



DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS DE “DRUG DELIVERY” APROPRIADOS PARA O TRATAMENTO DE MELANOMAS POR siRNA

KAUAN FERREIRA DA ROCHA; ME. CREUSA CARVALHO DA COSTA; ME. ANA CRISTINA ALVES RODRIGUES; PROFA. DRA. ELISÂNGELA CLÁUDIA ALVES DE OLIVEIRA

RESUMO

O Melanoma Maligno é a forma mais agressiva de câncer de pele, além de apresentar uma notória resistência medicamentosa a tratamentos. Pesquisadores têm investido em um mecanismo endógeno de interferência, chamado de RNAi, capaz de induzir o silenciamento gênico pela ligação à transcritos complementares, tornando-o um agente silenciador ideal. No entanto, o desenvolvimento de uma plataforma baseada em pequenos RNA interferentes (siRNA) clinicamente viável, depende em grande parte de desenhos de sistemas de entrega apropriados, como por exemplo, DoCh, HA-siRNA-protamina, COS PBA, CuVA3, NPs HA-TAT-TMC-TC, cRGD-R9-colesterol-PEI-PEG e pAVC4. Para isso, o presente trabalho objetiva apontar resultados do uso de nanopartículas no desenvolvimento de estratégias de “drug delivery” eficazes no silenciamento de genes críticos do ciclo celular de melanomas, de siRNA. Trata-se de uma revisão integrativa, que ocorreu no mês de agosto de 2023, por meio das bases de dados PubMed, MEDLINE, LILACS e BVS. Utilizou-se artigos publicados no período de 2019-2023 com os descritores em Ciências da Saúde: “siRNA”, “Nanopartículas”, “Melanomas” e “RNA de Interferência”. Totalizou-se vinte e cinco trabalhos disponíveis na íntegra, em inglês. Os critérios de exclusão foram materiais da literatura cinzenta e artigos duplicados. Após a aplicabilidade dos critérios, elegeram-se sete artigos para a elaboração desta pesquisa. O presente trabalho trouxe os achados compilados dos artigos cujo enfoque era o desenvolvimento de nanopartículas com características desejáveis para produção de fármacos. Os atributos esperados são: capacidade de alta penetração celular, citotoxicidade nula, encapsulamento excelente, liberação controlada de siRNA. Os resultados obtidos com o uso das nanopartículas carregadas com siRNA demonstram o silenciamento de genes alvos, como a inibição de vias de expressão, indução da apoptose, baixa ou nula taxa de metástase, parada significativa do crescimento e proliferação celular. Dessa forma, de acordo com a literatura científica pesquisada, conclui-se que os sistemas de entrega apontados; DoCh, HA-siRNA-protamina, COS PBA, CuVA3, NPs HA-TAT-TMC-TC, cRGD-R9-colesterol-PEI-PEG e pAVC4 são promissores para o endereçamento de siRNA à melanomas.

Palavras-chave: Nanopartículas; knockdown; terapia antitumoral; oncogenética.

1 INTRODUÇÃO

O melanoma maligno (MM) é a forma mais agressiva de câncer de pele, além de possuir uma notória resistência medicamentosa a tratamentos (Eddy; Chen, 2020). Ressalta-se que seu processo tumorigênico está fortemente relacionado ao acometimento de mutações hereditárias em genes críticos do ciclo celular de células epiteliais (Newton-Bishop *et al.* 2020).

Nesse contexto, o uso de um mecanismo endógeno de interferência de RNA, através de pequenas moléculas de RNAs induzem o silenciamento gênico pela ligação à transcritos

complementares de genes envolvidos com essa patologia, tornando-o um agente silenciador ideal para fornecer uma forma de tratamento de melanoma aplicável (França *et al.* 2010). No entanto, o desenvolvimento de uma plataforma baseada em siRNA clinicamente viável, depende em grande parte de desenhos de sistemas de entrega apropriados para ácidos ribonucleicos (Habib *et al.* 2020).

Atualmente, no campo das ciências biomédicas, os sistemas de entrega ou “drug delivery” baseados em nanobiotecnologia e nanotecnologia, ganharam um crescente interesse de pesquisa e aplicabilidade (Neves *et al.* 2022). Os sistemas de entrega são descritos como uma variedade de nanopartículas com propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, projetadas para encapsular e entregar fármacos ou agentes terapêuticos, de forma específica em tecidos e/ou células (Güven, 2021). Para a entrega de siRNA é necessário a utilização de um sistema de endereçamento de fármaco eficaz para auxiliar na distribuição destes agentes terapêuticos no citoplasma das células transfectadas (Obeid *et al.* 2021).

