

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ELIZA ROCHA GOMES

**LIPOSSOMAS FUSOGÊNICOS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO
GLICOEVATROMONOSÍDEO COM AS HIDROXILAS DA GLICOSE
PERACETILADAS: PREPARO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL**

Belo Horizonte

2018

ELIZA ROCHA GOMES

**LIPOSSOMAS FUSOGÊNICOS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO
GLICOEVATROMONOSÍDEO COM AS HIDROXILAS DA GLICOSE
PERACETILADAS: PREPARO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Coorientadores: Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua

Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva

Belo Horizonte

2018

G633I Gomes, Eliza Rocha.
Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas: preparo, caracterização, avaliação do potencial citotóxico e antitumoral / Eliza Rocha Gomes. – 2018.
88 f. : il.

Orientadora: Mônica Cristina de Oliveira.

Coorientador: Rodrigo Maia de Pádua.

Coorientadora: Izabella Thaís da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Câncer – Tratamento – Teses. 2. Lipossomas – Teses. 3. Cardenolídeo – Teses. 4. Citotoxicidade – Teses. 5. Atividade antitumoral – Teses. 6. Agentes antineoplásicos – Teses. I. Oliveira, Mônica Cristina de. II. Pádua, Rodrigo Maia de. III. Silva, Izabella Thaís da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.994



FOLHA DE APROVAÇÃO

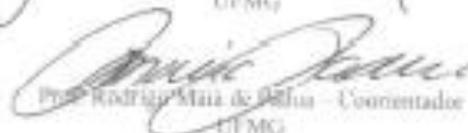
Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas: preparo, caracterização, avaliação da atividade citotóxica e antitumoral

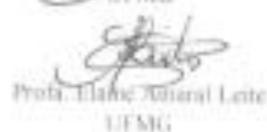
ELIZA ROCHA GOMES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Mônica Cristina de Oliveira - Orientadora
UFMG


Prof. Rodrigo Maia de Sá - Coorientador
UFMG


Prof. Elaine Adiraj Leite
UFMG


Prof. Ricardo José Alves
UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

U.F.M.G.

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA ELIZA ROCHA GOMES

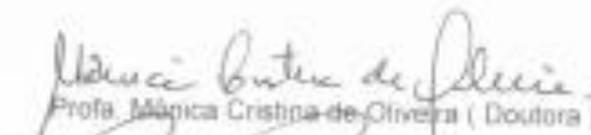
Realizou-se, no dia 21 de fevereiro de 2018, às 14:00 horas, na sala 3061 da Faculdade de Farmácia - UFMG, a 307ª defesa de dissertação, intitulada *Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas: preparo, caracterização, avaliação da atividade citotóxica e antitumoral*, apresentada por ELIZA ROCHA GOMES, número de registro 2018855687, graduada no curso de FARMÁCIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Mônica Cristina de Oliveira - Orientadora (UFMG), Prof. Rodrigo Maia de Pádua - Coorientador (UFMG), Prof. Izabela Thais da Silva - Coorientadora (UFMG), Prof. Elaine Amaral Leite (UFMG), Prof. Ricardo José Alves (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2018.


Profa. Mônica Cristina de Oliveira (Doutora)


Prof. Rodrigo Maia de Pádua (Doutor)


Profa. Elaine Amaral Leite (Doutora)


Prof. Ricardo José Alves (Doutor)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar, iluminar meu caminho e me dar força perante as dificuldades.

Aos meus pais, por tudo que representam, pelo amor e apoio incondicionais.

Aos meus irmãos e ao Márcio, pelo apoio, carinho e amizade.

À Professora Mônica, por me receber de braços abertos, confiando em mim para a execução desse trabalho. Agradeço pelo carinho, orientação, disponibilidade e ensinamentos oferecidos nesses dois anos. Você é um exemplo de profissionalismo, competência e dedicação.

Ao Professor Rodrigo, pela ideia do trabalho, por ter confiado em mim para a execução e pelos compostos gentilmente cedidos.

À Professora Izabella, por compartilhar seus conhecimentos, pela confiança transmitida e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos Professores André, Giovanni e Elaine, pela ajuda indispensável com os experimentos.

À equipe LTF, alunos e professores, obrigada pelo carinho da convivência diária, pela troca de experiências e pela disposição em ajudar sempre.

À FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que participaram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

O câncer é um relevante problema de saúde coletiva, constituindo-se na segunda principal causa geral de morte por doença no mundo. A quimioterapia é a modalidade de tratamento do câncer mais utilizada. Porém, a maioria dos agentes antineoplásicos causa inúmeros efeitos tóxicos, o que torna necessária a busca por novas estratégias terapêuticas. Evidências epidemiológicas levaram ao início da investigação da atividade citotóxica de cardenolídeos, e tendo em vista seu efeito diferenciado em células saudáveis, essa classe vem sendo amplamente estudada quanto à possibilidade de uso no tratamento do câncer. A proposta desse estudo consistiu na busca por alternativa para veiculação do cardenolídeo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), que apresenta alta lipofilia, permitindo sua encapsulação em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (LpHS-GEVGP). O diâmetro médio das vesículas foi de $182,2 \pm 2,7$ nm, o índice de polidispersão igual a 0,36 e o potencial zeta próximo à neutralidade, permitindo a aplicação dessa formulação para os estudos *in vivo*. O teor de GEVGP encapsulado foi de $75,0 \pm 7,0\%$. A avaliação da estabilidade de armazenamento dos lipossomas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ comprovou a manutenção das características físico-químicas da formulação por no mínimo 30 dias. Os estudos de pH-sensibilidade dos lipossomas contendo GEVGP mostraram uma perda da característica de pH-sensibilidade do nanossistema, que pode ser explicada pela alteração da estrutura da bicamada lipídica devido à presença de GEVGP. A citotoxicidade dos lipossomas contendo o cardenolídeo foi avaliada em três diferentes linhagens celulares tumorais de mama (triplo negativa MDA-MB-231, ER positiva MCF-7 e HER2 positiva SKBR3) e uma linhagem de células não-pequenas de câncer de pulmão (A549), pelo ensaio de Sulforrodamina B e demonstraram grande potencial citotóxico. Adicionalmente, a citotoxicidade dos lipossomas foi avaliada em fibroblastos humanos não-tumorais. A formulação mostrou-se seletiva para células tumorais em relação a células não-tumorais humanas. Estudos *in vitro* a longo prazo confirmaram que LpHS-GEVGP diminuem a capacidade de crescimento das células tumorais sobreviventes após o tratamento, bem como a formação de colônias a partir dessas células. A avaliação da atividade antitumoral, por análise de variação do volume tumoral demonstrou que LpHS-GEVGP nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg apresentaram capacidade semelhante ao paclitaxel na dose de 10 mg/kg, de

