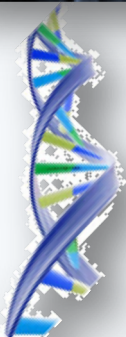
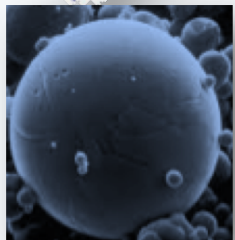
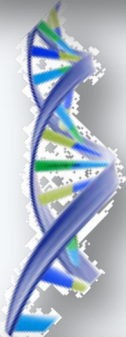
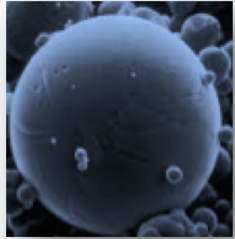


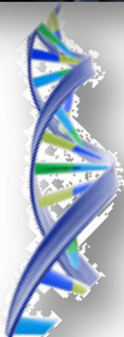
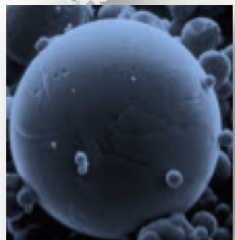
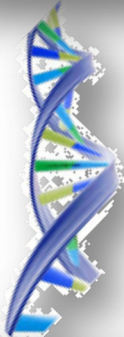
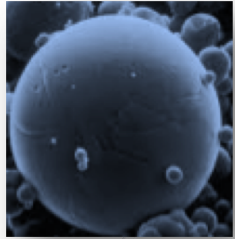
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP

DISCIPLINA DE TERAPIA GÊNICA: SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE GENES

RNA de Interferência na Terapia Gênica

Profa Dra Maria Vitória Lopes Badra Bentley





Terapias para Doenças Genéticas

Terapia de Reposição: administração exógena de proteína deficiente.

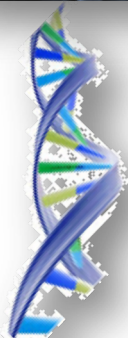
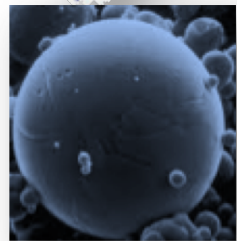
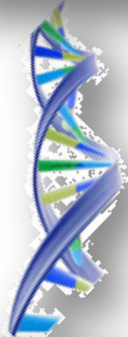
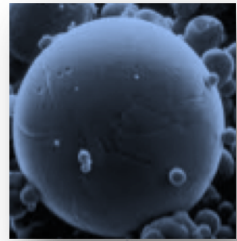
Exemplo: Doença de Pompe – reposição da Enzima alfa glicosidase ácida (GAA).

Terapia Gênica com DNA: Introdução de um gene normal no genoma de um indivíduo para reparar uma mutação que causa uma doença genética.

Exemplo: Câncer, AIDS, Hemofilia B, Artrite Reumatóide

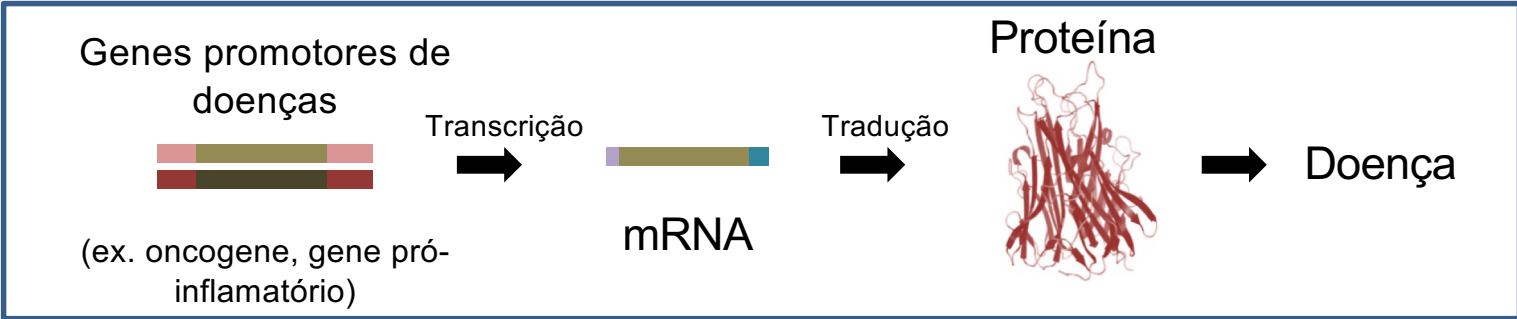
Terapia Gênica com RNA de Interferência: siRNA provoca supressão de genes que estão superexpressos em uma determinada doença através do silenciamento pos-transcricional.

Exemplo: Câncer, Psoríase, Dermatite Atópica



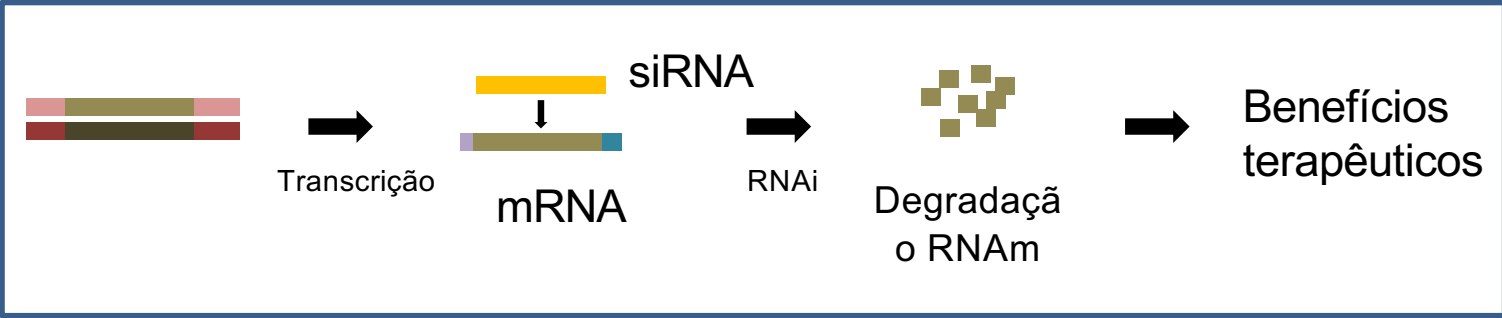
Interferência de RNA (RNAi)

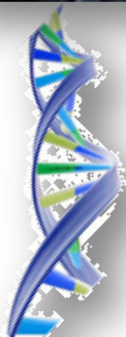
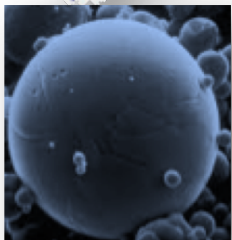
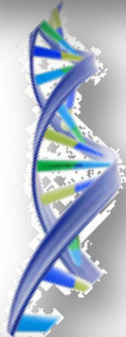
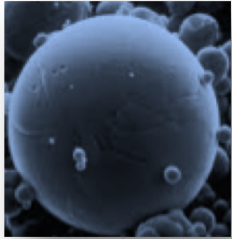
Genes são alvos importantes para o tratamento de doenças (ausência da codificação ou codificação em excesso, codificação de proteínas anormais, aumento da susceptibilidade a agentes externos).



RNAi

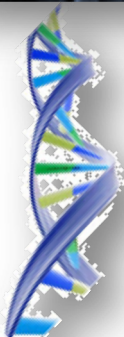
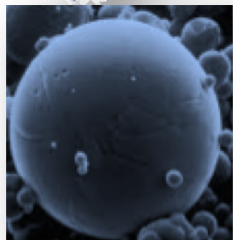
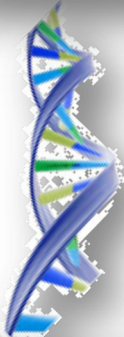
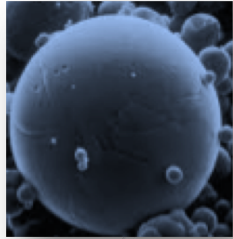
- Processo de silenciamento gênico pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene.





Small interfering RNA (siRNA)

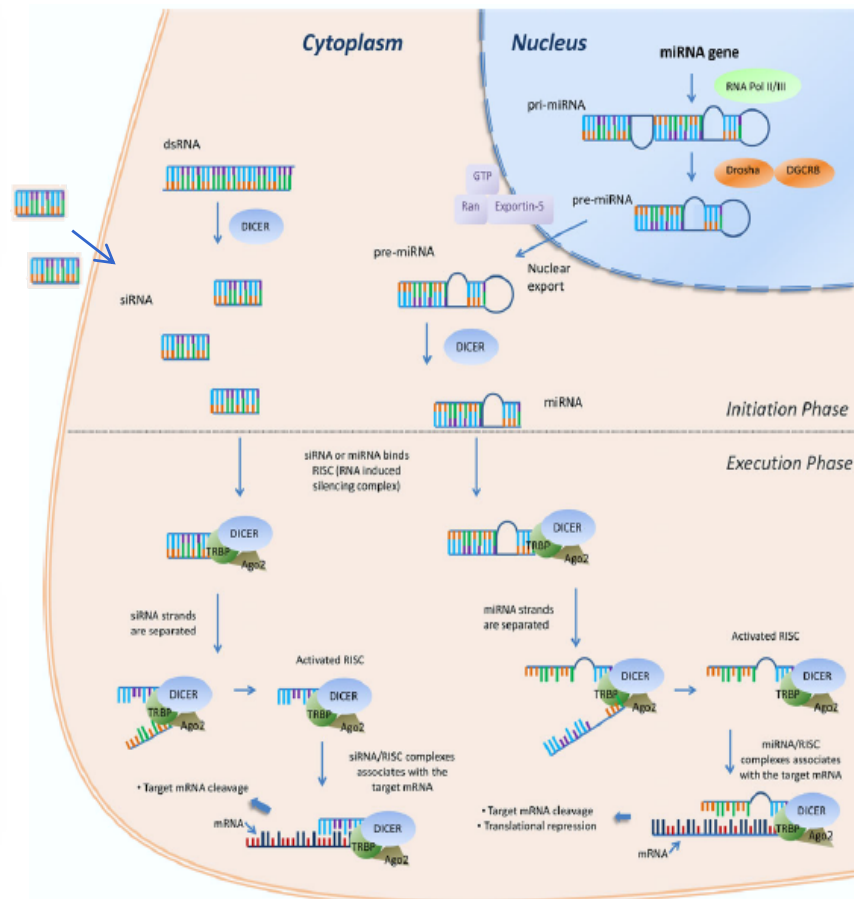
- RNA interferente de cadeia dupla (siRNA) induz o silenciamento de genes pós-transcricional, específico da sequência.
- O siRNA é uma nova abordagem para o tratamento de doenças graves e crônicas.
- O RNAi pode ser alcançado através da entrega de siRNAs sintetizados quimicamente ou da expressão endógena de small hairpin RNA, siRNA e microRNA (miRNA).
- O efeito está no citoplasma. Não precisa entrar no núcleo.



Como funciona a RNAi?