Para isso, o presente trabalho objetiva destacar os resultados do uso de nanopartículas como “drug delivery” eficazes no silenciamento de genes críticos do ciclo celular de melanomas, através de pequenos RNAs interferentes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão integrativa de cunho descritivo e exploratório, que ocorreu no mês de agosto de 2023 por meio das bases de dados PubMed e *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE) e *Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde* (LILACS) e via *Biblioteca Virtual em Saúde* (BVS). Utilizou-se para tal, artigos publicados no período de 2019-2023 com os seguintes descritores em Ciências da Saúde (DeCS): “siRNA”, “Nanopartículas”, “Melanomas” e “RNA de Interferência” interligados pelo operador booleano AND. Totalizou-se vinte e cinco trabalhos disponíveis na íntegra, em inglês. Os critérios de exclusão foram materiais da literatura cinzenta e artigos duplicados. Após a aplicabilidade dos critérios, elegeram-se sete artigos para a elaboração desta pesquisa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho trouxe os achados compilados dos artigos cujo o enfoque principal era o desenvolvimento de nanopartículas com características desejáveis para produção de fármacos. Os atributos esperados são: capacidade de alta penetração celular, citotoxicidade nula, encapsulamento excelente, liberação controlada de siRNA. A seguir são apresentados os trabalhos consultados nesta pesquisa, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Trabalhos consultados e seus respectivos sistemas de entrega a genes-alvos críticos do ciclo celular de melanomas.

Autores	Título	Sistemas de Entrega	Genes-alvo
Exehige <i>et al.</i> (2020)	Silencing of STAT3 via Peptidomimetic DoCh LNP- Mediated Systemic Delivery of RNAi Downregulates PD- L1 and Inhibits Melanoma Growth.	DoCh	STAT3
Yang <i>et al.</i> (2021)	Development of a carrier system containing hyaluronic acid and protamina protamine for siRNA delivery in the treatment of melanoma.	HA-siRNA-protamina	STAT3
Liu <i>et al.</i> (2021)	Enhancing anti-melanoma outcomes in mice using novel chitoooligosaccharide nanoparticles loaded with therapeutic survivin-targeted siRNA.	COS PBA	Survivina

Erdene-Ochir <i>et al.</i> (2019)	Alkylation enhances biocompatibility and siRNA delivery efficiency of cationic curdlan nanoparticles.	CuVa3	STAT3
Bao <i>et al.</i> (2023)	Tumor targeted siRNA delivery by adenosine receptor-specific curdlan nanoparticles.	pAVC4	STAT3
Bastaki <i>et al.</i> (2021)	Delivery of STAT3 and PD-L1 siRNAs by hyaluronate-TAT trimethyl/thiolated chitosan nanoparticles suppresses cancer progression in tumor-bearing mice.	HA-TAT-TMC-PD-L1	STAT3
Zhang <i>et al.</i> (2021)	Treatment of Melanoma by Nano-cRGD-R9-cholesterol-conjugate-Delivered Wee1 siRNA. Molecular Pharmaceutics.	WEE1	

Exehige *et al.* (2020) perceberam o potencial terapêutico do silenciamento da expressão do gene STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) envolvido em piores prognósticos de pacientes com melanomas. Estes autores desenharam nanopartículas lipídicas (LNPs) baseadas em peptidomiméticos para entrega de siRNA em modelo murino de melanoma. Os resultados obtidos mostraram que, quando a nova formulação (descrita como DoCh) era administrada sistemicamente, induzia o silenciamento da expressão de STAT3, além de distribuir preferencialmente o siRNA ao tecido tumoral. Yang *et al.* (2021) obtiveram resultados semelhantes com o desenvolvimento de um sistema transportador contendo ácido hialurônico e protamina (HA-siRNA-protamina) para entrega de siRNA em células murinas B16F10, direcionados ao gene STAT3.

Liu *et al.* (2021) obtiveram sucesso no desenvolvimento de nanopartículas feitas de chitooligossacarídeo (COS) modificado com ácido fenilborônico (PBA). O objetivo seria direcionar o siRNA à survivina (participante da família de proteínas inibidoras da apoptose), localizada na maioria dos subtipos de melanomas. A entrega de siRNA com COS PBA, obteve sucesso apresentando potencial antiproliferativo em células B16F10 *in vitro*. Além de inibir significativamente o crescimento e a metástase do melanoma murino. Dessa forma, o COS modificado com PBA pode servir como um transportador eficiente para a entrega de siRNA na terapia antitumoral.