inibir o crescimento do tumor de pulmão em camundongos Balb/c nude. Diante do exposto, os LpHS-GEVGP apresentam-se como uma formulação promissora para o tratamento do câncer de mama e pulmão, já que permitiu a administração sistêmica do GEVGP, demonstrou alto potencial citotóxico e seletividade, eficácia antitumoral superior ao paclitaxel e ausência de sinais de toxicidade a partir de um estudo preliminar.

Palavras-chave: Câncer. Lipossomas. Cardenolídeo. Citotoxicidade. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is an important public health problem, being the second cause of death in the world. Chemotherapy is the most commonly used cancer treatment modality. However, most antineoplastic agents cause innumerable toxic effects, which makes it necessary to search for new therapeutic strategies. Epidemiological evidence has led to the initiation of the investigation of the cytotoxic activity of cardenolides, and in view of their differentiated effect on healthy cells, this class has been widely studied regarding the possibility of use in the treatment of cancer. The aim of this study was to search for an alternative for the cancer treatment, by means of the synthesis of glucoevatromonoside with peracetylated glucose hydroxyl groups (GEVPG), which has high lipophilicity, allowing its entrapment in long-circulating and pH-sensitive liposomes (SpHL-GEVPG). The mean diameter of the vesicles was of 182.2 ± 2.7 nm, the polydispersity index was equal to 0.36 and the zeta potential close to neutrality, allowing the application of this formulation for *in vivo* studies. The liposomes encapsulated GEVPG content was equal to $75,0 \pm 7,0\%$. The evaluation of the storage stability of the liposomes at 4°C confirmed the maintenance of the physical chemical characteristics of the formulation for at least 30 days. pH-sensitivity studies of the liposomal formulation containing GEVPG showed a reduction of the sensitivity when submitted to acid pH, which can be explained by the alteration of the lipid bilayer structure by the GEVPG. The cytotoxic activity of liposomes containing cardenolide against three different human breast tumor cell lines (triple negative breast cancer MDA-MB-231, ER positive MCF-7 and HER 2 positive SKBR3) and human non-small cell lung cancer cells (A549) was evaluated by the Sulforhodamine B assay and demonstrated a high cytotoxic potential. In addition, the cytotoxic activity of liposomes was evaluated in non-tumor human fibroblasts. SpHL-GEVPG was selective for tumor cells relative to human non-tumor cells. Long-term *in vitro* studies have confirmed that SpHL-GEVPG decrease the growth capacity of surviving tumor cells after treatment, as well the formation of colonies from these cells. The evaluation of antitumoral efficacy of the treatment with SpHL-GEVPG using Balb/c nude female mice bearing A549 tumor showed that the treatment with SpHL-GEVPG at doses 1.0 and 2.0 mg / kg had similar capacity at dose of paclitaxel at the 10 mg / kg dose, to inhibit lung tumor growth. Considering the above, SpHL-GEVPG is a promising formulation for the treatment of

breast and lung cancer, since it allowed the systemic administration of GEVPG, demonstrated high cytotoxic potential and selectivity, antitumor activity similar to paclitaxel and absence of signs toxicity from a preliminary study.

Keywords: Cancer. Liposomes. Cardenolides. Cytotoxicity. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características das células tumorais.....	17
Figura 2 - Origem dos fármacos anticâncer aprovados para uso entre 1930 a 2014, n = 160.....	22
Figura 3 - Estrutura química de glicosídeo cardíaco.....	23
Figura 4 - Estrutura química da digoxina.....	25
Figura 5 - Mecanismo da ação cardiotônica dos cardenólídeos.....	25
Figura 6 - Estrutura química do glicoevatromonosídeo (GEV).....	28
Figura 7 - Estrutura química do glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP).....	29
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura de lipossomas.....	30
Figura 9 - Representação esquemática de alguns fosfolípides.....	30
Figura 10 - Classificação de lipossomas de acordo com o diâmetro e o número de bicamadas das vesículas.....	31
Figura 11 - Efeito EPR. Vasculatura em tecido não-tumoral com células endoteliais firmemente justapostas permitindo apenas a passagem do fármaco livre (A), vasculatura na região tumoral com fenestrações permitindo o extravasamento dos lipossomas (B).....	32
Figura 12 - Classificação dos lipossomas quanto à composição química. Lipossomas convencionais (A); lipossomas de superfície modificada com anticorpo direcionado (B); lipossomas de circulação prolongada (C); lipossomas polimórficos (D): lipossomas pH-sensíveis (1) e lipossomas catiônicos (2).....	33
Figura 13 - Estrutura química da distearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG ₂₀₀₀).....	34
Figura 14 - Estrutura química das moléculas de DOPE (A) e CHEMS (B).....	34
Figura 15 - Representação esquemática da formação das fases lamelar e hexagonal da molécula de DOPE.....	36
Figura 16 - Esquema de preparo dos LpHS-GEVGP.....	44
Figura 17 - Sobreposição de perfis cromatográficos obtidos para solução de GEVGP (em azul) e lipossomas brancos (LpHS brancos, em vermelho).....	54