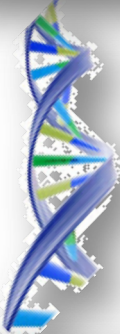
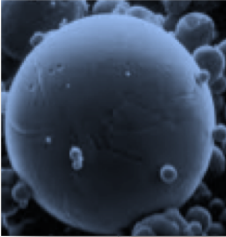
RNAi

Silenciamento gênico pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um gene específico.



- ✓ Ferramenta de pesquisa da função de genes;
- ✓ Identificação de potenciais genes causadores de doenças,
- ✓ Grande promessa terapêutica para o silenciamento de genes causadores de doenças.

Desafios para administração de siRNAs



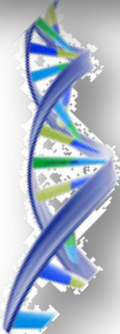
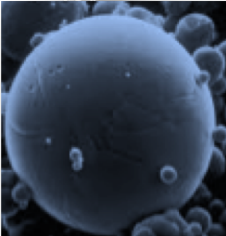
Características físico-químicas da molécula de siRNA

Macromolécula hidrofílica

Elevado peso molecular (~13 kDa)

Carga negativa

Baixa estabilidade em fluidos biológicos



Barreiras inerentes à via de administração

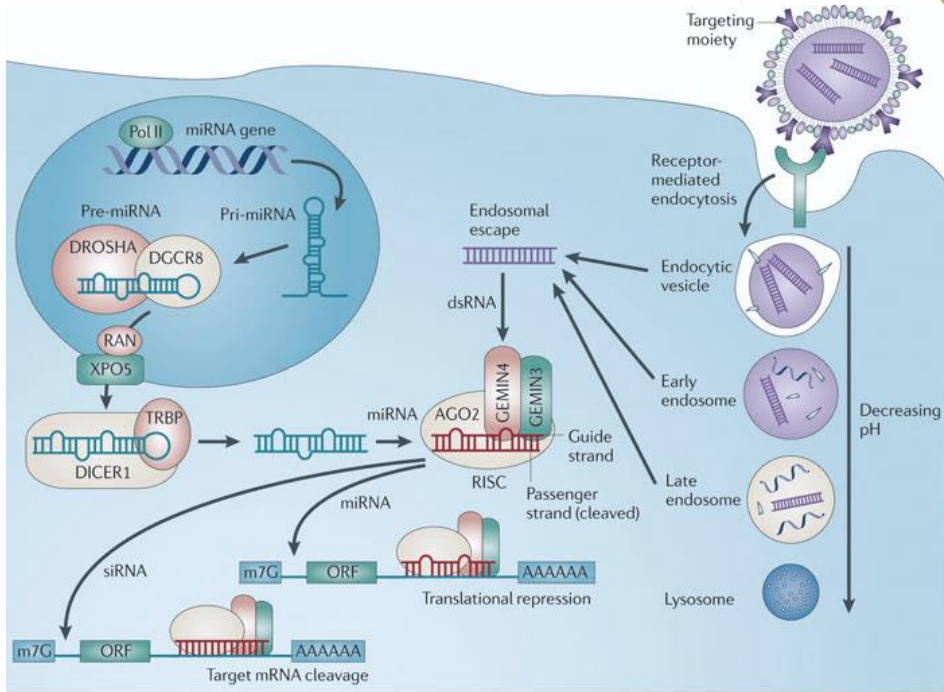
Penetração no tecido

Nucleases intersticiais

Internalização pelas células alvo

Ativação da resposta imunológica

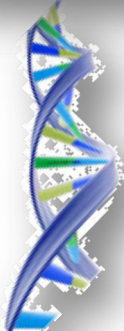
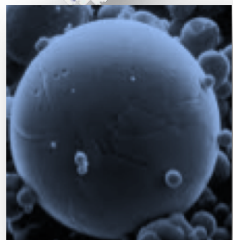
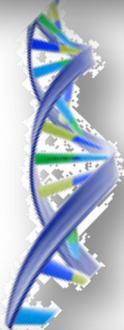
Sistema carreador ideal para siRNA



Nature Reviews | Cancer

- **Ultrapassar a barreiras da via de administração**
- **Proteger o siRNA da degradação enzimática**
- **Facilitar a internalização celular**
- **Promover o escape endossomal**
- **Liberar as moléculas de siRNA intactas no citoplasma celular**
- **Não causar resposta imunológica**

Pecot *et al.*, Nat. Rev. Cancer. 11 (2011) 59–67.
 Reischl and Zimmer, Nanomedicine. 5 (2009) 8–20.
 Foldvari *et al.*, J. Control. Release. (2015).



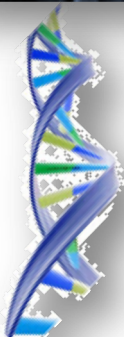
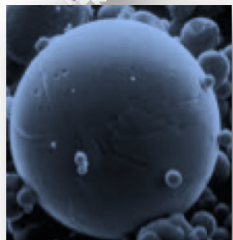
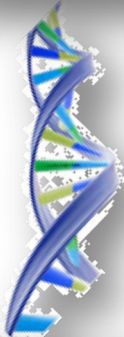
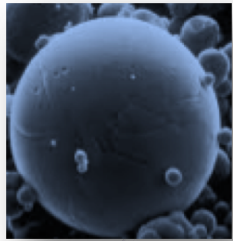
Vetores para siRNA

Naked – baixa atividade

Vetores Virais

- Retrovirus
- Adenovirus
- Adenovirus associado
- Lentivirus
- Variola virus
- Herpes virus

Excelente Transfecção X Questões de Segurança

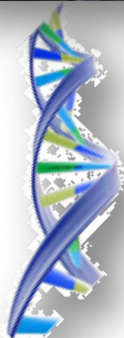
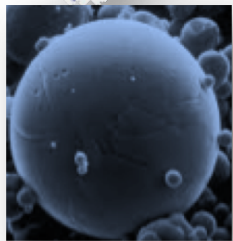
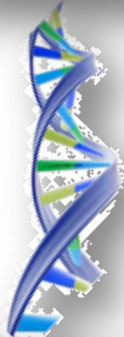
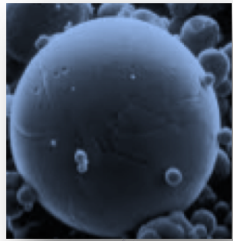


Vetores para siRNA

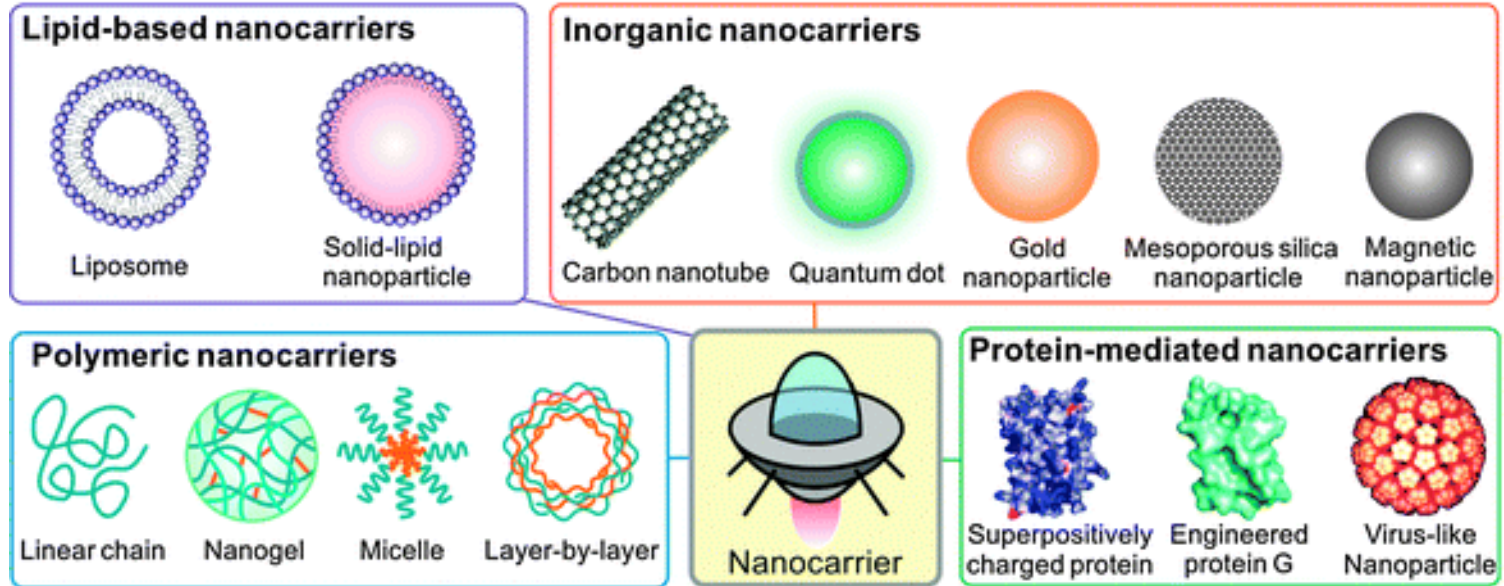
Vetores não virais

- Poliplexos
- Lipoplexos
- Nanopartículas poliméricas
- Nanopartículas lipídicas
- Lipossomas
- Nanocarreadores multifuncionais

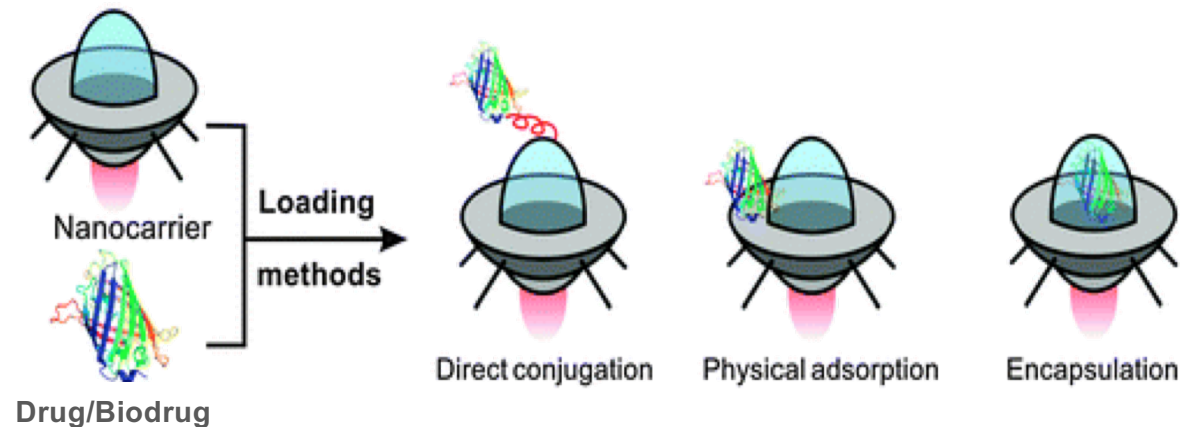
- Abilidade para carrear altas concentrações de material genético
- Liberação sustentada
- Possibilidade de liberação em células específicas
- Segurança: sem riscos de infecção, mutagênese ou reações imunogênicas
- Possibilidade de escalonamento

