

Desenvolvimento de nanocarreadores com base em carbonato de cálcio visando a entrega de short interfering RNA em câncer de mama¹

Development of calcium carbonate-based nanocarriers aiming short interfering RNA delivery to breast cancer

Ana Carolina Marcial Alves Fasolato²

Frederico Pittella³

DOI: <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2019.v19.29918>

Resumo

O câncer de mama, segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres, é ainda uma das principais causas de mortalidade no mundo. Em consequência, houve um aumento no número de pesquisas para melhorar os procedimentos terapêuticos convencionais, que incluem a pesquisa com a terapia por interferência de RNA (RNAi). Para tal, o desenvolvimento de novos nanocarreadores que sejam eficientes na proteção e na liberação do ativo é necessário. O objetivo deste estudo foi a preparação de nanopartículas inorgânico-orgânicas baseadas em carbonato de cálcio e copolímero contendo polietileno (glicol), através dos métodos de difusão a gás (método 1) e adição direta (método 2), para posterior aplicação como carreadores de *short interfering* RNA (siRNA) a serem utilizados na terapia anticâncer. As nanopartículas foram formadas por auto-associação, em um sistema fechado, para que houvesse a reação de carbonatação. Após a preparação, a suspensão de nanopartículas foi caracterizada físico-quimicamente. As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS – *dynamic light scattering*) indicaram uma distribuição de tamanho com diâmetro médio em $474,3 \pm 299,8$ nm pelo método 1; e $618,4 \pm 444,2$ nm pelo método 2; e índice de polidispersão (Pdl – *polydispersity index*) de $0,5292 \pm 0,27$ e $0,596 \pm 0,20$, para os respectivos métodos. Os histogramas de tamanho por intensidade mostraram distribuições bimodais, sugerindo a formação de duas apresentações com pico de tamanho em 9,4 e 1738,0 nm pelo método 1; e 7,4 e 766,7 nm pelo método 2, indicando que as partículas se apresentavam polidispersas, o que pode influenciar diretamente na sua estabilidade. Os resultados obtidos abrem nova perspectiva para a preparação de nanopartículas híbridas baseadas em carbonato de cálcio, no entanto é necessário melhorar o método para obtê-las com tamanho e Pdl ideais para aplicação biomédica.

Palavras-chave: Nanopartículas. Carbonato de cálcio. Câncer de mama.

Abstract

Breast cancer, second most common among women, is still one of the leading causes of mortality in the world. Therefore, there was an increase in the number of studies to improve conventional

¹ Trabalho premiado no Seminário de Iniciação Científica da UFJF em 2018.

² Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica e Tecnológica da Universidade Federal de Juiz de Fora (PROBIC/FAPEMIG/UFJF - 2017/2018).

³ Professor orientador. Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). E-mail: frederico.pittella@ufff.edu.br.



therapeutic procedures, which include research with RNA interference (RNAi) therapy. To this end, the development of new nanocarriers that are efficient in protecting and releasing the asset is necessary. The objective of this study was to prepare inorganic-organic nanoparticles based on calcium carbonate and copolymer containing polyethylene (glycol), through gas diffusion (method 1) and direct addition (method 2), for application as nanocarriers of short interfering RNA (siRNA) to be used in anti-cancer therapy. The nanoparticles were formed by self-assembly in a closed system, to facilitate the carbonation reaction. After preparation, the suspension of nanoparticles was physical-chemically characterized. The dynamic light scattering (DLS) measurements indicate a mean diameter distribution at 474.3 ± 299.8 nm by method 1, and 618.4 ± 444.2 nm by method 2, and polydispersity index (Pdl) of 0.5292 ± 0.27 and 0.596 ± 0.20 for the respective methods. Histograms of size by intensity showed bimodal distributions, suggesting the formation of two presentations with peak of size in 9.4 and 1738.0 nm by method 1, and 7.4 and 766.7 nm by method 2, indicating that the particles were polydispersed, which can influence their stability. The results obtained open a new perspective for the preparation of hybrid nanoparticles based on calcium carbonate, however it is necessary to improve the method to obtain the nanoparticles with size and Pdl suitable for biomedical application.

Keywords: Nanoparticles. Calciumcarbonate. Breastcancer.