Figura 18 - Representação gráfica da curva de calibração para o doseamento de GEVGP obtida pelo método de CLAE.....	55
Figura 19 - Estudo de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP em pH 5 (linha azul) e 7,4 (linha vermelha).....	62
Figura 20 - Avaliação <i>in vitro</i> a longo prazo das células da linhagem A549 sobreviventes após tratamentos com GEVGP, LpHS-GEVGP e PTX.....	67
Figura 21 - Parâmetros relativos de CPD de células sobreviventes após tratamento com GEVGP, LpHS-GEVGP e PTX.....	68
Figura 22 – Efeito dos tratamentos com GEVGP, LpHS-GEVGP e PTX sobre a capacidade das células tumorais da linhagem A549 formarem colônias.....	69
Figura 23 – Variação do volume tumoral (%) de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de carcinoma de pulmão da linhagem A549, durante tratamento com LpHS brancos, PTX e LpHS-GEVGP em diferentes doses.....	71
Figura 24 - Fotomicrografias do tumor representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos.....	73
Figura 25 - Fotomicrografias do baço representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos.....	74
Figura 26 - Fotomicrografias do fígado representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos.....	75
Figura 27 - Fotomicrografias dos rins representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das principais geninas encontradas em glicosídeos cardíacos de acordo com o padrão de substituição.....	24
Tabela 2 - Gradiente de eluição utilizado nas análises de GEVGP por CLAE.....	40
Tabela 3 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de GEVGP por CLAE.....	42
Tabela 4 - Valores de CI_{50} de GEV e GEVGP para diferentes linhagens celulares tumorais.....	53
Tabela 5 - Determinação da precisão intradia e interdia do método de doseamento de GEVGP por CLAE.....	56
Tabela 6 - Determinação da exatidão do método de doseamento de GEVGP por CLAE.....	57
Tabela 7 - Determinação da robustez do método de doseamento de GEVGP por CLAE.....	58
Tabela 8 - Características químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVGP.....	59
Tabela 9 - Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP ao longo do tempo.....	61
Tabela 10 - Valores de CI_{50} de GEVGP, LpHS-GEVGP, DXR e PTX para diferentes linhagens celulares.....	64
Tabela 11 - Valores de IS para diferentes linhagens celulares tumorais em relação à cultura primária de fibroblastos não-tumorais de gengiva humana.....	65
Tabela 12 - VRT e IC do tumor de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de carcinoma de pulmão da linhagem A549, após tratamento com LpHS brancos, PTX e LpHS-GEVGP em diferentes doses.....	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
BRCA 1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA 2	<i>Breast cancer 2</i>
CHEMS	Hemisuccinato de colestera
CI₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CPCNP	Câncer de pulmão de células não pequenas
CPD	Duplicação cumulativa da população, (do inglês <i>Cumulative Population Doubling</i>)
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina
DSPE-mPEG₂₀₀₀	Distearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao metoxi-poli(etileno)glicol 2000
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentadas
ER	Receptor de estrógeno (do inglês, <i>estrogen receptor</i>)
GEV	Glicoevatromonosídeo
GEVGP	Glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas
HER2	Receptor do fator de crescimento humano 2 (do inglês, <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>)
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IP	Índice de polidispersão
IS	Índice de seletividade
LD	Limite de detecção
LpHS brancos	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada brancos
LpHS-GEVGP	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas
LQ	Limite de quantificação
Na⁺K⁺ATPase	Bomba sódio-potássio
PC	Fosfatidilcolina

PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PR	Receptor de progesterona (do inglês, <i>progesterone receptor</i>)
PZ	Potencial zeta
SE	Solução estoque de GEVGP
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
TE	Teor de encapsulação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Câncer.....	17
2.1.1 <i>Câncer de mama</i>	18
2.1.2 <i>Câncer de pulmão</i>	19
2.2 Diagnóstico e tratamento do câncer.....	20
2.3 Contribuição dos produtos naturais como fonte de fármacos anticâncer.....	21
2.4 Glicosídeos cardíacos.....	23
2.4.1 <i>Glicosídeos cardíacos e seu uso na insuficiência cardíaca congestiva</i>	24
2.4.2 <i>Potencial citotóxico e anticâncer de cardenolídeos</i>	26
2.4.3 <i>Bioprospecção de novos cardenolídeos</i>	27
2.5 Lipossomas.....	29
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivos geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material.....	39
4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para doseamento de GEVGP por CLAE.....	40
4.2.1 <i>Condições cromatográficas</i>	40
4.2.2 <i>Especificidade</i>	41
4.2.3 <i>Linearidade</i>	41
4.2.4 <i>Precisão</i>	42
4.2.5 <i>Exatidão</i>	42
4.2.6 <i>Robustez</i>	43
4.2.7 <i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação</i>	43
4.3 Preparo dos LpHS-GEVGP.....	43
4.4 Caracterização química e físico-química dos LpHS GEVGP.....	45
4.4.1 <i>Determinação do diâmetro, IP e PZ</i>	45