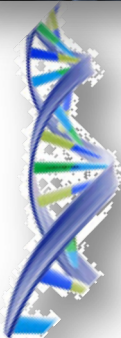
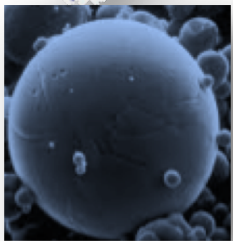
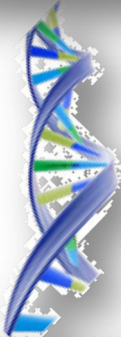
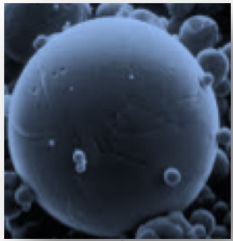


Vetores para siRNA

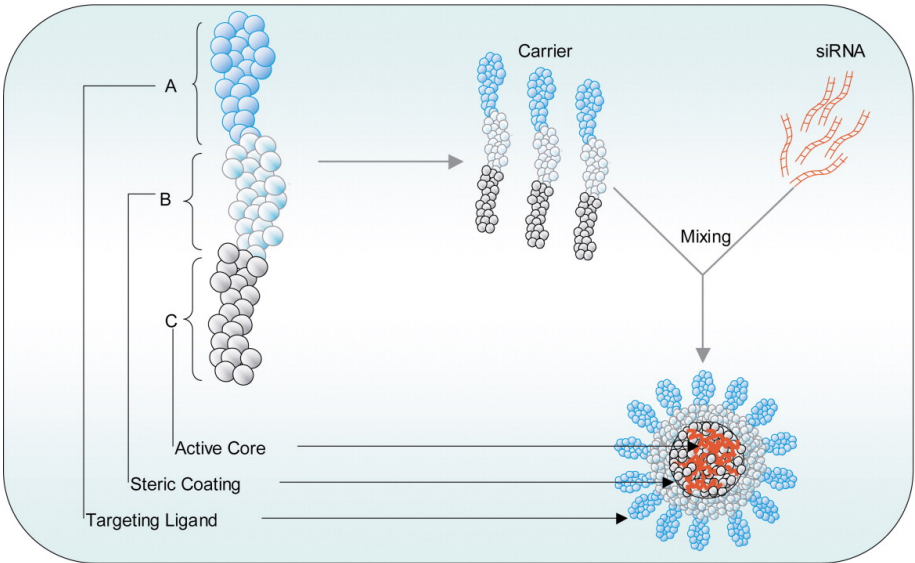
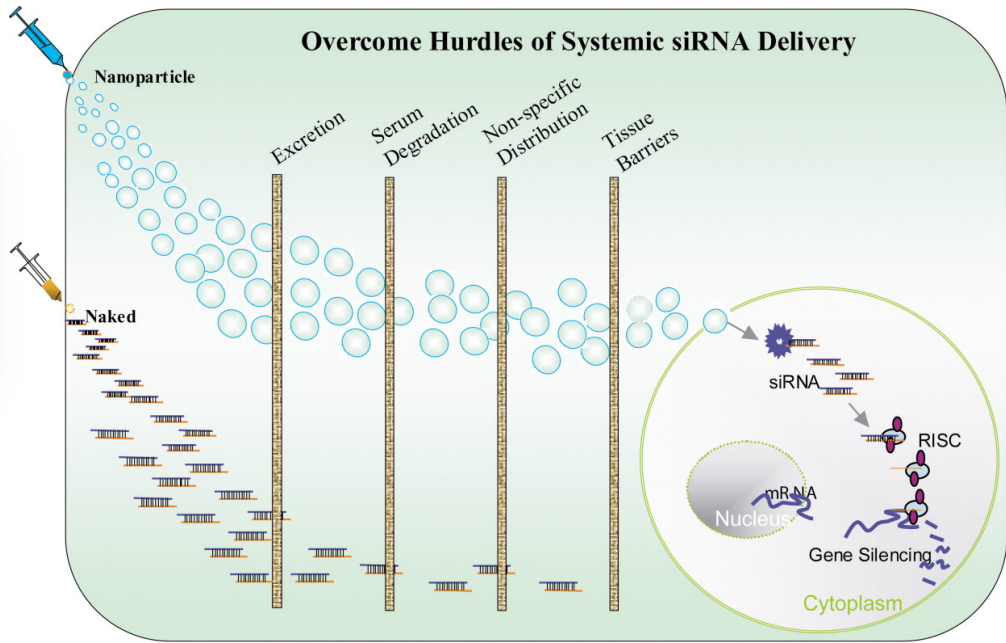


Como o siRNA pode ser incorporado aos nanocarreadores



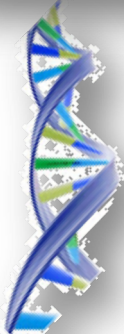
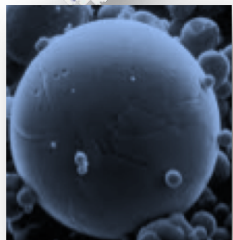
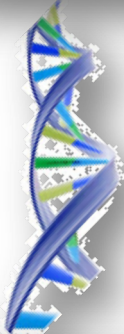


Vetores para siRNA



Materials Today, v. 8, n. 8, p. 34-41, 2005

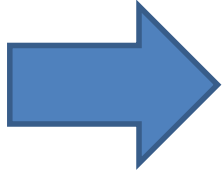
Vetores para siRNA



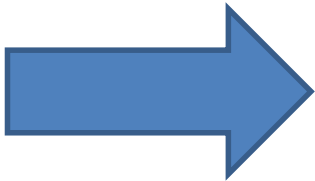
Molécula (+)

siRNA (-)

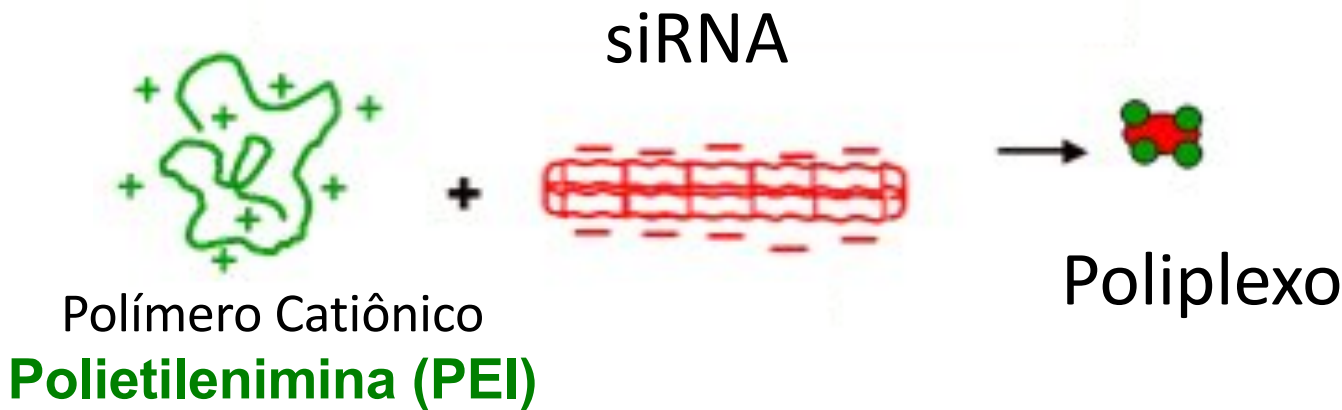
Complexo (+)

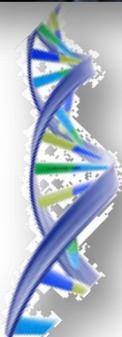
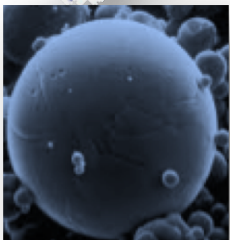
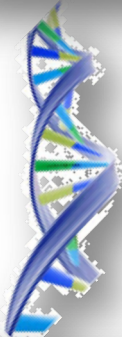
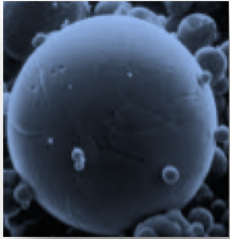


Polímero
 Peptídeo
 Lipídio



Lipoplexos
 Poliplexos



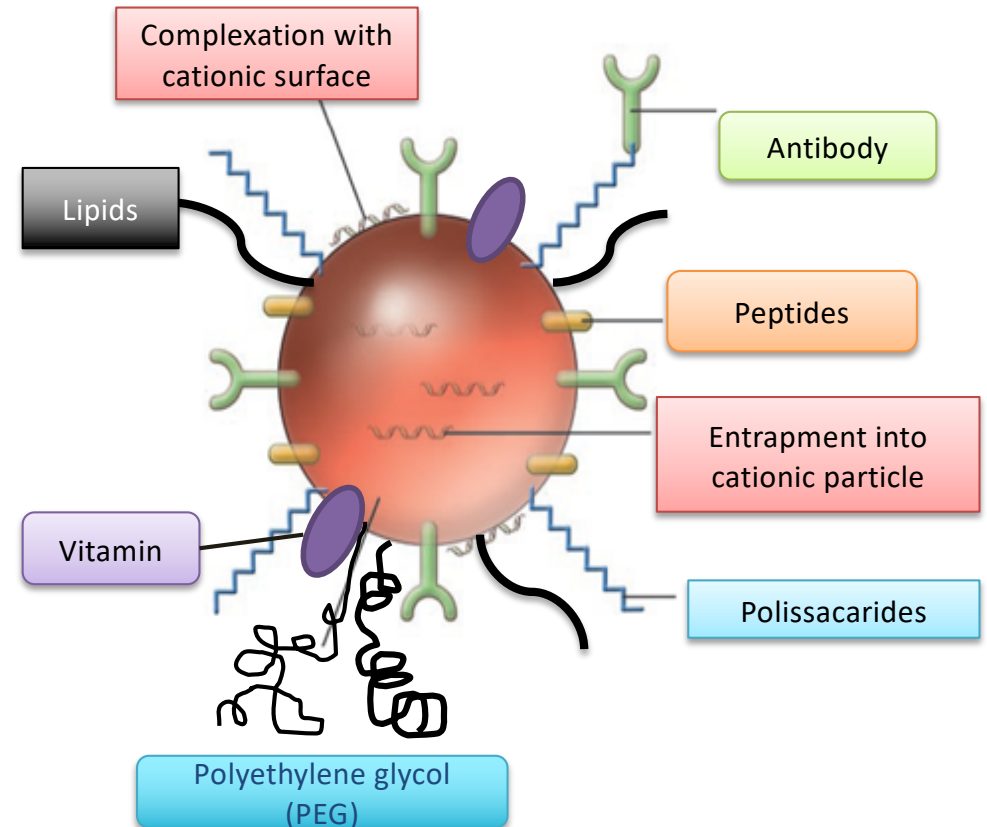


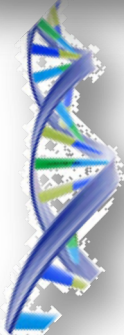
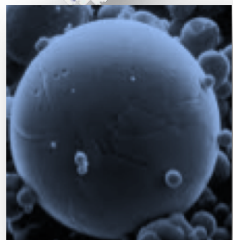
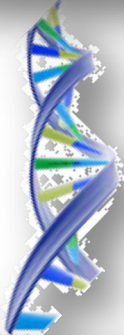
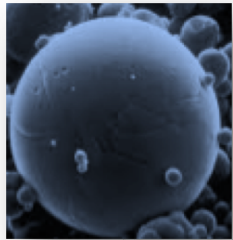
Vetores para siRNA