1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um conjunto de doenças responsáveis pelo crescimento e pela proliferação celular desordenados em determinado tecido, causando complicações fisiológicas. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 8,8 milhões de pessoas morreram em decorrência de câncer em 2015, sendo o conjunto de doenças responsável por cerca de uma em cada seis mortes no mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos, e esse número deve subir para mais de 21 milhões de pessoas em 2030 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Há vários tipos de câncer de mama, que podem ter desenvolvimento rápido ou lento. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável por aproximadamente 25% dos novos casos da doença por ano. O tratamento varia com o estágio da doença, suas características biológicas e as condições da paciente, sendo suas modalidades divididas em tratamento local, que inclui cirurgia e radioterapia; e tratamento sistêmico, envolvendo quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica. Porém, devido à não especificidade dos tratamentos convencionais e aos efeitos colaterais provocados, é necessário o desenvolvimento de terapias mais seletivas e eficientes (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018a; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018b).

O RNAi faz parte de uma via fundamental em células eucarióticas através da qual moléculas de RNA específicas a sequencias de RNAm são capazes de atingir e clivar o

RNA complementar. O mecanismo de ação do siRNA exógeno inicia-se com a presença de um RNA longo de fita dupla (dsRNA), que é clivado pela enzima DICER em pequenos RNA, denominados siRNA. Estes, quando no citoplasma da célula, integram-se ao complexo de indução de silenciamento de RNA (RISC), que apresenta uma proteína denominada Argonauta 2 (AGO2), a qual desenrola o siRNA e promove a clivagem da sua fita sense. O complexo RISC, após sua ativação, contendo a fita antisense do siRNA, procura e degrada o RNA complementar, causando silenciamento do gene e degradação do mRNA (ELBASHIR et al., 2001; WHITEHEAD et al., 2009; SINGHI et al., 2017).

Entretanto, para que a entrega do siRNA ao seu alvo no citoplasma ocorra de maneira segura e eficiente, é necessário o desenvolvimento de um carreador, uma vez que essas moléculas são grandes e suscetíveis à degradação, além de serem carregadas negativamente (PITTELLA et al., 2011).

Desse modo, a nanotecnologia tem sido extensamente explorada para melhorar as propriedades farmacocinéticas e o índice terapêutico de vários fármacos. Neste trabalho, apresenta-se o desenvolvimento de um sistema de nanopartículas inorgânico-orgânico composto por carbonato de cálcio e copolímero de poli(etileno glicol) preparado por meio dos métodos de difusão de gás e adição direta.

O carbonato de cálcio é um sal carbônico de cálcio, sendo um material comercialmente importante, com uma grande variedade de aplicações. Tradicionalmente, é usado na indústria de construção civil para a produção de argamassas e cimento. Devido à sua lividez e ao alto índice de refração, também é usado na fabricação de papel de alto brilho e como pigmento branco na indústria de tintas. Ademais, o carbonato de cálcio demonstra excelente biocompatibilidade, possibilitando aplicações biomédicas, como em comprimidos antiácidos, regeneração óssea e sistemas de liberação de medicamentos (DONNELLY et al., 2017).

O carbonato de cálcio (CaCO_3) pode apresentar vários polimorfos, sendo os mais comuns a calcita, a aragonita e a vaterita. Essas fases polimórficas cristalinas apresentam diferentes formas, estrutura porosa e densidade de partícula. As propriedades anteriores são ainda mais dependentes se o CaCO_3 existir naturalmente ou for preparado artificialmente através das várias rotas sintéticas. Essa variedade de morfologias torna o carbonato de cálcio útil na indústria (AL OMARI et al., 2016).

Dados da literatura mostram que na ausência de outros agentes o carbonato de

cálcio irá cristalizar em sua forma mais estável, levando à formação de grandes cristais. Como estratégia de estabilização de nanopartículas, copolímeros em bloco contendo PEG podem ser adicionados para estabilizar os cristais de carbonato de cálcio, formando uma camada densa e hidratada de cadeias longas e flexíveis na superfície da nanopartícula (JORALEMON et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar novos nanocarreadores híbridos com base em carbonato de cálcio para posteriormente serem utilizados na incorporação de *short interfering* RNA (siRNA) visando à aplicação em terapias de câncer de mama.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Cloreto de cálcio (CaCl_2) e Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) foram adquiridos de Sigma-Aldrich (EUA); poli(etileno glicol)-bloco-poliânion - PEG-PGlu foi obtido de Alamanda Inc. (EUA); dióxido de carbono solidificado foi obtido de Oficina do Gelo (Belo Horizonte, Brasil).