Erdene-Ochir *et al.* (2019) encontraram resultados não tão satisfatórios com sistemas de entrega derivados de Curdlana (produzido pelas espécies de *Alcaligenes faecalis*). Embora tenham comprovado a grande eficiência de entrega de genes e siRNA *in vitro* de curdlana aminada (6AC-100), foram relatados problemas de citotoxicidade associado. Como alternativa, os autores conjugaram um grupo alquila curto no 6-amino-curdlan (CuVA3) para diminuir a toxicidade da curdlana aminada e aumentar a eficiência da entrega intracelular em células B16 transfectadas com siSTAT3 complexadas com CuVA3. Os polímeros CuVa associaram prontamente com siRNA para formar nanopartículas e induziram um knockdown significativo do gene STAT3 na linhagem celular de melanoma murino B16.

Bao *et al.* (2023) melhoraram a biocompatibilidade do derivado de curdlan, através da fusão do derivado de amino curdlan com adenosina (denotado por polímero pAVC). Os autores confirmaram que a captação do polímero pAVC transportando siRNA pelas células tumorais era dependente do receptor de adenosina (AR) e foi especificamente inibida pelo AMP (Monofosfato de Adenosina), mas não pelo GMP (Monofosfato de Guanina). Os polímeros pAVC tanto reconheciam o receptor quanto exibiam citotoxicidade reduzida, e também foram eficientes no direcionamento do tumor *in vivo*. A entrega do siRNA do pAVC foi altamente específica ao tecido tumoral, silenciando o gene STAT3 e inibindo o crescimento tumoral.

Bastaki *et al.* (2021) obtiveram resultados semelhantes a respeito do sistema de entrega

projetado para fornecer pequenos siRNAs no gene STAT3 e no gene PD-L1 (Potencializador de metástases). Esse sistema de entrega consistia em nanopartículas (NPs) de trimetilquitosana (TMC) e chitosana tiolada (TC) conjugadas com peptídeo TAT derivado de HIV-1 e HA (ácido hialurônico) com características físico-químicas desejáveis. Os autores relatam que a inibição dupla com NPs HA-TAT-TMC-TC carregados com siRNA STAT3/PD-L1 levou a regulação negativa significativa dos genes PD-L1 e STAT3, com enormes efeitos supressivos na proliferação e migração em linhagens celulares de melanoma, contendo crescimento tumoral contido *in vivo*.

Zhang *et al.* (2021) utilizaram o cRGD (colesterol), o R8-cRGD (conjugado de peptídeo de penetração celular) e o PEG (polietilenoglicol) introduzidos em LMW PEI (polietilenoimina de baixo peso molecular) para formar nanopartículas cRGD-R9-colesterol-PEI-PEG transportando siRNA com direcionamento específico e alta capacidade de penetração celular. Como resultado, houve silenciamento significativo do gene WEE1 (Aproximadamente 60% da taxa de inibição) e induziu a apoptose de células tumorais B16. Além disso, o complexo RRCPP/siWee1 suprimiu o crescimento tumoral em modelo de xenoinxerto subcutâneo (aproximadamente 85% da taxa de inibição) e metástase pulmonar (aproximadamente 66% de taxa de inibição) com segurança *in vivo*.

Outra alternativa de sistemas de entrega foi proposta por Zhao *et al.* (2019). Neste trabalho, os autores investigaram os efeitos cooperativos do medicamento pimozida, que tem efeito terapêutico no melanoma, associado ao RNA de interferência (RNAi) direcionado ao PD-1 (Proteína de ponto de verificação de células nas células T), envolvida no escape imunológico do tumor. O siRNA PD-1 foi entregue a camundongos portadores de melanoma por *Salmonella* atenuada, em combinação com a administração do medicamento pimozida. Os resultados demonstraram que a terapia combinada teve o efeito terapêutico ideal no melanoma. Os mecanismos que comprovam sua eficácia envolveram a indução de apoptose e melhora na resposta imunológica.

4 CONCLUSÃO

Dessa forma, de acordo com a literatura científica pesquisada, conclui-se que os sistemas de entrega destacados; DoCh, HA-siRNA-protamina, COS PBA, CuVA3, pAVC4, NPs HA-TAT-TMC-TC e cRGD-R9-colesterol-PEI-PEG são promissores para o endereçamento de siRNA à melanomas. Entretanto, a busca por desenhos de sistemas de entrega deve-se manter constante, a fim de se obter novas estratégias farmacêuticas para o arsenal terapêutico de neoplasias.