Nanocarreadores Multifuncionais

Targeted drug delivery

- Nanopartículas contendo drogas são revestidas com agentes de direcionamento (por exemplo, anticorpos conjugados)
- - As nanopartículas circulam pelos vasos sanguíneos e atingem as células-alvo
- - Drogas são liberadas diretamente nas células alvo





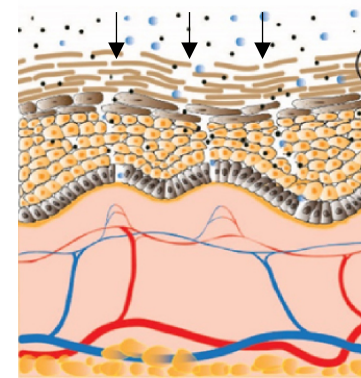
Administração tópica de siRNAs

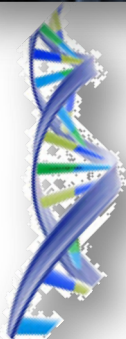
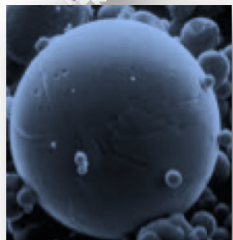
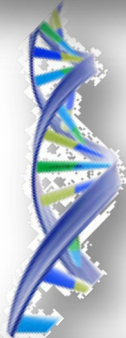
Várias doenças acometem a pele as quais, coletivamente, representam um grande problema de saúde pública

Psoríase
Dermatite atópica
Vitiligo
Câncer
Feridas
Queimaduras

Vantagens da aplicação tópica de siRNAs

- Entrega no tecido alvo
- Grande área superficial para aplicação de fármacos
- Monitorar facilmente o progresso da doença e ajustar o tratamento
- Aplicação não invasiva
- Possibilidade de entrega sustentada e controlada
- Evitar trato GI
- Limitada toxicidade sistêmica
- Limitado clearance
- Fácil administração

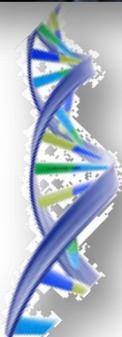
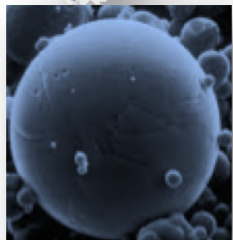
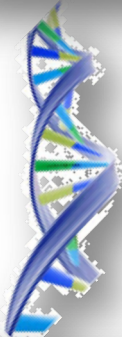
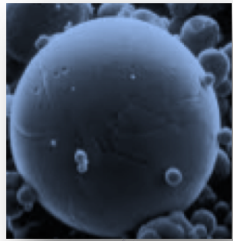




Administração tópica de siRNAs

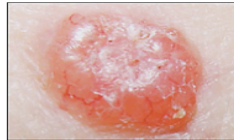
Estudos in vitro e in vivo que utilizaram a pele como via de administração para siRNA

Autores	Doença
Tran, M. A. et al., 2008	Melanoma
Takanashi, M. et al., 2009	Artrite reumatóide
Thanik, V. D. et al., 2007	Feridas
Ritprajak, P. et al., 2008	Dermatite atópica
Nakamura, M. et al., 2008	Alopécia
Jakobsen, M. et al., 2009	Psoríase



Nossa Contribuição da Terapia com siRNA para doenças cutâneas

Alvos Terapêuticos



Skin cancer
2 - 3 million non-melanoma cancers, and 132,000 melanomas / year worldwide

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a tyrosine kinase, where activation has been associated with tumor cell proliferation, tumor metastasis and angiogenesis. Blocking this pathway through specific siRNA (EGFRsiRNA) can induce the process of apoptosis in mutated cells and thus reduce the chances of cancer progression.



Psoriasis
Autoimmune disease - 2% of world population

In this disease, tumor necrosis factor, TNF- α , a proinflammatory cytokine that is overexpressed in lesions from psoriasis, represents an excellent target for the treatment of this pathology. Blocking production of these substances by specific siRNA (siRNA-TNF- α) can reduce the psoriatic process, minimizing the symptoms of the disease.



Vitiligo
Autoimmune disease - 1-2% of world population

An autoimmune disease, the destruction of melanocytes by autoantibodies of the patient, with direct attack these cells by cytotoxic T lymphocytes. TRP-1 gene, tyrosinase-related protein 1, expresses a membrane protein which acts as a specific target for autoantibodies in patients with vitiligo. The silencing of the expression of this gene by specific siRNA (siRNA-TRP-1) can decrease the attack of antibodies, improving the symptoms of the disease.

Psoríase

- Doença inflamatória crônica, imunomediada, que se manifesta na pele e/ou articulações e afeta 2-5% da população mundial;
- Doença etiológica multifatorial, na qual fatores genéticos e influências ambientais levam a uma disfunção imunocelular, responsável pelo quadro inflamatório característico.

SINTOMAS MAIS COMUNS

- PELE COM PLACAS E AVERMELHADA
- DESCAMAÇÃO
- COCEIRA
- DOR

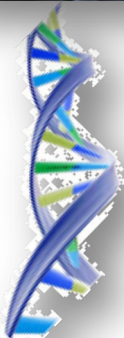
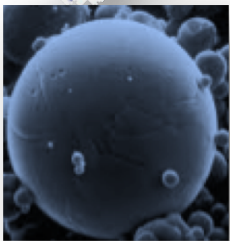
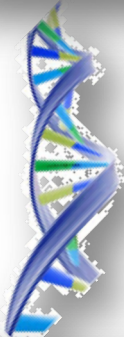
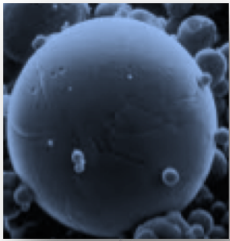
COMORBIDADES

- DEPRESSÃO
- DIABETES
- ATRITE PSORIÁSICA
- DOENÇAS CARDÍACAS

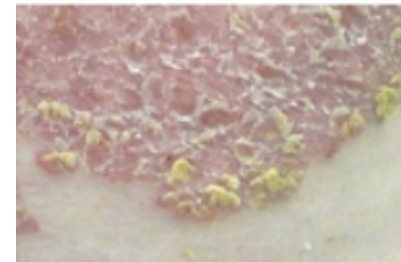
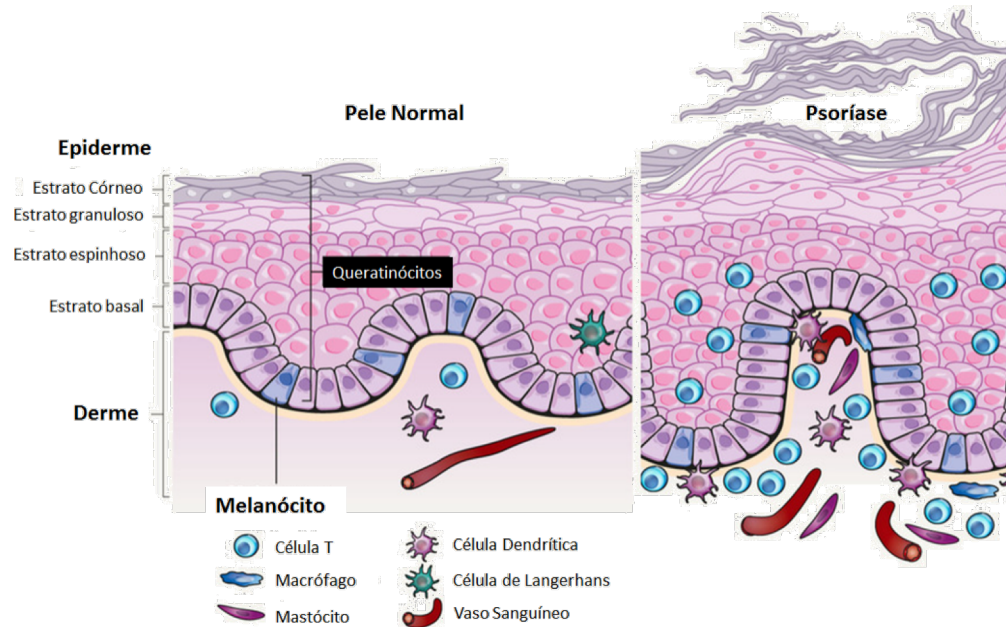
IMPACTOS NA QUALIDADE DE VIDA

Os impactos da psoríase na qualidade de vida dos pacientes são similares aos de doenças como câncer, ataque cardíaco, artrite, diabetes tipo 2 e depressão. Pessoas com formas mais severas de psoríase têm redução significativa de expectativa de vida.

- 75%** não se sentem ATRATIVOS⁶
- 54%** têm DEPRESSÃO⁶
- 31%** têm PROBLEMAS FINANCEIROS⁶
- 56%** dizem que afeta o que VESTEM⁹
- 77%** dos pacientes com psoríase dizem que a doença é um PROBLEMA ou um PROBLEMA SIGNIFICATIVO em seu dia a dia⁹
- 27%** dizem que leva a DIFICULDADES SEXUAIS⁹

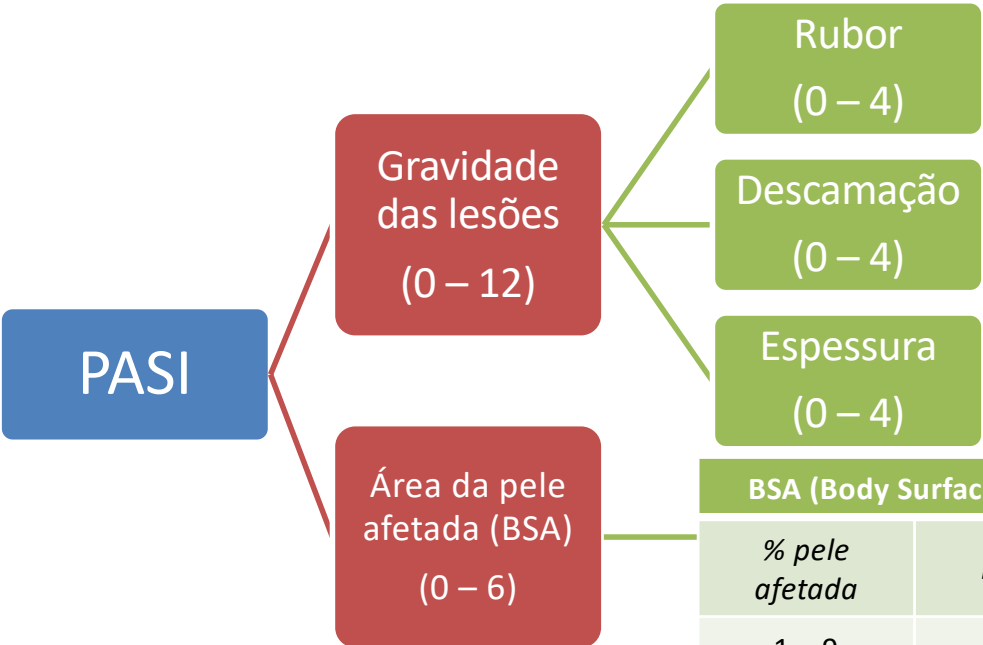
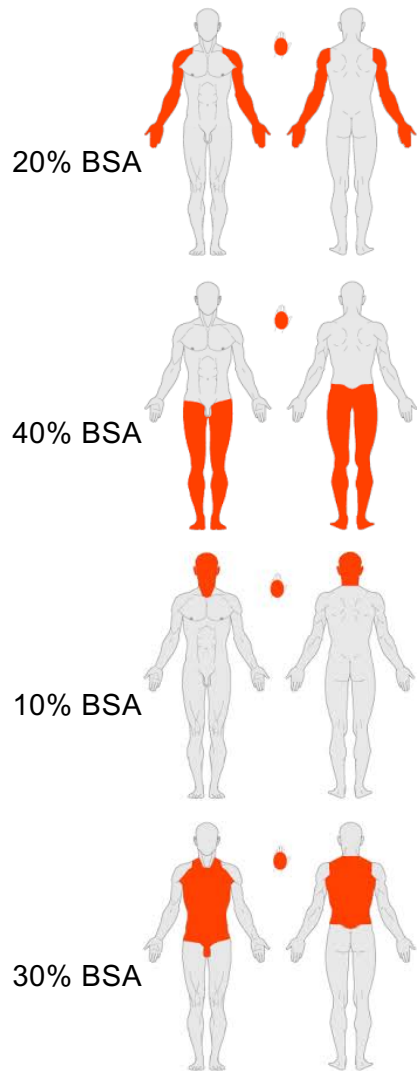


