de incorporação das nanopartículas híbridas foi de aproximadamente 46% do total de ácidos nucleicos adicionado a formulação. Esse resultado é compatível com o obtido por Souza (2016), que obteve aproximadamente 45% de siRNA complexado a um sistema nanocarreador idêntico. Considerando a capacidade do CaP em adsorver moléculas negativamente carregadas, como siRNA e também PEG-poliânion, o resultado de eficiência de incorporação obtido era esperado, uma vez que o aumento de concentração polimérica diminui a quantidade de ácidos nucleicos incorporada à nanopartícula devido a competição entre essas moléculas (KAKIZAWA; FURUKAWA; KATAOKA, 2004).

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Conforme os resultados alcançados a seleção de alvos significativos no câncer de mama triplo-negativo foi realizada com base em revisão bibliográfica e aplicação de bioinformática, com posterior desenho das sequências de siRNA com objetivo de inibir a expressão de AKT3 e PD-L1. Neste contexto, um sistema nanocarreador foi preparado e caracterizado com sucesso para entrega de material genético, demonstrando reprodutibilidade de síntese e eficiência de incorporação adequada. Para testes futuros visando avaliar entrega e silenciamento gênico das sequências de siRNA aqui desenhadas, o modelo celular mais adequado para utilização em ensaios *in vitro* foi determinado. Deixa-se assim, uma etapa finalizada com sucesso e abre-se uma perspectiva de trabalho futuro já bem concreta e planejada.

REFERÊNCIAS:

- ABEDINI, M. R.; MULLER, E. J.; BERGERON, R.; GRAY, D. A.; TSANG, B. K. Akt promotes chemoresistance in human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of FLICE-like inhibitory protein. **Oncogene**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 11–25, 2010. DOI: 10.1038/onc.2009.300.
- ABOU-JAWDE, Rony; CHOUEIRI, Toni; ALEMANY, Carlos; MEKHAIL, Tarek. An overview of targeted treatments in cancer. **Clinical Therapeutics**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 2121–2137, 2003. DOI: 10.1016/S0149-2918(03)80209-6.
- ABRAMSON, Vandana G.; LEHMANN, Brian D.; BALLINGER, Tarah J.; PIETENPOL, Jennifer A. Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. **Cancer**, [S. l.], v. 121, n. 1, p. 8–16, 2015. DOI: 10.1002/cncr.28914.
- ACS, American Cancer Association. **Types of Breast Cancer**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>. Acesso em: 1 mar. 2021.
- ALEXIS, Frank; PRIDGEN, Eric; MOLNAR, Linda K.; FAROKHZAD, Omid C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 505–515, 2008. DOI: 10.1021/mp800051m.
- ALMOZYAN, Sheema; COLAK, Dilek; MANSOUR, Fatmah; ALAIYA, Ayodele; AL-HARAZI, Olfat; QATTAN, Amal; AL-MOHANNA, Falah; AL-ALWAN, Monther; GHEBEH, Hazem. PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 141, n. 7, p. 1402–1412, 2017. DOI: 10.1002/ijc.30834.
- AMERES, Stefan Ludwig; MARTINEZ, Javier; SCHROEDER, Renée. Molecular Basis for Target RNA Recognition and Cleavage by Human RISC. **Cell**, [S. l.], v. 130, n. 1, p. 101–112, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.04.037.
- AYALA DE LA PEÑA, F. *et al.* SEOM clinical guidelines in early stage breast cancer (2018). **Clinical and Translational Oncology**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 18–30, 2019. DOI: 10.1007/s12094-018-1973-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1973-6>.
- BADVE, Sunil *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Modern Pathology**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 157–167, 2011. DOI: 10.1038/modpathol.2010.200.
- BARAIBAR, Iosune; MELERO, Ignacio; PONZ-SARVISE, Mariano; CASTANON, Eduardo. Safety and Tolerability of Immune Checkpoint Inhibitors (PD-1 and PD-L1) in Cancer. **Drug Safety**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 281–294, 2019. DOI: 10.1007/s40264-018-0774-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0774-8>.
- BARQUINERO, J.; EIXARCH, H.; PÉREZ-MELGOSA, M. Retroviral vectors: New applications for an old tool. **Gene Therapy**, [S. l.], v. 11, p. S3–S9, 2004. DOI: 10.1038/sj.gt.3302363.
- BELLACOSA, Alfonso; CHAN, Tung O.; AHMED, Naheed N.; DATTA, Ketaki; MALSTROM, Scott; STOKOE, David; MCCORMICK, Frank; FENG, Jinan; TSICHLIS,