4.4.2 <i>Determinação do TE de GEVGP em LpHS-GEVGP</i>	45
4.5 Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP.....	45
4.6 Estudo de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP.....	46
4.7 Estudos <i>in vitro</i>	46
4.7.1 <i>Culturas celulares</i>	46
4.7.2 <i>Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Sulforrodamina B</i>	47
4.7.3 <i>Seletividade</i>	48
4.7.4 <i>Duplicação cumulativa da população</i>	48
4.7.5 <i>Ensaio clonogênico</i>	49
4.8 Estudos <i>in vivo</i>	49
4.8.1 <i>Animais</i>	49
4.8.2 <i>Implante das células A549 em animais Balb/C nude</i>	50
4.8.3 <i>Tratamento dos animais</i>	50
4.8.4 <i>Avaliação da atividade antitumoral</i>	51
4.8.4.1 <u><i>Volume tumoral e peso dos animais</i></u>	51
4.8.4.2 <u><i>Avaliação histopatológica</i></u>	51
4.9 Análise estatística.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Avaliação da citotoxicidade de GEV e GEVGP por Sulforrodamina B.....	53
5.2 Validação do método analítico para doseamento de GEVGP por CLAE...	54
5.2.1 <i>Especificidade</i>	54
5.2.2 <i>Linearidade</i>	55
5.2.3 <i>Precisão</i>	56
5.2.4 <i>Exatidão</i>	57
5.2.5 <i>Robustez</i>	57
5.2.6 <i>Limite de detecção (LD) e limite de quantificação</i>	59
5.3 Caracterização química e físico-química dos LpHS-GEVGP.....	59
5.4 Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP.....	60
5.5 Estudo de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP.....	62
5.6 Estudos <i>in vitro</i>	63
5.6.1 <i>Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Sulforrodamina B</i>	63
5.6.2 <i>Seletividade</i>	65
5.6.3 <i>Duplicação cumulativa da população</i>	66

5.6.4 Ensaio clonogênico.....	69
5.7 Estudos <i>in vivo</i>.....	70
5.7.1 Avaliação da atividade antitumoral.....	70
5.7.1.1 <u>Volume tumoral e peso dos animais</u>.....	70
5.7.1.2 <u>Avaliação histopatológica</u>.....	72
6 CONCLUSÕES.....	77
7 PERSPECTIVAS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer deve ser analisado como um relevante problema de saúde coletiva, responsável por uma a cada seis mortes no mundo. Mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer anualmente e, para 2030 são esperados 21 milhões de novos casos (WHO, 2017). Isso decorre, principalmente, devido à maior exposição dos indivíduos a fatores de riscos cancerígenos, como o tabaco, álcool e a má alimentação (INCA, 2017).

A anamnese e o exame físico são a base para o diagnóstico clínico e constituem os elementos orientadores para indicação de exames complementares. Os sintomas clínicos de câncer variam de acordo com o tipo, a natureza e a localização deste nos diferentes tecidos e, em muitos casos, são não-característicos (INCA, 2017).

O tratamento do câncer pode ser feito mediante excisão cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. O valor relativo de cada um depende do tipo de tumor e da progressão da doença (RANG *et al.*, 2011). A quimioterapia tem como alvo principal a divisão celular e é a alternativa terapêutica mais usada, sendo administrada como monoterapia ou associada a outras formas de tratamento. Contudo, a maioria dos agentes antineoplásicos atua de forma não específica, lesando também células não-tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2005; RANG *et al.*, 2011). Sendo assim, um dos maiores desafios no desenvolvimento de fármacos é a identificação de agentes antitumorais eficazes, específicos e seguros (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Evidências epidemiológicas levaram ao início da investigação da atividade citotóxica de cardenolídeos (SHIRATORI, 1967). Vários estudos *in vitro* relatam os efeitos citotóxicos desses compostos em células tumorais. Por outro lado, em células não-tumorais, os cardenolídeos apresentam baixa citotoxicidade. O mecanismo pelo qual esses compostos exercem tais efeitos ainda não foi completamente elucidado, mas vários estudos vêm sendo feitos com esse objetivo (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2017a).

O uso de diversos nanossistemas, incluindo os lipossomas, tem se mostrado uma excelente estratégia de veiculação de agentes antineoplásicos, uma vez que permitem o direcionamento de fármacos, aumentando sua concentração na região tumoral, diminuindo a toxicidade sistêmica e aumentando a eficácia antitumoral (FERREIRA *et al.*, 2013).

Sabe-se que cardenólídeos, como a digoxina, apresentam um índice terapêutico extremamente baixo, e seu uso deve ser monitorado com cuidado (HAUPTMAN; KELLY, 1999). Tendo em vista a potencial atividade anticâncer, seu efeito diferenciado em células saudáveis e a toxicidade conhecida desses compostos, um derivado de cardenólídeo foi selecionado para ser encapsulado em lipossomas, objetivando direcionamento à região tumoral e diminuição da toxicidade sistêmica.