Psoríase



Na pele, caracteriza-se por placas eritematosas, queratinócitos hiperproliferados e com diferenciação anormal, levando a hiperplasia da epiderme, infiltração de linfócitos T ativados e dilatação dos capilares sanguíneos

Índice da Área e Severidade da Psoríase (PASI)



Gravidade das lesões	
Gravidade	Escala
Ausente	0
Leve	1
Moderado	2
Intenso	3
Muito intenso	4

BSA (Body Surface Area)	
% pele afetada	Escala
1 – 9	1
10 – 29	2
30 – 49	3
50 – 69	4
70 – 89	5
90 – 100	6

Classificação	PASI
Leve	< 7
Moderada	7 a 12
Severa	> 12

➔ Escolha terapêutica

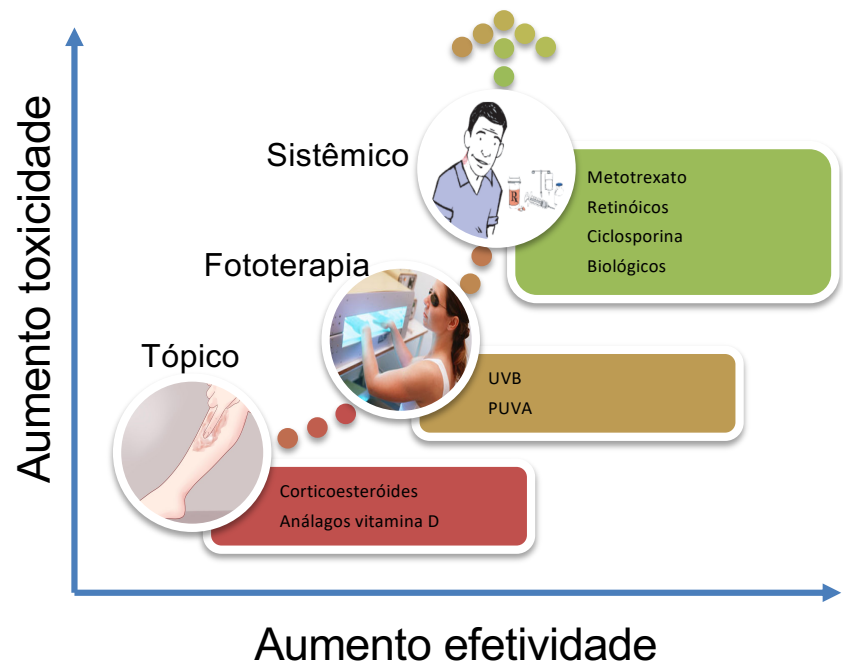
Lívia Depieri, 2016

Psoríase - Tratamentos

Ministério da Saúde – Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas – Portaria n. 1229, 5 de novembro de 2013

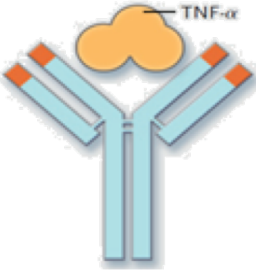


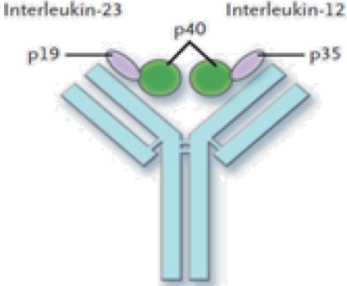
Leve	Moderada a severa
<ul style="list-style-type: none"> Hidratação 	<ul style="list-style-type: none"> Tratamento tópico
<ul style="list-style-type: none"> Corticoesteróides 	<ul style="list-style-type: none"> Fototerapia (radiação UVB e PUVA)
<ul style="list-style-type: none"> Análogos vitamina D 	<ul style="list-style-type: none"> Tratamento sistêmico (metotrexato, acitretina, ciclosporina)

- Eficaz como terapia de curto prazo, devido ao perfil de segurança desses fármacos, seu uso por um longo prazo é limitado,
- Como a psoríase é uma doença crônica com recidivas e remissões, os tratamentos devem ser alternados com o objetivo de reduzir possíveis efeitos adversos.



Psoríase - Tratamentos

Terapia Biológica

Estratégia anti-citocinas			
Anti-TNF			Anti-IL-12 e IL-23
			
Infliximabe (Remicade®) Anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF-α	Adalimumabe (Humira®) Anticorpo monoclonal humano anti-TNF-α	Etanercepte (Enbrel®) Proteína de fusão	Ustequinumabe (Stelara®) Anticorpo monoclonal humano anti-p-40

- Via de administração
- Propriedades imunossupressoras
- Alto custo

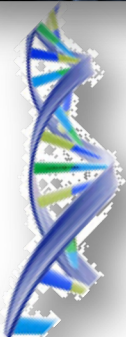
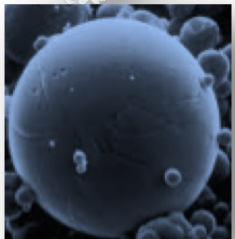
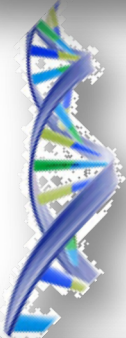
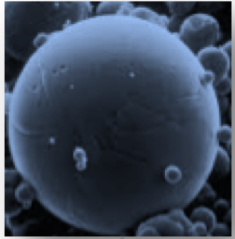
Adalimumab (40 mg, 2 seringas) – R\$8.000,00
 Dose inicial: 80 mg, seguida de doses de 40 mg em semanas alternadas

- 2016 – Secuquinumabe (Cosetyx®) – Anti-IL17

FALHA TERAPÊUTICA



Não há cura para a psoríase e até **78%** dos pacientes manifestam satisfação baixa a moderada com seus tratamentos. Isso indica que existem necessidades ainda não atendidas por terapias que possam agir de forma mais rápida e prolongada no alívio dos **sintomas da psoríase**.



Desafios para administração tópica de siRNAs

Pele saudável



Epiderme

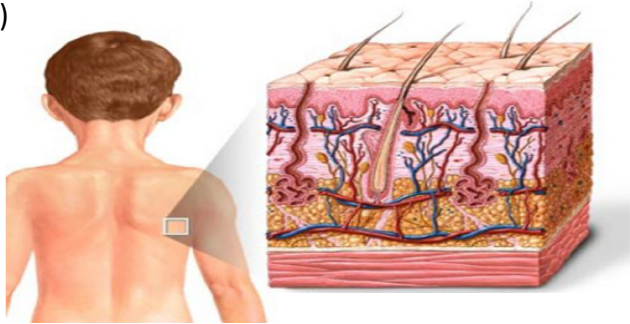
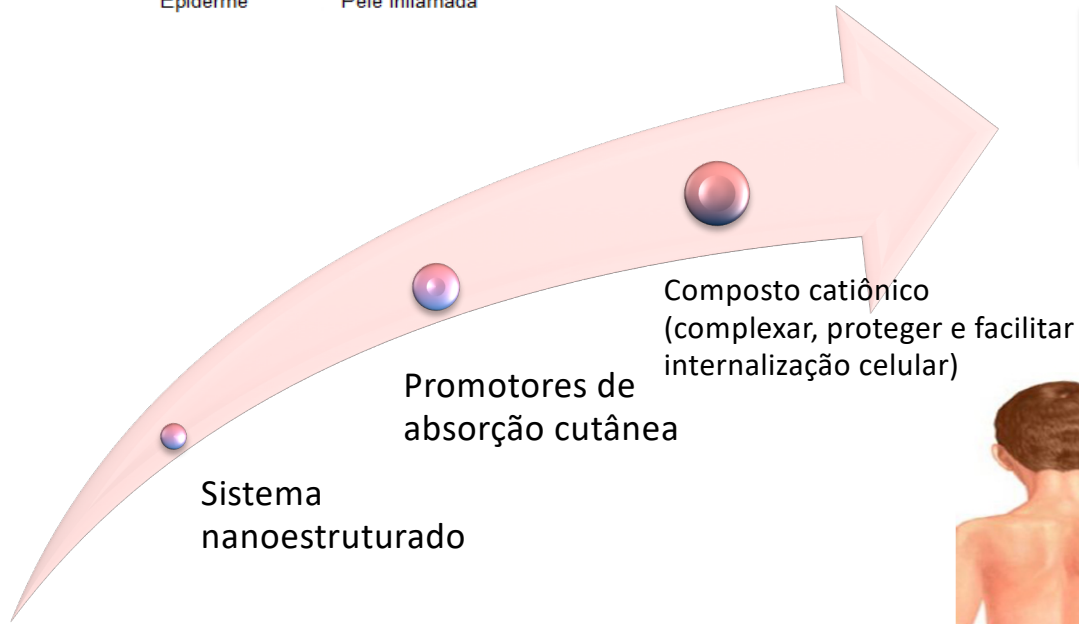
Psoríase

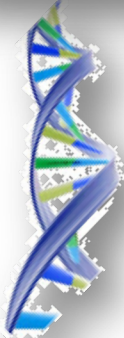
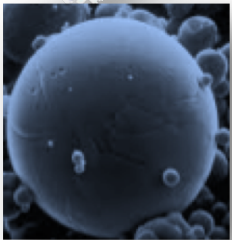
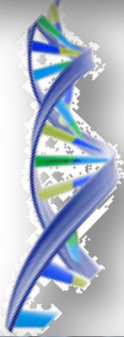
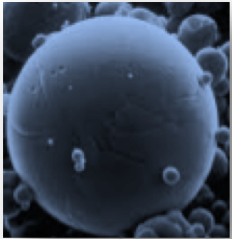


Pele inflamada

O primeiro desafio é a penetração de macromoléculas na pele.