Philip. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: The role of the PH domain. **Oncogene**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 313–325, 1998. DOI: 10.1038/sj.onc.1201947.

BELLACOSA, Alfonso; KUMAR, C. Chandra; CRISTOFANO, Antonio Di; TESTA, Joseph Robert. Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. **Advances in Cancer Research**, [S. l.], v. 94, n. 1 SUPPL., p. 29–86, 2005. DOI: 10.1016/S0065-230X(05)94002-5.

BERNSTEIN, Emily; CAUDY, Amy A.; HAMMOND, Scott M.; HANNON, Gregory J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, [S. l.], v. 409, n. 6818, p. 363–366, 2001. DOI: 10.1038/35053110.

BIRMINGHAM, Amanda; ANDERSON, Emily; SULLIVAN, Kevin; REYNOLDS, Angela; BOESE, Queta; LEAKE, Devin; KARPILOW, Jon; KHVOROVA, Anastasia. A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 2068–2078, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.278.

BISHT, Savita; BHAKTA, Gajadhar; MITRA, Susmita; MAITRA, Amarnath. pDNA loaded calcium phosphate nanoparticles: Highly efficient non-viral vector for gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 288, n. 1, p. 157–168, 2005. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.035.

BLAKE, James F. et al. Discovery and preclinical pharmacology of a selective ATP-competitive Akt inhibitor (GDC-0068) for the treatment of human tumors. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 55, n. 18, p. 8110–8127, 2012. DOI: 10.1021/jm301024w.

BORM, Paul J. A. et al. **The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC**. [s.l.: s.n.]. v. 3 DOI: 10.1186/1743-8977-3-11.

BOUTROS, Celine et al. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 473–486, 2016. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.58. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.58>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Onpattro (patisirana sódica): novo registro**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/onpattro-patisirana-sodica-novo-registro>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **GIVLAARI (givosirana sódica): novo registro**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/givlaari-givosirana-sodica-novo-registro>. Acesso em: 25 mar. 2021.

BRITT, Kara L.; CUZICK, Jack; PHILLIPS, Kelly Anne. Key steps for effective breast cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 417–436, 2020. DOI: 10.1038/s41568-020-0266-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-020-0266-x>.

CHEN, Xiuhui; MANGALA, Lingegowda S.; RODRIGUEZ-AGUAYO, Cristian; KONG, Xianchao; LOPEZ-BERESTEIN, Gabriel; SOOD, Anil K. RNA interference-based therapy and its delivery systems. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 107–124, 2018. DOI: 10.1007/s10555-017-9717-6.

CHIN, Y. Rebecca; YOSHIDA, Taku; MARUSYK, Andriy; BECK, Andrew H.; POLYAK, Kornelia; TOKER, Alex. Targeting Akt3 Signaling in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 964–973, 2014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2175.

Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-2175>.

COLLEONI, Marco *et al.* Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: Results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 28, n. 18, p. 2966–2973, 2010. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.9549.

DANAEI, M.; DEHGANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

DATTA, Sandeep Robert; BRUNET, Anne; GREENBERG, Michael E. Cellular survival: A play in three acts. **Genes and Development**, [S. l.], v. 13, n. 22, p. 2905–2927, 1999. DOI: 10.1101/gad.13.22.2905.