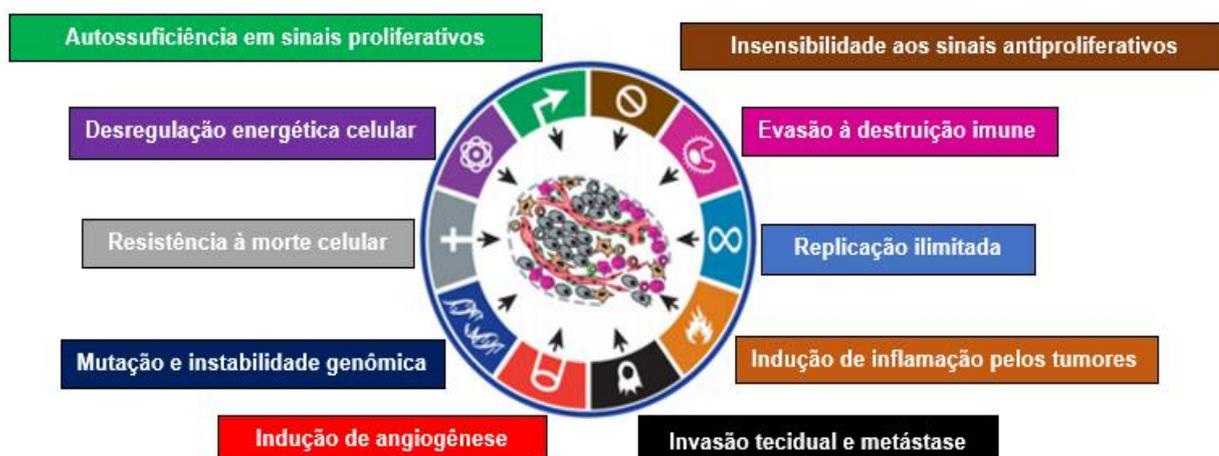
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem em comum a proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, geralmente com perda ou redução de diferenciação, em consequência de alterações em genes e proteínas que regulam a multiplicação e a diferenciação das células (BRASILEIRO-FILHO, 2014). Com o crescimento descontrolado, essas células com capacidade de disseminar-se a tecidos e órgãos, podem ser muito agressivas, levando à formação de tumores malignos que podem ganhar uma via de disseminação e, assim chegar a sítios distantes originando neles novos tumores (metástases) (BRASILEIRO-FILHO, 2014; INCA, 2017; WHO, 2017).

Diante da proliferação ilimitada dessas células, há uma maior necessidade de suprimento energético, levando à formação de novos vasos sanguíneos ao redor do tumor (angiogênese). Além disso, as células tumorais são caracterizadas por sua autossuficiência para os sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais antiproliferativos, resistência à morte celular, potencial ilimitado de replicação, invasão tecidual e capacidade de sofrer metástase, mutação e instabilidade genômica, inflamação induzida pelos tumores, e duas outras características ainda emergentes, que são desregulação energética celular e evasão ao sistema imune (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 – Características das células tumorais



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011, p.668.

As causas do câncer são variadas, podendo ser externas e internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas estão associadas a 80% dos casos de câncer e relacionam-se ao meio ambiente, no qual encontramos um grande número de fatores de riscos, tais como tabagismo, alcoolismo, má alimentação, sedentarismo, alto índice de massa corporal, exposição solar e utilização de medicamentos. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e são raros os casos de câncer que se devem exclusivamente a fatores hereditários (INCA, 2017).

O câncer é um enorme problema de saúde pública em todas as regiões e grupos socioeconômicos (WHO, 2017). A estimativa mundial apontou que dos 14 milhões de novos casos estimados de câncer, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2012). O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, com um total de 8,8 milhões de óbitos ocorridos em 2015, sendo aproximadamente 70% dessas mortes ocorridas, nesses mesmos países (WHO, 2017). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de pulmão, próstata, intestino e estômago em homens e os cânceres de mama, intestino, pulmão e colo do útero entre as mulheres (WHO, 2017).

2.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em mulheres no mundo, depois do de pele não melanoma, com cerca de 1,6 milhões de casos por ano e mais de 500 mil óbitos anuais, sendo uma das principais causas de morte por câncer entre elas (GLOBOCAN, 2012; NÚÑEZ *et al.*, 2016). O risco de desenvolver a doença aumenta principalmente com a idade, histórico familiar (90% dos casos estão relacionados às mutações nos genes BRCA 1 e BRCA 2), fatores hormonais, alcoolismo, sedentarismo e tabagismo (ACS, 2017; BRASILEIRO-FILHO, 2014).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea que exhibe uma variedade de comportamentos clínicos, prognósticos e histologias (AMATO *et al.*, 2012). O carcinoma mamário é a neoplasia maligna visceral mais frequente em mulheres, com cerca de um milhão de novos casos diagnosticados anualmente. Quanto à localização e extensão, os carcinomas da mama são classificados como *in situ* ou invasivo, sendo divididos em ductal ou lobular, principalmente. O carcinoma *in situ* se restringe aos

ductos mamários, e distingue-se do carcinoma invasivo pela ausência de invasão estromal (BRASILEIRO-FILHO, 2014). Se diagnosticado no estágio inicial, o carcinoma *in situ* é facilmente curável (NÚÑEZ *et al.*, 2016). O tipo mais frequente de câncer de mama é o carcinoma ductal invasivo, que corresponde a cerca de 80% dos casos de tumores de mama invasivo e, por ser muito agressivo, apresenta uma sobrevida estimada de cinco anos para 60% das pacientes (BRASILEIRO-FILHO, 2014).

O câncer de mama é clinicamente categorizado com base na existência de marcadores imunohistoquímicos tais como: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2). A classificação é feita em três tipos: câncer de mama do tipo HR⁺ (ER⁺ e PR⁺), câncer de mama do tipo HER2⁺ (HER2⁺, ER⁻ e PR⁻) e câncer de mama triplo negativo (ER⁻, PR⁻ e HER2⁻). Os dois primeiros tipos podem ser tratados por terapia direcionada ao receptor. Já para o tipo triplo negativo é necessário o uso de fármacos citotóxicos (TANG *et al.*, 2016).