Sistema de liberação tópico





Composto catiônico

(complexar, proteger, facilitar internalização celular)

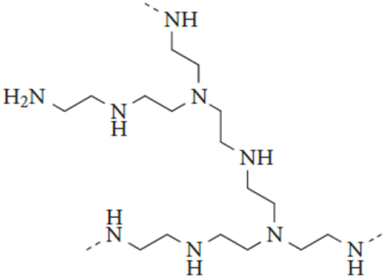
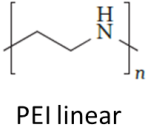
siRNAs
carga - em pH fisiológico



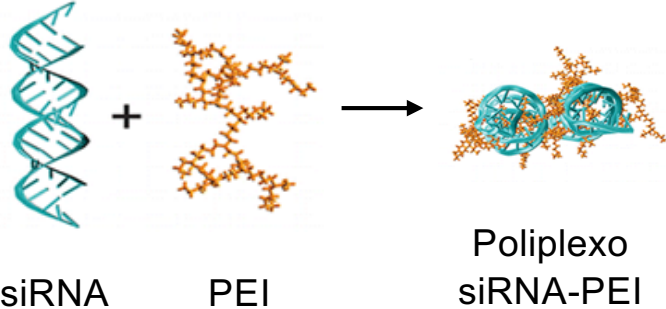
- Polímeros catiônicos;
- Lipídios catiônicos;
- Proteínas e peptídeos catiônicos.

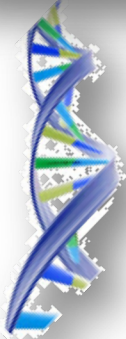
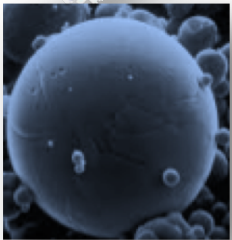
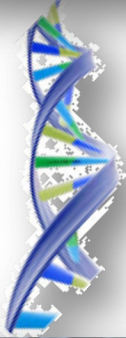
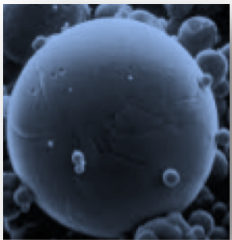


Estrutura molecular da oleilamina (OAM).
(Martini *et al.*, 2008).

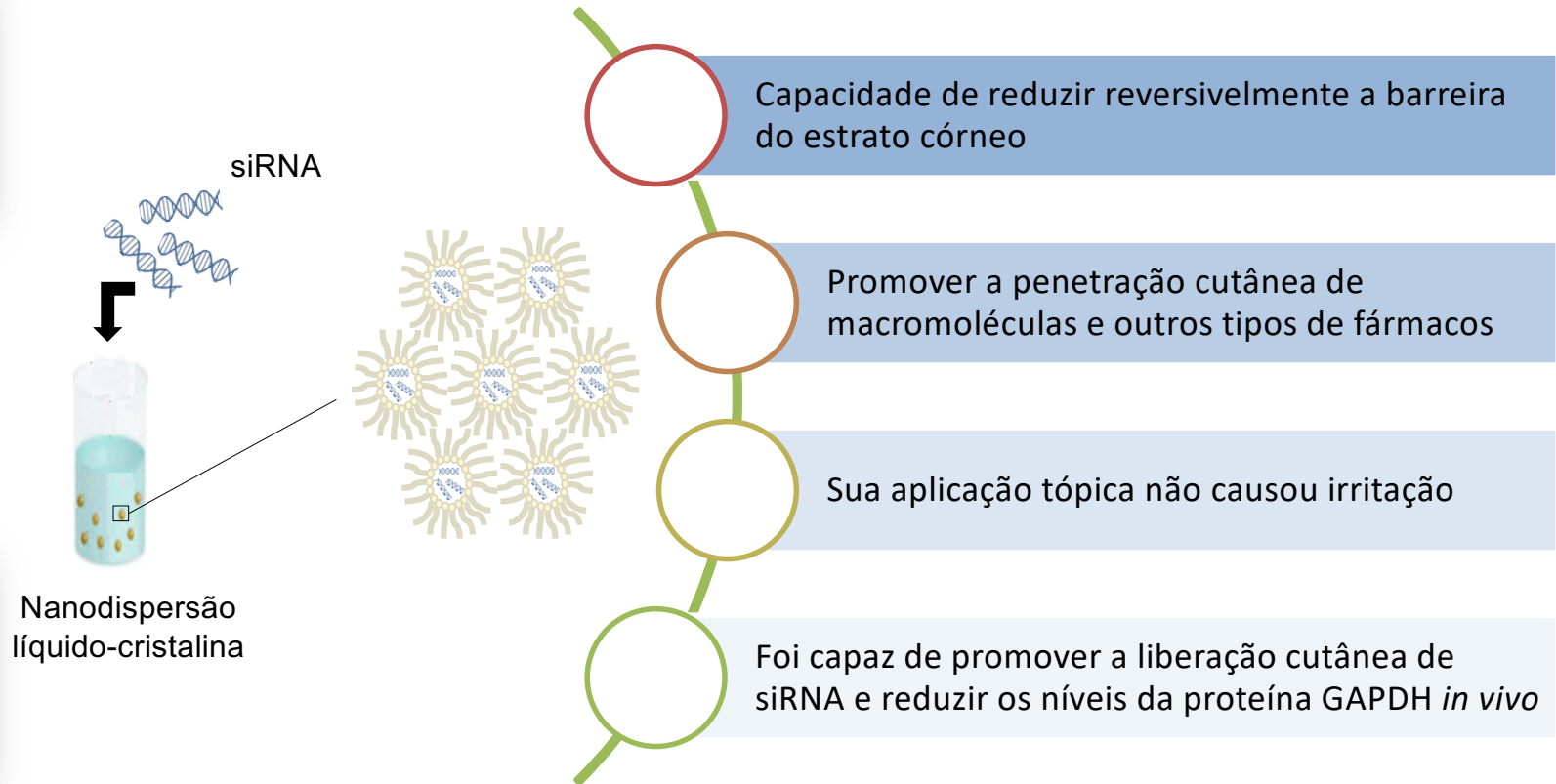


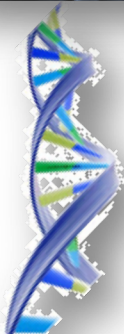
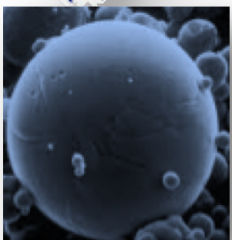
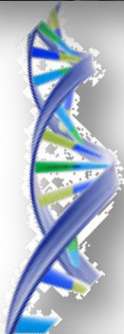
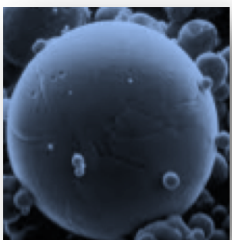
Estrutura molecular da polietilenoimina (PEI).
(Yin *et al.*, 2014).





Nanodispersões líquido-cristalinas como sistema de administração tópica de siRNAs





Caracterização das NLCs

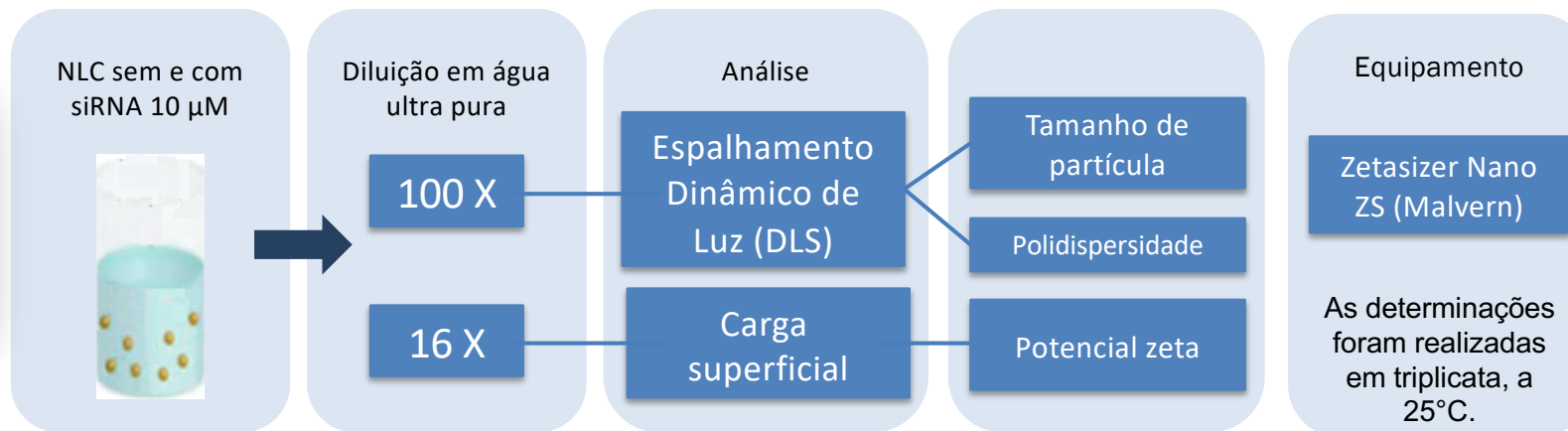
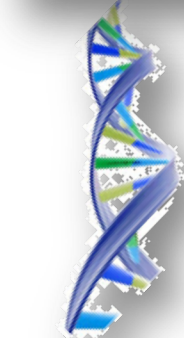
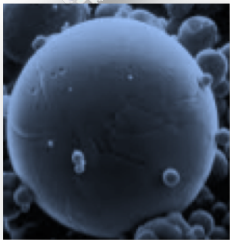
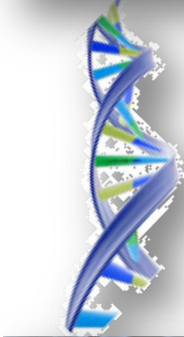
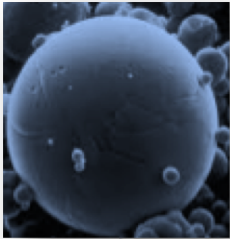