DE MELLO, Leônidas J.; SOUZA, Gabriela R. R.; SILVA, Adny H.; GUALBERTO, Ana C. M.; GAMEIRO, Jacy; JÚNIOR, Dalton Dittz; DE MIRANDA, Neli B.; PITTELLA, Frederico; CRECZYNSKI-PASA, Tânia B. In vivo antiapoptotic gene silencing: hybrid nanoparticles as delivery system. **IFAC-PapersOnLine**, [S. l.], v. 51, n. 27, p. 10–15, 2018. DOI: 10.1016/j.ifacol.2018.11.666. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2018.11.666>.

DE MELLO, Leônidas João; SOUZA, Gabriela Regina Rosa; WINTER, Evelyn; SILVA, Adny Henrique; PITTELLA, Frederico; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. Knockdown of antiapoptotic genes in breast cancer cells by siRNA loaded into hybrid nanoparticles. **Nanotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 17, 2017. DOI: 10.1088/1361-6528/aa6283.

DE PALMA, Michele; HANAHAN, Douglas. The biology of personalized cancer medicine: Facing individual complexities underlying hallmark capabilities. **Molecular Oncology**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 111–127, 2012. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.01.011.

DENT, Rebecca *et al.* Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 13, n. 15, p. 4429–4434, 2007. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.

DUAN, Meng; FANG, Meixia; WANG, Changhe; WANG, Hongyan; LI, Meng. LncRNA EMX2OS induces proliferation, invasion and sphere formation of ovarian cancer cells via regulating the miR-654-3p/AKT3/PD-L1 axis. **Cancer Management and Research**, [S. l.], v. 12, p. 2141–2154, 2020. DOI: 10.2147/CMAR.S229013.

ELBASHIR, Sayda M.; HARBORTH, Jens; LENDECKEL, Winfried; YALCIN, Abdullah; WEBER, Klaus; TUSCHL, Thomas. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, [S. l.], v. 411, n. 6836, p. 494–498, 2001. DOI: 10.1038/35078107. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35078107>.

ENGELMAN, Jeffrey A.; LUO, Ji; CANTLEY, Lewis C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 606–619, 2006. DOI: 10.1038/nrg1879.

FAKHR, E.; ZARE, F.; TEIMOORI-TOOLABI, L. Precise and efficient siRNA design: A key point in competent gene silencing. **Cancer Gene Therapy**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 73–82, 2016. DOI: 10.1038/cgt.2016.4.

FATEMIAN, Tahereh; MOGHIMI, Hamid Reza; CHOWDHURY, Ezharul Hoque. Intracellular delivery of siRNAs targeting akt and erbb2 genes enhances chemosensitization of breast cancer cells in a culture and animal model. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11090458.

FDA, U. S. Food and Drug Administration. **FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for locally recurrent unresectable or metastatic triple negative breast cancer**. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-grants-accelerated-approval-pembrolizumab-locally-recurrent-unresectable-or-metastatic-triple>. Acesso em: 8 abr. 2021.

FENG, Yixiao *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018. DOI: 10.1016/j.gendis.2018.05.001. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>.

FIRE, Andrew; XU, SiQun; MONTGOMERY, Mary K.; KOSTAS, Steven A.; DRIVER, Samuel E.; MELLO, Craig C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [S. l.], v. 391, n. 6669, p. 806–811, 1998. DOI: 10.1038/35888. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35888>.

FOULKES, WILLIAM; SMITH, IAN; REIS-FILHO, Jorge. Triple-Negative Breast Cancer. **The new england journal of medicine review**, [S. l.], p. 1938–1948, 2010.

FRESHNEY, R. **Culture of animals cells: A manual of basic technique**. New York: 1987.