2.2 Preparação de nanocarreadores

As nanopartículas foram formadas por dois métodos: difusão de gás (método 1) e adição direta (método 2), utilizando solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) e copolímero, e dióxido de carbono solidificado, com base nos trabalhos de (DONELLY et al., 2017). O método 1 foi realizado em um recipiente fechado (dessecador) à temperatura ambiente. O copolímero contendo PEG foi adicionado em solução aquosa de CaCl_2 0,1 M e colocado em um béquer. Cinquenta gramas de dióxido de carbono foram adicionados ao fundo do dessecador. A reação foi deixada em repouso por 6, 12 e 24 horas. O método 2 foi realizado através da adição direta de 1 grama de dióxido de carbono à uma solução de copolímero contendo PEG e CaCl_2 0,1 M, sob agitação de 50 RPM, em temperatura ambiente.

2.3 Caracterização das nanopartículas

2.3.1 Espalhamento dinâmico de luz

O espalhamento dinâmico da luz (DLS – *dynamic light scattering*), também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons, é uma técnica que mede o movimento browniano de macromoléculas em solução devido ao bombardeamento de moléculas de solvente, e relaciona esse movimento ao tamanho (diâmetro hidrodinâmico) das partículas.

Neste trabalho, foi usada essa técnica para a determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e a distribuição de tamanho das nanopartículas híbridas (índice de polidispersão), usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), conforme Pittella e colaboradores (2011). As análises foram feitas em parceria com o Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A importância das nanopartículas para a saúde está no fato de esses carreadores serem um método eficiente de carregamento e liberação controlada do ativo. Para verificar o tamanho do carreador é necessário realizar as análises físico-químicas, como as de DLS.

O tamanho de partícula é um parâmetro crítico, que afeta a estabilidade, a eficiência de encapsulação, o perfil de liberação do fármaco e a biodistribuição. Já no índice de polidispersão (PDI), seu valor numérico varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho de partícula) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa, com múltiplos tamanhos de partícula), indicando a homogeneidade da formulação, além de ser essencial para sua estabilidade (DANAELI et al., 2018).

As análises de DLS indicaram uma distribuição de tamanho com diâmetro médio em $474,3 \pm 299,8$ nm pelo método 1; e $618,4 \pm 444,2$ nm pelo método 2; e índice de polidispersão (PDI) de $0,5292 \pm 0,27$ e $0,596 \pm 0,20$, para os respectivos métodos.

Nos dois métodos é possível observar amostras muito polidispersas, além da presença de partículas grandes e sedimentadas. Os histogramas de tamanho por intensidade sugerem a formação de duas apresentações com pico de tamanho em 9,4 e 1738,0 pelo método 1; e 7,4 e 766,7 pelo método 2 gerando uma variância em relação ao tamanho das partículas (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Curva de distribuição de tamanho por intensidade das nanopartículas híbridas obtidas pelo método 1

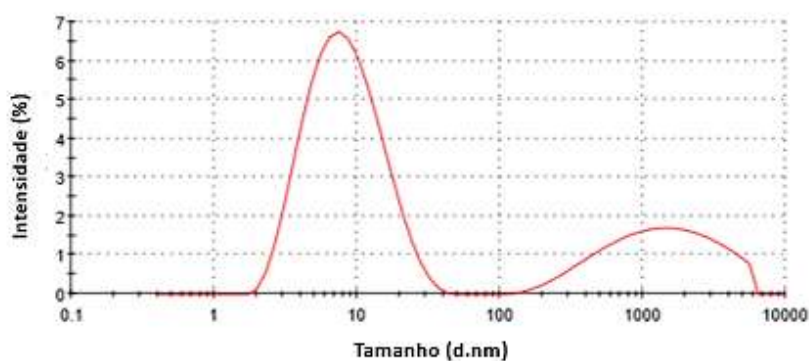
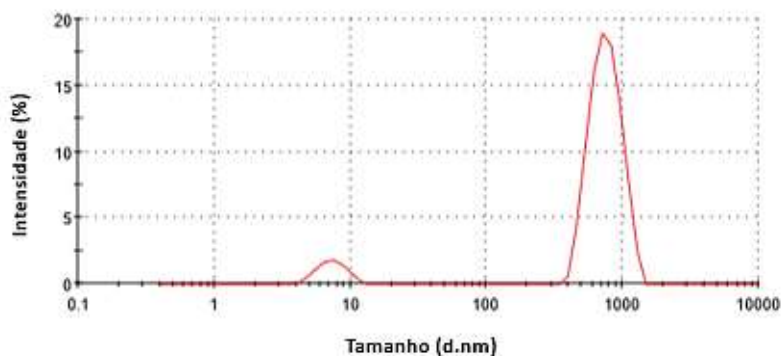
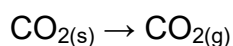
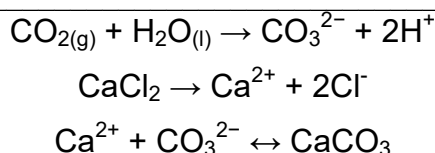