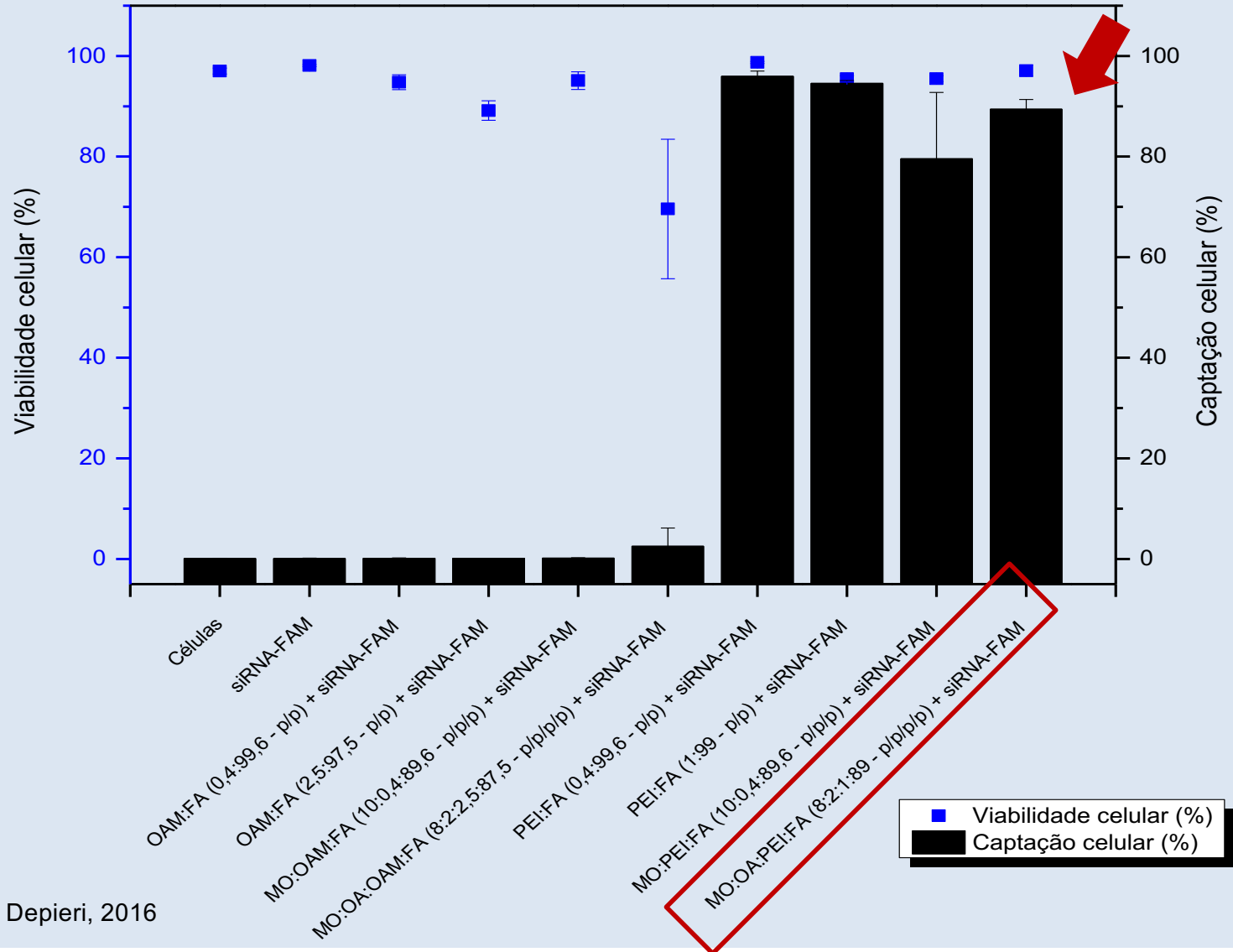
Tabela 1: Tamanho de partícula, polidispersidade e potencial zeta das NLCs preparadas com PEI ou OAM, sem e com siRNA 10 µM.

FORMULAÇÃO	Sem siRNA			Com siRNA 10 µM		
	Tamanho de partícula (nm)	Polidispersidade	Potencial Zeta (mV)	Tamanho de partícula (nm)	Polidispersidade	Potencial Zeta (mV)
MO:PEI:FA 10:0,4:89,6 (p/p/p)	150 ± 6	0,14 ± 0,02	4,2 ± 0,4	161 ± 21	0,19 ± 0,08	1,5 ± 1,9
MO:AO:PEI:FA 8:2:1:89 (p/p/p/p)	203 ± 5	0,26 ± 0,02	1,2 ± 0,7	215 ± 8	0,27 ± 0,02	0,7 ± 1,0
MO:OAM:FA 10:0,4:89,6 (p/p/p)	196 ± 32	0,31 ± 0,07	29,3 ± 3,7	145 ± 11	0,19 ± 0,01	24,8 ± 6,0
MO:AO:OAM:FA 8:2:2,5:87,5 (p/p/p/p)	231 ± 58	0,37 ± 0,09	2,1 ± 3,2	240 ± 54	0,42 ± 0,04	11,7 ± 2,0

As amostras foram diluídas em água ultra pura e as medidas foram realizadas a 25° C. Os resultados são expressos pela média ± desvio padrão. (n=3-5)

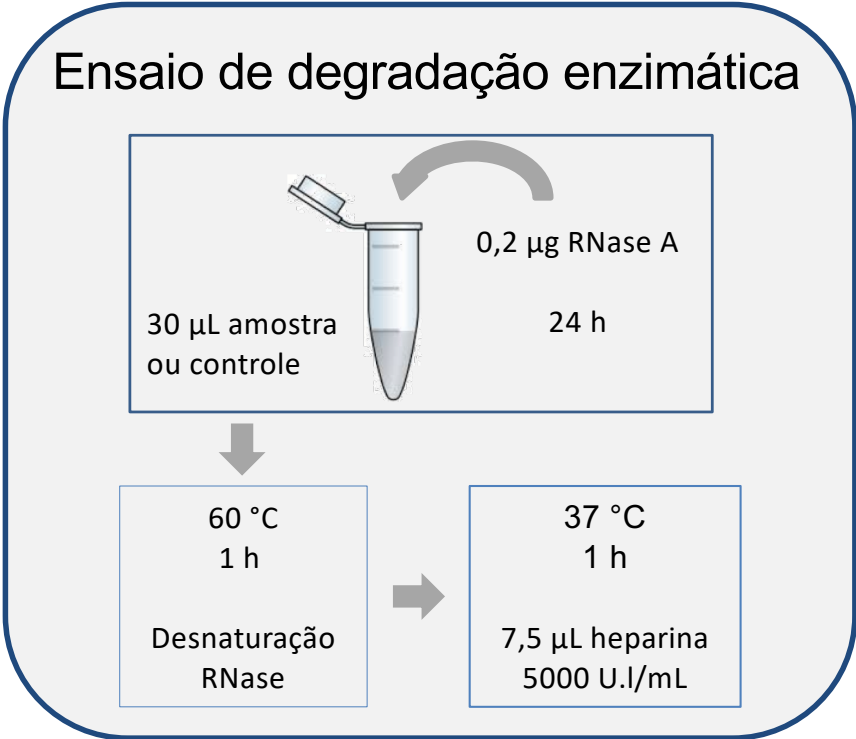
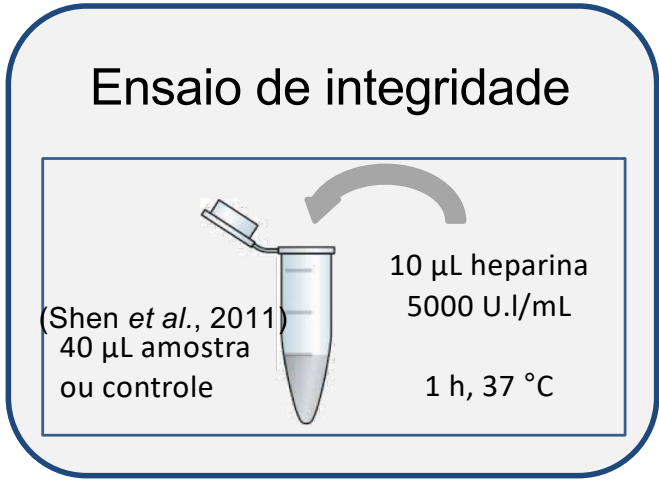


Avaliação da captação celular do siRNA veiculado pelas NLCs em fibroblastos por citometria de fluxo

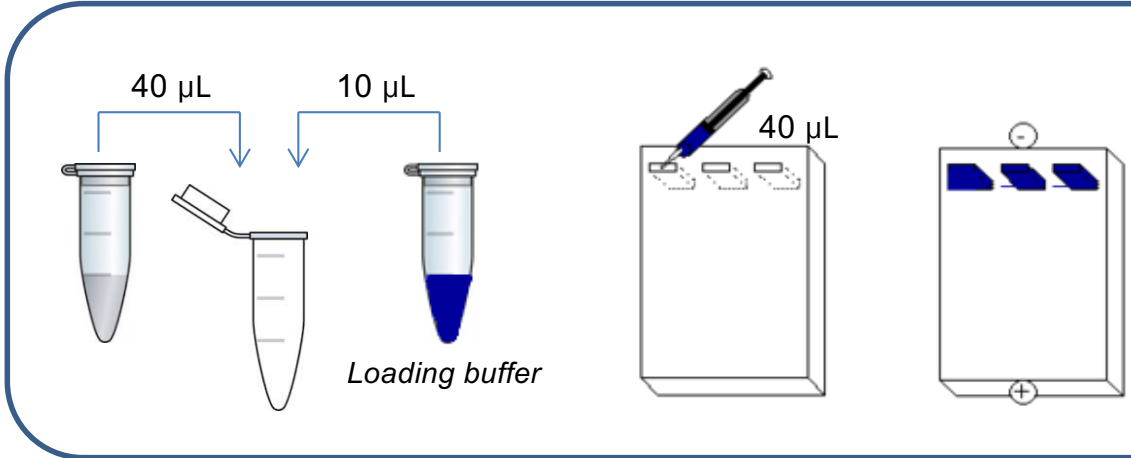


Lívia Depieri, 2016

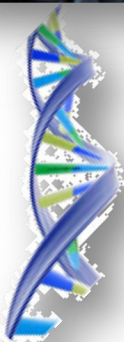
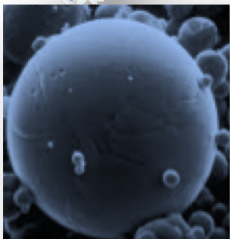
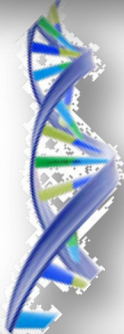
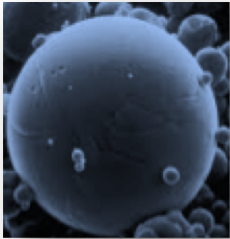
Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA



-
- Amostra:**
 NLC + siRNA 10 µM
-
- Controles:**
 siRNA livre 10 µM
 NLCs sem siRNA
-

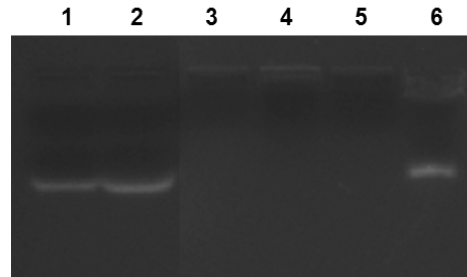


-
- ### Eletroforese – Gel agarose 2%
-
- Tampão Tris-Acetato-EDTA pH=8,0 (TAE)
- Brometo de etídeo (10 mg/mL)
-
- Corridas: voltagem de 100 V, 20 min
-
- Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta
-