FRESNO VARA, Juan Ángel; CASADO, Enrique; DE CASTRO, Javier; CEJAS, Paloma; BELDA-INIESTA, Cristóbal; GONZÁLEZ-BARÓN, Manuel. P13K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 193–204, 2004. DOI: 10.1016/j.ctrv.2003.07.007.

GAO, Chunyi *et al.* Regulation of AKT phosphorylation by GSK3 β and PTEN to control chemoresistance in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 176, n. 2, p. 291–301, 2019. DOI: 10.1007/s10549-019-05239-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05239-3>.

GOLDMAN, Mary J. *et al.* Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 675–678, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0546-8.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. A New Technique for the Assay Adenovirus of Infectivity of. **Virology**, [S. l.], v. 467, n. 52, p. 456–467, 1973.

GRAF, R.; LÜCK, M.; QUELLEC, P.; MARCHAND, M.; DELLACHERIE, E.; HARNISCH, S.; BLUNK, T.; MÜLLER, R. H. “Stealth” corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 18, n. 3–4, p. 301–313, 2000. DOI: 10.1016/S0927-7765(99)00156-3.

GUY, P. M.; PLATKO, J. V.; CANTLEY, L. C.; CERIONE, R. A.; CARRAWAY, K. L. Insect cell-expressed p180(erbB3) possesses an impaired tyrosine kinase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 91, n. 17, p. 8132–8136, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.17.8132.

HABERBECK, Gabriela Regina Rosa Souza. **NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS COMO SISTEMA DE ENTREGA DE siRNA : SILENCIAMENTO IN VIVO DO GENE Vegf EM CÂNCER DE MAMA.** 2019. [S. l.], 2019.

HALEY, Benjamin; ZAMORE, Phillip D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. **Nature Structural and Molecular Biology**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 599–606, 2004. DOI: 10.1038/nsmb780.

HANADA, Masahito; FENG, Jianhua; HEMMINGS, Brian A. Structure, regulation and function of PKB/AKT - A major therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1697, n. 1–2, p. 3–16, 2004. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.11.009.

HANNON, Gregory J. RNA interference. **Nature**, [S. l.], v. 418, n. 6894, p. 244–251, 2002. DOI: 10.1038/418244a.

HARBECK, Nadia; PENAULT-LLORCA, Frédérique; CORTES, Javier; GNANT, Michael; HOUSSAMI, Nehmat; POORTMANS, Philip; RUDDY, Kathryn; TSANG, Janice; CARDOSO, Fatima. **Breast cancer**. [s.l: s.n.]. v. 5 DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2.

HOY, Sheridan M. Patisiran: First Global Approval. **Drugs**, [S. l.], v. 78, n. 15, p. 1625–1631, 2018. DOI: 10.1007/s40265-018-0983-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>.

HU, Bo; ZHONG, Liping; WENG, Yuhua; PENG, Ling; HUANG, Yuanyu; ZHAO, Yongxiang; LIANG, Xing Jie. Therapeutic siRNA: state of the art. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-0207-x.

HUANG, Min; LOU, Yanyan; PELLISSIER, James; BURKE, Thomas; LIU, Frank Xiaoqing; XU, Ruifeng; VELCHETI, Vamsidhar. Cost Effectiveness of Pembrolizumab vs. Standard-of-Care Chemotherapy as First-Line Treatment for Metastatic NSCLC that Expresses High Levels of PD-L1 in the United States. **Pharmacoeconomics**, [S. l.], v. 35, n. 8, p. 831–844, 2017. DOI: 10.1007/s40273-017-0527-z.

IARC, International Agency for Research on Cancer. **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020.** [s.l: s.n.].

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **O que é câncer?** 2020a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 15 fev. 2021.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020 - Introdução | INCA - Instituto Nacional de Câncer.** 2020b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>. Acesso em: 24 fev. 2021.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Conceito e Magnitude do câncer de mama | INCA - Instituto Nacional de Câncer.** 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/conceito-e-magnitude>. Acesso em: 15 fev. 2021.