2.1.2 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão é o câncer mais incidente no mundo, com cerca de 1,8 milhões de novos casos por ano, colocando-se entre as causas mais comuns de morte por neoplasias malignas (GLOBOCAN, 2012; NAGASAKA; GADGEEL, 2017). Sua incidência vem crescendo nos últimos 60 anos, coincidindo com o aumento na produção de tabaco e no consumo de cigarros. Além do tabagismo, que é a principal causa do câncer de pulmão, a poluição atmosférica, que contém inúmeras substâncias carcinogênicas, como arsênio, cobre, cádmio e hidrocarbonetos derivados da queima de fósseis, parece ser responsável por cerca de 1 a 2% das neoplasias pulmonares malignas (BRASILEIRO-FILHO, 2014).

A taxa de mortalidade por câncer de pulmão é alta, comparada aos outros tipos de câncer, uma vez que apenas 15% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados em estágios iniciais, permitindo a cura (LIAM *et al.*, 2015). A estimativa mundial apontou um número de 1,5 milhões de óbitos por câncer de pulmão por ano, que equivale à mais de 85% dos casos incidentes (GLOBOCAN, 2012; WHO, 2017).

Na prática clínica, as neoplasias pulmonares são divididas em dois grupos: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP, em português e SCLC, *small cell lung cancer*, em inglês) e câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP, em português e NSCLC, *non-small cell lung cancer*, em inglês), sendo que o último constitui 85% dos casos (NAGASAKA; GADGEEL, 2017). O carcinoma de pulmão de células pequenas é o de pior prognóstico, com curso clínico agressivo e sobrevida média de cerca de um ano após o diagnóstico (BRASILEIRO-FILHO, 2014). CPCNP é um grupo heterogêneo composto de três tipos histopatológicos principais e distintos, a saber: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma e carcinoma de grandes células (INCA, 2017). O carcinoma epidermoide é o tipo mais frequente, correspondendo a cerca de 40% dos casos de tumores pulmonares. Além disso, é o tipo mais associado ao tabagismo, mais comum em homens e de melhor prognóstico. O adenocarcinoma é o tumor pulmonar mais frequente em mulheres, cuja associação com o tabagismo é menos importante. O carcinoma de grandes células é o tipo menos frequente de carcinoma pulmonar, que apresenta comportamento altamente agressivo, evoluindo rapidamente para óbito (BRASILEIRO-FILHO, 2014).

Quanto ao estadiamento (extensão da lesão neoplásica), o câncer de pulmão pode ser classificado em quatro estádios (estádio I, II, III e IV). Tumores restritos aos pulmões, nos estádios I ou II, devem ser tratados com ressecção cirúrgica, com alta chance de cura e sobrevida em cinco anos estimada de 62 e 47%, respectivamente (NOVAES *et al.*, 2008). Enquanto que nos estádios III e IV, onde a doença já está disseminada a outras regiões, os pacientes não se beneficiam com a cirurgia e a sobrevida média esperada para a maioria dos pacientes é baixa (LIAM *et al.*, 2015; NOVAES *et al.*, 2008).

2.2 Diagnóstico e tratamento do câncer

A anamnese e o exame físico são a base para o diagnóstico clínico e constituem os elementos orientadores para indicação de exames complementares, que visam avaliar o tumor primário, as funções orgânicas, a ocorrência simultânea de outras doenças e a extensão da doença neoplásica, para orientação do tratamento a ser utilizado e prognóstico da doença (INCA, 2017).

O tratamento do câncer pode ser feito mediante excisão cirúrgica, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia. O valor relativo de cada um depende do tipo de tumor e do estágio de desenvolvimento (RANG *et al.*, 2011). A aplicação isolada ou a associação de tais modalidades tem maximizado as chances de cura ou controle da doença (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A cirurgia é considerada a forma mais eficaz de tratamento, principalmente quando o tumor está em estágio inicial e não apresenta metástases. A terapia radioativa é frequentemente combinada com a cirurgia com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento. A terapia com fármacos citotóxicos é a técnica mais usada e pode ser administrada como monoterapia ou associada a outras formas de tratamento. Consiste na administração de medicamentos que induzem a morte das células tumorais por diversos mecanismos, impedindo o crescimento do tumor e a invasão de outros tecidos (ALMEIDA *et al.*, 2005).

No entanto, a maioria dos agentes antineoplásicos atua de forma não específica, tendo como alvo principal a divisão celular. Assim, esses agentes lesam também células não-tumorais, particularmente as que possuem elevada taxa de replicação, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, causando inúmeros efeitos tóxicos (RANG *et al.*, 2011).

Os agentes antineoplásicos são mais efetivos em combinação e podem demonstrar efeitos sinérgicos por meio de interações bioquímicas. É mais efetiva a combinação de fármacos que apresentam mecanismos de ação distintos e cujas principais toxicidades não se superpõem. Os fármacos citotóxicos devem ser utilizados nas doses máximas toleráveis, devendo ser administrados o mais frequentemente possível para desestimular novo crescimento tumoral e maximizar a intensidade da dose. Com isso, um dos maiores desafios da terapia consiste no ajuste da dose para obter o resultado terapêutico desejado sem que ocorra toxicidade (CHABNER *et al.*, 2010).