Avaliação da estabilidade do complexo NLC/siRNA

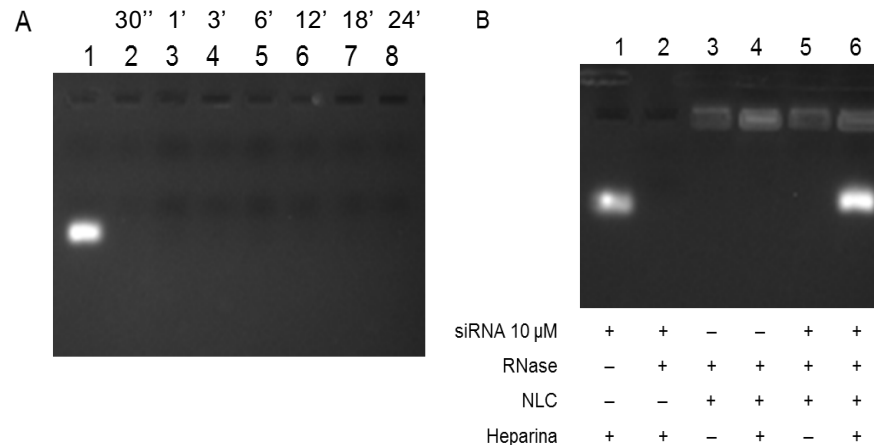
• Ensaio de integridade



siRNA 10 µM	+	+	-	-	+	+
Heparina	-	+	-	+	-	+
NLC	-	-	+	+	+	+

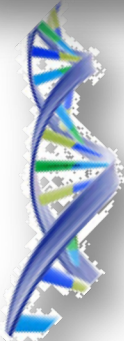
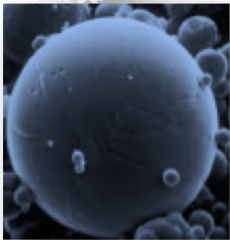
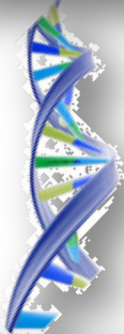
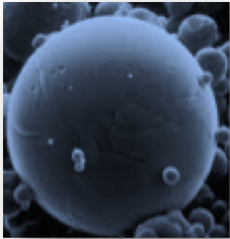
Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da eficiência de complexação e integridade do siRNA na NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) por meio do ensaio de competição com poliânion.

• Ensaio de degradação enzimática





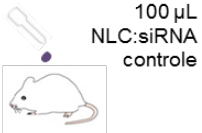
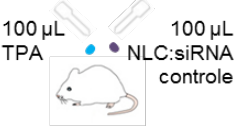
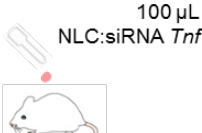
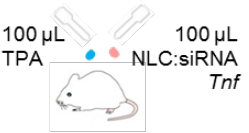


siRNA 10 µM	+	+	-	-	+	+
RNase	-	+	+	+	+	+
NLC	-	-	+	+	+	+
Heparina	+	+	-	+	-	+

Ensaio de eletroforese em gel de agarose para avaliação da estabilidade do siRNA em presença de RNase. [A] siRNA livre e em presença de RNase (2 µg) em função do tempo; [B] Avaliação da habilidade da NLC em proteger o siRNA da degradação enzimática.



Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de inflamação aguda

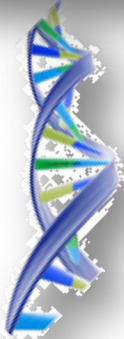
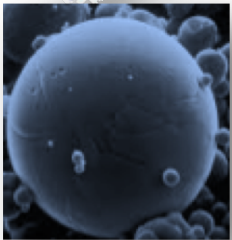
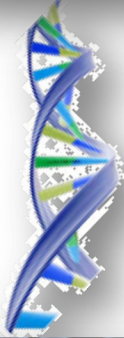
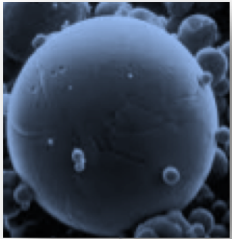
Protocolo experimental			
Grupos	Tempo 0 h	Tempo 1 h	Tempo 7 h
(1) Controle (sem tratamento)			<ul style="list-style-type: none"> ✓ Tecidos foram processados; ✓ RNA foi extraído usando RNeasy Mini kit; ✓ Os níveis do RNAm <i>Tnf</i> foram avaliados por qRT-PCR.
(2) TPA (100 µg/mL em acetona)			
(3) NLC:siRNA controle (siRNA 10 µM)			
(4) NLC:siRNA <i>Tnf</i> (siRNA 10 µM)			

Camundongos sem pêlos

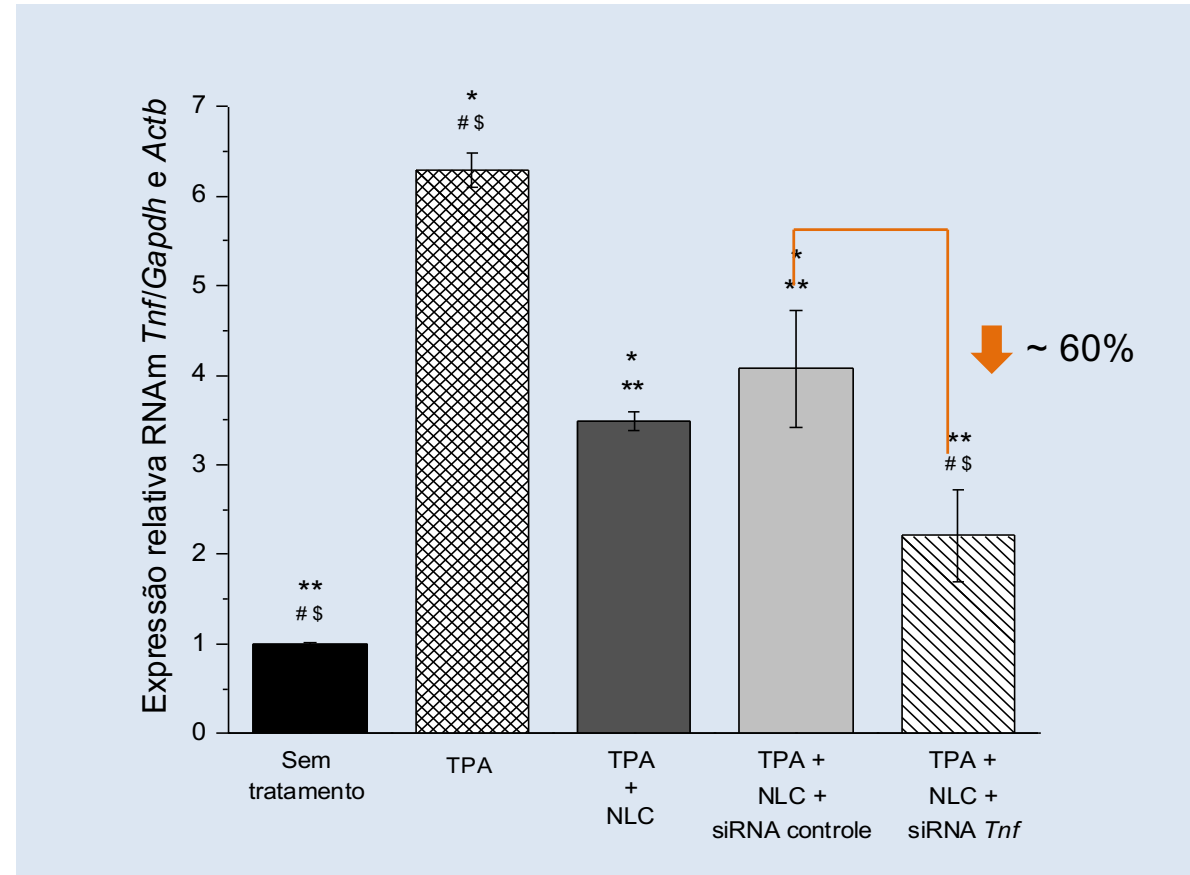
Machos

4-5 animais/grupo

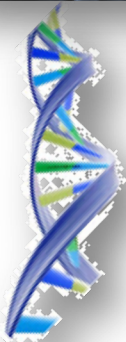
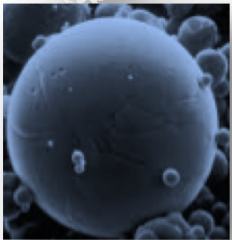
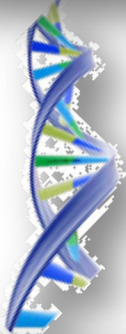
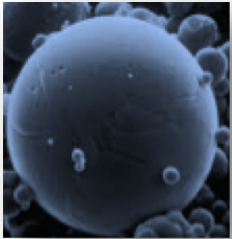
TPA: 12-O-tetradecanoil-forbol 13-acetato



Avaliação da eficácia do silenciamento do *Tnf* em modelo *in vivo* de inflamação aguda



Efeito da NLC composta por MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p) contendo siRNA *Tnf* na normalização do aumento nos níveis do RNAm *Tnf* no modelo *in vivo* de inflamação cutânea aguda induzido por TPA. siRNA na concentração final de 10 μ M. Os resultados representam a média \pm desvio padrão (n = 4/5 animais por grupo). Análise estatística realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$ em relação ao grupo sem tratamento; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo TPA; # $p < 0,05$ em relação ao grupo TPA + NLC e, \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo TPA + NLC + siRNA controle.



Nanodispersões líquido-cristalinas como sistema de administração tópica de siRNAs

Conclusões

✓ NLC foi capaz de complexar, proteger da degradação enzimática e liberar o siRNA íntegro

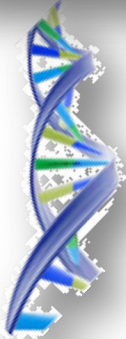
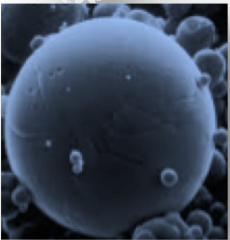
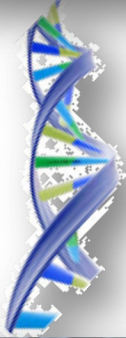
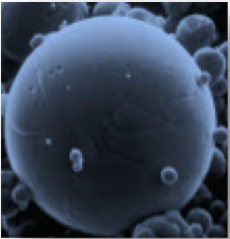
✓ NLC promoveu a captação celular do siRNA em fibroblastos e macrófagos

✓ NLC não causou irritação cutânea

✓ Os siRNAs veiculados pela NLC, eficientemente, silenciaram os genes alvos nos modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados

✓ NLC promoveu a penetração cutânea do siRNA nas camadas mais profundas da pele psoriática

NLC é um sistema de liberação tópico promissor para a liberação funcional de siRNAs para o tratamento de doenças cutâneas. Foi capaz de superar as barreiras da via de administração tópica e as limitações resultantes das características físico-químicas das moléculas de siRNA.



Considerações Finais

A combinação de Nanotecnologia com agentes de ácido nucleico oferece perspectivas substanciais para uma revolução no diagnóstico e tratamento de doenças.

Para novos nanomateriais, técnicas e abordagens de liberação de genes, o principal desafio é equilibrar a eficiência da transfecção, visando a especificidade, tamanho das partículas, biodegradabilidade e citotoxicidade, bem como seus destinos de curto e longo prazo no meio biológico.

A química dos bioconjugados associados à Nanotecnologia permitirá o uso especializado de biomarcadores para pesquisas em biologia celular e molecular, para biossensor, diagnóstico, bioimagem e mascaramento de porções imunogênicas para a distribuição de medicamentos direcionada, incluindo genes.

Nanopartículas poderão viabilizar a liberação de múltiplos siRNA destinados a diferentes alvos, bem como fármacos como proposta de terapia sinérgica para várias doenças.