JAIN, Rakesh K.; STYLIANOPOULOS, Triantafyllos. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 653–664, 2010. DOI: 10.1038/nrclinonc.2010.139. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139>.

JANKU, Filip; YAP, Timothy A.; MERIC-BERNSTAM, Funda. Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway? **Nature Reviews Clinical Oncology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 273–291, 2018. DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.28. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.28>.

JIANG, Guanglong; ZHANG, Shijun; YAZDANPARAST, Aida; LI, Meng; PAWAR, Aniruddha Vikram; LIU, Yunlong; INAVOLU, Sai Mounika; CHENG, Lijun. Comprehensive comparison of molecular portraits between cell lines and tumors in breast cancer. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 17, n. Suppl 7, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2911-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2911-z>.

JORDAN, Martin; SCHALLHORN, Annette; WURM, Florian M. Transfecting mammalian cells: Optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 596–601, 1996. DOI: 10.1093/nar/24.4.596.

KAKIZAWA, Yoshinori; FURUKAWA, Sanae; KATAOKA, Kazunori. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 345–356, 2004. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.03.031.

KAKIZAWA, Yoshinori; KATAOKA, Kazunori. Block copolymer self-assembly into monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate. **Langmuir**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 4539–4543, 2002. DOI: 10.1021/la011736s.

KHAN, Mohammad A.; JAIN, Vineet K.; RIZWANULLAH, Md; AHMAD, Javed; JAIN, Keerti. PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 2181–2191, 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2019.09.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.001>.

KHVOROVA, Anastasia; REYNOLDS, Angela; JAYASENA, Sumedha D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, [S. l.], v. 115, n. 2, p. 209–216, 2003. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00801-8.

KIM, Young J. Computational siRNA Design Considering Alternative Splicing. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 623, p. 81–92, 2010. DOI: 10.1007/978-1-60761-588-0.

KOBAYASHI, Hotaka; TOMARI, Yukihide. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Gene Regulatory Mechanisms**, [S. l.], v. 1859, n. 1, p. 71–81, 2016. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2015.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagrm.2015.08.007>

KOBOLDT, Daniel C. et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [S. l.], v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012. DOI: 10.1038/nature11412.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970. 227(5259): p. 680-5.

LANG, Liwei; LAM, Tiffany; CHEN, Alex; JENSEN, Caleb; DUNCAN, Leslie; KONG, Feng Chong; KURAGO, Zoya B.; SHAY, Chloe; TENG, Yong. Circumventing AKT-Associated Radioresistance in Oral Cancer by Novel Nanoparticle-Encapsulated Capivasertib. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 1–14, 2020. DOI: 10.3390/cells9030533.

LARES, Monica R.; ROSSI, John J.; OUELLET, Dominique L. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 28, n. 11, p. 570–579, 2010. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.07.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.009>.

LAWRENCE, Michael S. et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. **Nature**, [S. l.], v. 505, n. 7484, p. 495–501, 2014. DOI: 10.1038/nature12912. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12912>.

LAZO, John S.; SHARLOW, Elizabeth R. Drugging Undruggable Molecular Cancer Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 56, n. October 2015, p. 23–40, 2016. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103440.

LEVINGSTONE, Tanya J.; HERBAJ, Simona; REDMOND, John; MCCARTHY, Helen O.; DUNNE, Nicholas J. Calcium phosphate nanoparticles-based systems for RNAi delivery: Applications in bone tissue regeneration. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 5–10, 2020. DOI: 10.3390/nano10010146.

LI, Jun; CHEN, Yun-Ching; TSENG, Yu-Cheng; MOZUMDAR, Subho; HUANG, Leaf. Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 142, n. 3, p. 416–421, 2010. DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.11.008.

LIEDTKE, Cornelia *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 1275–1281, 2008. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.4147.