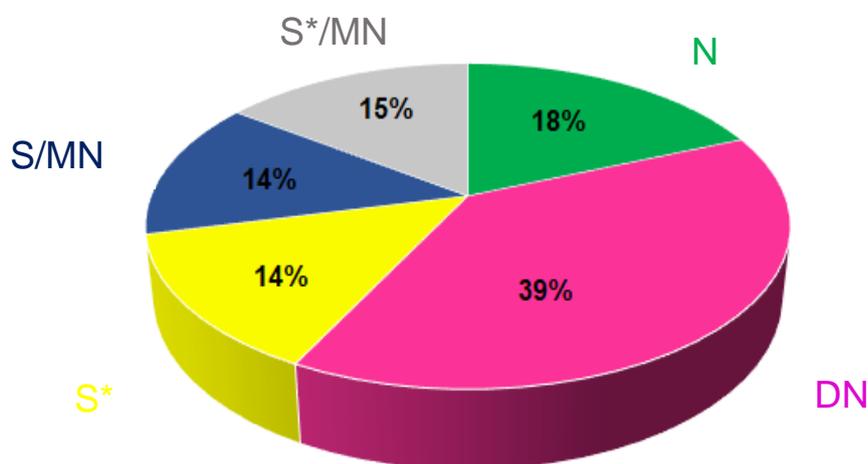
2.3 Contribuição dos produtos naturais como fonte de fármacos anticâncer

O papel dos produtos naturais como fonte de medicamentos é conhecido desde a antiguidade. A natureza é uma fonte interessante de novos candidatos a fármacos

com uma enorme diversidade química encontrada em milhões de espécies de plantas, animais, organismos marinhos e microrganismos (ROCHA, 2001).

Estudos recentes indicaram que dos 207 fármacos aprovados para o tratamento de câncer, de 1930 a 2014, 77% deles são de origem natural ou derivados (Figura 2) (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre esses se destacam a vimblastina, vincristina, paclitaxel, docetaxel, irinotecano, topotecano, etoposídeo, tenoposídeo e doxorubicina (AMIN *et al.*, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 2 - Origem dos fármacos anticâncer aprovados para uso entre 1930 a 2014, n = 160



N = produto natural inalterado; DN = derivado de produto natural; S* = fármaco sintético com grupo farmacofórico derivado de produto natural; S/MN e S*/MN = mimetizam produto natural.
 Fonte: adaptado de NEWMAN; CRAGG, 2016, p. 654.

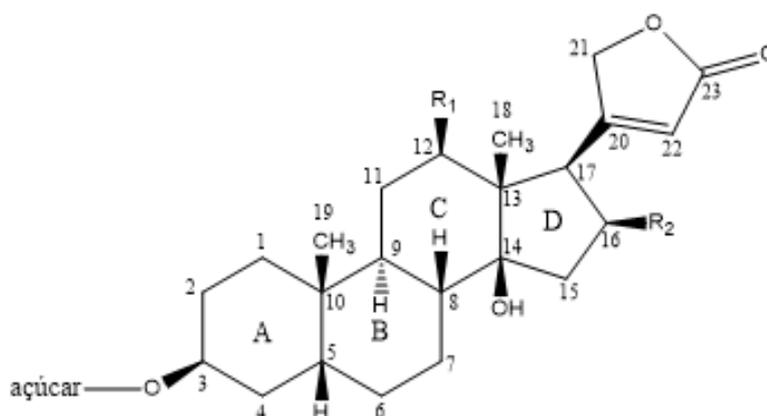
As plantas se destacam como uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Das 250 mil espécies existentes de plantas, apenas 6% foram estudadas quanto ao seu potencial biológico e 15% quanto aos seus constituintes químicos, tornando-se fundamental novas pesquisas para melhor explorar o potencial medicinal dessas espécies. E, graças aos avanços na química orgânica são possíveis modificações na estrutura dos produtos naturais, permitindo o desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos e menos tóxicos para o tratamento das doenças (FAKIM, 2006; RATES; BRIDI, 2010).

2.4 Glicosídeos cardíacos

Os glicosídeos cardíacos ou digitálicos são exemplos de compostos encontrados em plantas, que vêm sendo usados desde 1775 devido à sua ação no músculo cardíaco. Evidências epidemiológicas levaram ao início da investigação da atividade citotóxica desses compostos e, tendo em vista seu efeito diferenciado em células saudáveis, essa classe vem sendo amplamente estudada quanto à possibilidade de uso no tratamento do câncer (NEWMAN *et al.*, 2008; STENKVIST *et al.*, 1979).

Os cardenolídeos são constituídos por um núcleo esteroidal e um anel lactônico de cinco membros, conjuntamente denominados de porção aglicona ou genina. Esses compostos são encontrados na natureza principalmente na forma de glicosídeos cardíacos, onde a porção osídica é geralmente ligada à posição 3 β -OH do núcleo esteroidal (Figura 3). O anel lactônico α,β -insaturado de cinco membros é ligado à posição C-17. A aglicona apresenta geralmente como característica a junção *cis* entre os anéis A-B e C-D e os anéis B-C encontram-se fusionados na conformação *trans* (RATES; BRIDI, 2010).

Figura 3 - Estrutura química de glicosídeo cardíaco



A porção aglicona dos cardenolídeos é nomeada de acordo com o padrão da posição 5 e as substituições em R₁ e R₂ (Tabela 1) (KREIS *et al.*, 1998; KREIS, 2017).

Tabela 1 - Classificação das principais geninas encontradas em glicosídeos cardíacos de acordo com o padrão de substituição

Aglicona	R₁	R₂	Posição 5
Digitoxigenina	H	H	H
Gitoxigenina	H	OH	H
Digoxigenina	OH	H	H
Diginatigenina	OH	OH	H
Gitalexigenina	H	O-CHO	H
Oleandrigenina	H	OCOCH ₃	H
Uzarigenina	H	H	H (α)
Canarigenina	H	H	Δ ^{4,5}
Xismalogenina	H	H	Δ ^{5,6}

Fonte: adaptado de KREIS, 2017, p.967.