Gráfico 2 - Curva de distribuição de tamanho por intensidade das nanopartículas híbridas obtidas pelo método 2



Embora tenham sido obtidas distribuições polidispersas, é possível observar que em ambos os métodos foram produzidas nanopartículas. O mecanismo de formação através do método de difusão de gás inicia-se pela sublimação do dióxido de carbono sólido em gás, em recipiente fechado, até a saturação do ambiente (DONNELLY et al., 2017). Na interface líquido/ar, o dióxido de carbono irá reagir com a água, precipitando-se. Posteriormente, os íons carbonato formados reagem com os íons Ca^{2+} da solução para formar CaCO_3 na solução aquosa, de acordo com as reações:





Ânions do copolímero em bloco contendo PEG poderão, assim, ser adsorvidos pelos cristais para a formação de uma camada densa e hidratada de cadeias longas e flexíveis de PEG na superfície da nanopartícula, estabilizando o crescimento do cristal de CaCO_3 (PITTELLA et al., 2012; PITTELLA; KATAOKA, 2013; JORALEMON et al., 2010; MIYATA et al., 2011; MOGHIMI et al., 2001). Assim, as nanopartículas formadas através desta metodologia podem ser aplicadas como nanocarreadores.

4 CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados obtidos ao longo do estudo, como Pdl e o diâmetro hidrodinâmico, foi possível concluir que ambos os métodos foram eficientes na obtenção de nanopartículas. No entanto, ainda é necessária a realização de estudos para desenvolver o método, no sentido de otimizar as concentrações e a cinética de formação das nanopartículas. Posteriormente, precisa-se avaliar a homogeneidade e a estabilidade dessas novas nanopartículas, assim como seu tamanho e o Pdl. O desenvolvimento de nanocarreadores híbridos de CaCO_3 estáveis tornará possível a incorporação de sequências de siRNA e a realização de testes *in vitro* para avaliar sua aplicação na terapia anticâncer.

5 AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte através da bolsa de iniciação que tornou possível o desenvolvimento deste projeto. Fapemig APQ-00948-14. Agradecemos também à infraestrutura fornecida pelo Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano); ao Dr. Frederico Pittella, pela orientação.

REFERÊNCIAS

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2018a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Tipos de câncer**: mama. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2018b. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 9 jan. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Controle do câncer de mama**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2018c. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-de-mama/acoes-de-controlado/tratamento>. Acesso em: 9 jan. 2019.

AL OMARI, M. M. H. et al. Calcium carbonate. **Profiles of drug substances, excipients and related methodology**. Academic Press, p. 31-132, 2016.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, p. 10-57, 2018.

DONNELLY, F. C. et al. Synthesis of CaCO₃ nano- and micro- particles by dry ice carbonation. **Chem. Commun.**, v. 53, p. 6657-6660, maio 2017.

FAROKHZAD, O. C., LANGER, R. Nanomedicine: Developing Smarter Therapeutic and Diagnostic Modalities. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 58, p. 1456-1459, 2006.

FERRARI, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 161-171, 2005.

JIANG, W. et al. Nanoparticle-Mediated Cellular Response is Size Dependent. **Nat. Nanotechnol.**, v. 3, p. 145-150, 2008.

JORALEMON, M. J.; MCRAE, S.; EMRICK, T. PEGylated polymers for medicine: from conjugation to self-assembled systems. **Chemical Communications**, v. 46, n. 9, p. 1377-1393, jan. 2010.

KAKIZAWA, Y.; FURUKAWA, S.; KATAOKA, K. Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 97, n. 2, p. 345-356, jun. 2004.

LANGER, R. Drug Delivery and Targeting. **Nature**, v. 392, p. 5-10, 1998.

MIYATA, K.; CHRISTIE, R. J.; KATAOKA, K. Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. **Reactive and Functional Polymers**, v. 71, n. 3, p. 227-234, mar. 2011.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n.2, p. 283-318, jun. 2001.

PITTELLA, F. 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**, v. 32, n. 11, p. 3106-3114, jan. 2011.

PITTELLA, F. et al. Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge conversional polymer hybrid nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 161, n. 3, p. 868-874, maio 2012.

PITTELLA, F.; KATAOKA, K. Polymeric Micelles for siRNA Delivery: Barriers to Synthetic siRNA Therapeutics. In: HOWARD, K. A. (Ed.). **RNA Interference from Biology to Therapeutics**. Tokyo: Springer, 2013. p. 161-184.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **International Agency for Research on Cancer. Globocan 2018**: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/cancer>. Acesso em: 9 jan. 2019.