LIN, Nancy U. *et al.* Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. **Cancer**, [S. l.], v. 118, n. 22, p. 5463–5472, 2012. DOI: 10.1002/cncr.27581.

LIU, Jidong; CARMELL, Michelle A.; RIVAS, Fabiola V.; MARSDEN, Carolyn G.; THOMSON, J. Michael; SONG, Ji Joon; HAMMOND, Scott M.; JOSHUA-TOR, Leemor; HANNON, Gregory J. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, [S. l.], v. 305, n. 5689, p. 1437–1441, 2004. DOI: 10.1126/science.1102513.

LIU, Ke; NEWBURY, Patrick A.; GLICKSBERG, Benjamin S.; ZENG, William Z. D.; PAITHANKAR, Shreya; ANDRECHEK, Eran R.; CHEN, Bin. Evaluating cell lines as models for metastatic breast cancer through integrative analysis of genomic data. **Nature Communications**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-10148-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-10148-6>.

LIU, Shengwei; CHEN, Shuang; YUAN, Weiguang; WANG, Hongyan; CHEN, Kewang; LI, Dianjun; LI, Dalin. PD-1/PD-L1 interaction up-regulates MDR1/P-gp expression in breast cancer cells via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 59, p. 99901–99912, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.21914.

LOI, Sherene *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: Results from the FinHER trial. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 1544–1550, 2014. DOI: 10.1093/annonc/mdu112. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu112>.

LOTFINEJAD, Parisa *et al.* PD-L1 silencing inhibits triple-negative breast cancer development and upregulates T-cell-induced pro-inflammatory cytokines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 138, p. 111436, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111436. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111436>.

LOWRY, O.H., *et al.*, Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.

MA, Da. Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. **Nanoscale**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 6415–6424, 2014. DOI: 10.1039/c4nr00018h.

MAITRA, Amarnath. Calcium phosphate nanoparticles: Second-generation nonviral vectors in gene therapy. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 893–905, 2005. DOI: 10.1586/14737159.5.6.893.

MATRANGA, Christian; TOMARI, Yukihide; SHIN, Chanseok; BARTEL, David P.; ZAMORE, Phillip D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. **Cell**, [S. l.], v. 123, n. 4, p. 607–620, 2005. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.044.

MATSUMURA, Yasuhiro; MAEDA, Hiroshi. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. **Cancer Research**, [S. l.], v. 46, n. 8, p. 6387–6392, 1986.

MINN, Andy J. et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. **Nature**, [S. l.], v. 436, n. 7050, p. 518–524, 2005. DOI: 10.1038/nature03799.

MITTENDORF, Elizabeth A. et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. **Cancer immunology research**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 361–370, 2014. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127.

NAKATANI, Kaname; THOMPSON, Devon A.; BARTHEL, Andreas; SAKAUE, Hiroshi; LIU, Wei; WEIGEL, Ronald J.; ROTH, Richard A. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 274, n. 31, p. 21528–21532, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.31.21528. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.31.21528>.

NAPPER, D. H. Steric stabilization. **Journal of Colloid And Interface Science**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 390–407, 1977. DOI: 10.1016/0021-9797(77)90150-3.

NEL, A.; XIA, Tian.; MÄDLER, Lutz.; LI, Ning. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, [S. l.], v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006. DOI: 10.1126/science.1114397. Disponível em: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1114397>.

NIH, National Cancer Institute. **Atezolizumab Approved for Some Patients with Triple-Negative Breast Cancer**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2019/atezolizumab-triple-negative-breast-cancer-fda-approval>. Acesso em: 8 abr. 2021.

NIH, National Cancer Institute. **The Cancer Genome Atlas Program**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>.

NISHIMURA, Masato *et al.* Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment. **Cancer Discovery**, [S. l.], v. 3, n. 11, p. 1302–1315, 2013. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0159.