REFERÊNCIAS

- BASTAKI, S; ARAVINDHAN, S; AHMADPOUR SAHEB, N; AFSARI KASHANI, M; EVGENIEVICH DOROFEEV, A; KAROON KIANI, F; JAHANDIDEH, H; BEIGI DARGANI, F; AKSOUN, M; NIKKHOO, A; MASJEDI, A; MAHMOODPOOR, A; AHMADI, M; DOLATI, S; NAMVAR AGHDASH, S; JADIDI-NIARAGH, F. Codelivery of STAT3 and PD-L1 siRNA by hyaluronate-TAT trimethyl/thiolated chitosan nanoparticles suppresses cancer progression in tumor-bearing mice. **Life Sciences**, v.266, 2021.
- BAO, Q; GANBOLD, T; BAO, M; XIAO, H; HAN, S; BAIGUDE, H. Tumor targeted siRNA delivery by adenosine receptor-specific curdlan nanoparticles. **International Journaul of Biological Macromolecules**, v.253, p.3, 2023.
- NEVES, K. J. D. S; CAMPOS, E. S. S; PAIVA, M. A; DE BARROS, N. B; MARTINS, T. S. Sistemas de entrega de drogas baseados em nanotecnologia: nanopartículas poliméricas para tratamento de câncer Nanotechnology-based drug delivery systems: review of recent

nanodrug development for cancer treatment. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 24770-24787, 2022.

EDDY, K; CHEN, S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. **International Journal Molecular Sciences**. n.21, v.23, p.8984, 2020.

ERDENE-OCHIR, T; GANBOLD, T; ZANDAN, J; HAN, S; BORJIHAN, G; BAIGUDE, H. Alkylation enhances biocompatibility and siRNA delivery efficiency of cationic curdlan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**. n.15, v.143, p.118-125, 2020.

EHXIGE, E; BAO, M; BAZARJAV, P; YU, X; XIAO, H; HAN, S; BAIGUDE, H. Silencing of STAT3 via Peptidomimetic LNP-Mediated Systemic Delivery of RNAi Downregulates PD-L1 and Inhibits Melanoma Growth. **Biomolecules**, n.12, v.10, p.285, 2020.

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

GÜVEN, E. Nanotechnology-based drug delivery systems in orthopedics. **Joint Diseases Related Surgery**. v.32, n.1, p:267-273. 2021.

LIU, X; CHEN, L; ZHANG, Y; XIN, X; QI, L; JIN, M; GUAN, Y; GAO, Z; HUANG, W. Enhancing anti-melanoma outcomes in mice using novel chitooligosaccharide nanoparticles loaded with therapeutic survivin-targeted siRNA. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021.

LI, M; WANG, Y; LI, M; WU, X; SETRERRAHMANE, S; XU, H. Integrins as attractive targets for cancer therapeutics. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. n.11, v.9, p.2726-2737, 2021.

NEWTON-BISHOP, J; BISHOP, D. T; HARLAND, M. Melanoma Genomics. **Acta Dermato-Venereologica**. n.3, v.100, p.11, 2020.

OBEID, M. A; ALYAMANI, H; AMAWI, H; ALJABALI, A. A. A; REZIGUE, M; ABDELJABER, S. N; FERRO, V. A. siRNA Delivery to Melanoma Cells with Cationic Niosomes. In: Hargadon, K.M. (eds) Melanoma. **Methods in Molecular Biology**, v. 2265, 2021.

SCHADENDORF, D; FISHER, D. E; GARBE, C; GERSHENWALD, J. E; GROB, J. J; HALPERN, A; HERLYN, M; MARCHETTI, M. A; MCARTHUR, G; RIBAS, A; ROESCH, A; HAUSCHILD, A. Melanoma. **Nature Reviews Diseases Primers**, n.1, v.15003, 2015.

WAINSTEIN, A. J. A; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, n.31, v.3, 2004.

YANG, J; ZHAO, R; FENG, Q; ZHUO, X; WANG, R. Development of a carrier system containing hyaluronic acid and protamine for siRNA delivery in the treatment of melanoma. **Investigational New Drugs**, n.39, v.1, p.66-76, 2021.

ZHANG, X; CAI, A; GAO, Y; ZHANG, Y; DUAN, X; MEN, K. Treatment of Melanoma by Nano-conjugate-Delivered Wee1 siRNA. **Molecular Pharmaceutics**. n.18, v.9, p.3387-3400, 2021.

ZHAO, T; WEI, T; GUO, J; WANG, Y; SHI, X; GUO, S; JIA, X; JIA, H; FENG, Z. PD-1-siRNA delivered by attenuated Salmonella enhances the antimelanoma effect of pimozide. **Cell Death Disease**, n.164, v.10, 2019.