O’HURLEY, Gillian et al. Investigation of molecular alterations of AKT-3 in triple-negative breast cancer. **Histopathology**, [S. l.], v. 64, n. 5, p. 660–670, 2014. DOI: 10.1111/his.12313.

OWENS, Donald E.; PEPPAS, Nicholas A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 307, n. 1, p. 93–102, 2006. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.

PAPATHEODOROU, Irene et al. Expression Atlas update: From tissues to single cells. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 48, n. D1, p. D77–D83, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz947.

PARVANI, Jenny; JACKSON, Mark. Silencing the Roadblocks to Effective Triple Negative Breast Cancer Treatments by siRNA Nanoparticles. **Endocrine-Related Cancer**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 81–97, 2017. DOI: 10.1530/ERC-16-048.

PEROU, Charles M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. **The Oncologist**, [S. l.], v. 15, n. S5, p. 39–48, 2010. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-s5-39.

PEROU, Charles M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [S. l.], v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000. DOI: 10.1038/35021093. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35021093>.

PHUA, Lee Cheng; LEE, Soo Chin; NG, Kwong; ABDUL AZIZ, Mohamed Ismail. Cost-effectiveness analysis of atezolizumab in advanced triple-negative breast cancer. **BMC Health Services Research**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1186/s12913-020-05445-6.

PITTELLA, Federico *et al.* Enhanced endosomal escape of siRNA-incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge-conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity. **Biomaterials**, [S. l.], v. 32, n. 11, p. 3106–3114, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.057.

REYNOLDS, Angela; LEAKE, Devin; BOESE, Queta; SCARINGE, Stephen; MARSHALL, William S.; KHVOROVA, Anastasia. Rational siRNA design for RNA interference. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 326–330, 2004. DOI: 10.1038/nbt936.

SANMAMED, Miguel F.; CHEN, Lieping. Inducible Expression of B7-H1 (PD-L1) and Its Selective Role in Tumor Site Immune Modulation. **The Cancer Journal**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 256–261, 2014. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000061. Disponível em: <https://journals.lww.com/00130404-201407000-00004>.

SASAKI, Toyokazu et al. Knockdown of Akt isoforms by RNA silencing suppresses the growth of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 399, n. 1, p. 79–83, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.07.045. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.045>.

SARBASSOV, Dos D.; GUERTIN, David A.; ALI, Siraj M.; SABATINI, David M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, [S. l.], v. 307, n. 5712, p. 1098–1101, 2005. DOI: 10.1126/science.1106148.

SAURA, Cristina et al. Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of. **Cancer discovery**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 102–113, 2018. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0512.A.

SCHWARZ, Dianne S.; HUTVÁGNER, György; DU, Tingting; XU, Zuoshang; ARONIN, Neil; ZAMORE, Phillip D. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. **Cell**, [S. l.], v. 115, n. 2, p. 199–208, 2003. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00759-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403007591>.

SCHMID, Peter *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 379, n. 22, p. 2108–2121, 2018. DOI: 10.1056/NEJMoa1809615. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1809615>.

SONG, Mengqiu; BODE, Ann M.; DONG, Zigang; LEE, Mee Hyun. AKt as a therapeutic target for cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 79, n. 6, p. 1019–1031, 2019. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2738.

SORLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001. DOI: 10.1073/pnas.191367098. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.191367098>.

SOUZA, Gabriela Regina Rosa. **Desenvolvimento de nanopartículas híbridas para terapia por RNA de interferência: silenciamento de genes-chave na sobrevivência celular em câncer de mama**. 2016. Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2016.

STANTON, Sasha E.; DISIS, Mary L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1186/s40425-016-0165-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-016-0165-6>.

SUBHAN, Md Abdus; TORCHILIN, V. P. Efficient nanocarriers of siRNA therapeutics for cancer treatment. **Translational Research**, [S. l.], v. 214, p. 62–91, 2019. DOI: 10.1016/j.trsl.2019.07.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.07.006>.

SUNG, Hyuna. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–41, 2021. DOI: 10.3322/caac.21492. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21660>. Acesso em: 16 fev. 2021.

TANNER, Minna; KAPANEN, Anita I.; JUNTILA, Teemu; RAHEEM, Olayinka; GRENNAN, Seija; ELO, Jussi; ELENIOUS, Klaus; ISOLA, Jorma. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 3, n. 12, p. 1585–1592, 2004.

THOMAS, Clare E.; EHRHARDT, Anja; KAY, Mark A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 346–358, 2003. DOI: 10.1038/nrg1066.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine. [S. l.], 2006. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/summary/>. Acesso em: 9 mar. 2021.

VIALE, G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, [S. l.], v. 23, n. Supplement 10, p. 207–210, 2012. DOI: 10.1093/annonc/mds326.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. **Breast Cancer Treatment: A Review** **JAMA - Journal of the American Medical Association** American Medical Association, 2019. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.

WANG, Andrew Z.; LANGER, Robert; FAROKHZAD, Omid C. Nanoparticle delivery of cancer drugs. **Annual Review of Medicine**, [S. l.], v. 63, p. 185–198, 2012. DOI: 10.1146/annurev-med-040210-162544.

WANG, Daniel Y. *et al.* Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 4, n. 12, p. 1721–1728, 2018. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.3923.

WHITEHEAD, Kathryn A.; LANGER, Robert; ANDERSON, Daniel G. Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 129–138, 2009. DOI: 10.1038/nrd2742.

WHO. **Cancer**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 15 fev. 2021.

WU, Bin; MA, Fei. Cost-effectiveness of adding atezolizumab to first-line chemotherapy in patients with advanced triple-negative breast cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 175883592091600, 2020. DOI: 10.1177/1758835920916000. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1758835920916000>.

WU, Sherry Y.; LOPEZ-BERESTEIN, Gabriel; CALIN, George A.; SOOD, Anil K. RNAi therapies: Drugging the undruggable. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 6, n. 240, p. 1–7, 2014. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008362.

WYSOCKI, Piotr J.; MACKIEWICZ-WYSOCKA, M.; MACKIEWICZ, Andrzej. Cancer gene therapy - State-of-the-art. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 149–155, 2002. DOI: 10.1016/S1507-1367(02)70989-9.

XIN, Yong; HUANG, Min; GUO, Wen Wen; HUANG, Qian; ZHANG, Long zhen; JIANG, Guan. Nano-based delivery of RNAi in cancer therapy. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1186/s12943-017-0683-y.

XU, Cong fei; WANG, Jun. Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2015. DOI: 10.1016/j.ajps.2014.08.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.08.011>.

XUE, J. *et al.* MiRNA-621 sensitizes breast cancer to chemotherapy by suppressing FBXO11 and enhancing p53 activity. **Oncogene**, [S. l.], v. 35, n. 4, p. 448–458, 2016. DOI: 10.1038/onc.2015.96.

YIN, Hao; KANASTY, Rosemary L.; ELTOUKHY, Ahmed A.; VEGAS, Arturo J.; DORKIN, J. Robert; ANDERSON, Daniel G. Non-viral vectors for gene-based therapy. **Nature Reviews Genetics**, [S. l.], v. 15, n. 8, p. 541–555, 2014. DOI: 10.1038/nrg3763. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3763>.

YOUNG, Samuel Wang Sherng; STENZEL, Martina; JIA-LIN, Yang. Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [S. l.], v. 98, p. 159–169, 2016. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.10.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.10.015>.

ZHANG, Jing; LI, Xiang; HUANG, Leaf. Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 190, p. 440–450, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.05.037. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.037>.

ZHANG, Mingzhen; KATAOKA, Kazunori. Nano-structured composites based on calcium phosphate for cellular delivery of therapeutic and diagnostic agents. **Nano Today**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 508–517, 2009. DOI: 10.1016/j.nantod.2009.10.009.