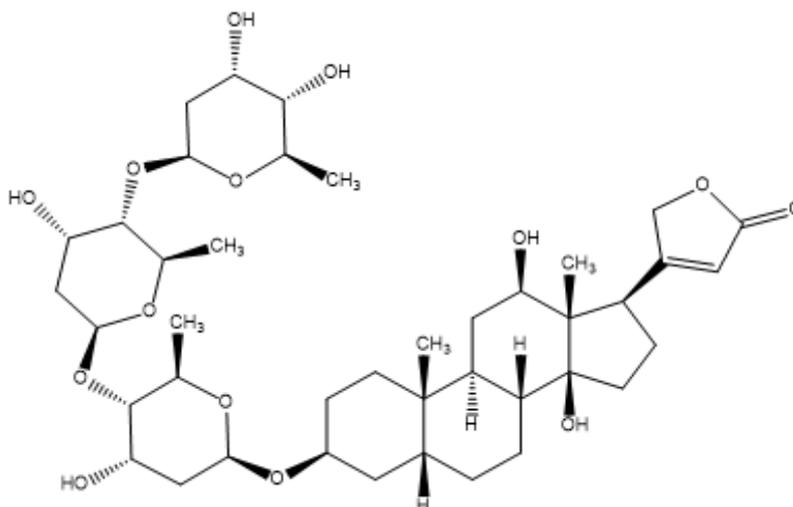
Uma grande variedade de açúcares pode estar ligada na posição 3β-OH da aglicona. Os mais comuns são glicose, digitoxose, diginose, fucose, ramnose e digitalose (RATES; BRIDI, 2010). A cadeia lateral de açúcares, ligada na posição 3β-OH, não é fundamental para a atividade de glicosídeos cardíacos, mas afeta principalmente a sua farmacocinética (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

2.4.1 Glicosídeos cardíacos e seu uso na insuficiência cardíaca congestiva (ICC)

Os glicosídeos cardíacos são caracterizados pela poderosa ação que exercem no músculo cardíaco, sendo agentes de primeira linha para a terapia da ICC (NEWMAN *et al.*, 2008). O uso desses é também indicado na profilaxia e tratamento de algumas arritmias, como a fibrilação atrial e taquicardia atrial paroxística e, ainda, no tratamento do choque cardiogênico (RATES; BRIDI, 2010).

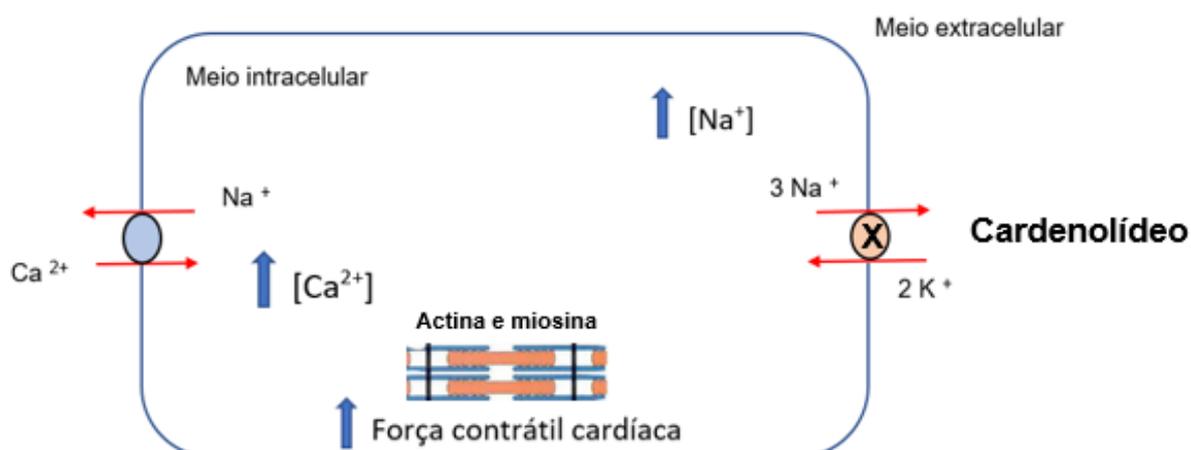
O principal glicosídeo cardíaco utilizado terapeuticamente é a digoxina (Figura 4), sendo o mais prescrito no mundo. Apresenta um índice terapêutico extremamente baixo e seu uso deve ser monitorado com cuidado pelas dosagens de seus níveis séricos. O nível sérico ótimo é de 0,5 a 1,0 ng/mL. Este é alcançado com uma dose prescrita de 0,125 mg a 0,25 mg/dia, tomada por via oral. Sua eliminação ocorre entre 36-48 horas, em pacientes com função renal normal, resultando numa perda de cerca de um terço da sua concentração corporal por dia (HAUPTMAN; KELLY, 1999).

Figura 4 - Estrutura química da digoxina



O mecanismo de ação cardiotônica (Figura 5) se dá pela inibição da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (bomba sódio-potássio), resultando na elevação da concentração intracelular de Na^+ nos cardiomiócitos, que estimulará outro carreador responsável pela troca de Na^+ pelo Ca^{2+} (BARRETO, 2000). O Ca^{2+} disponível provoca o aumento da força contrátil cardíaca, uma vez que se liga às proteínas contráteis actina e miosina do músculo cardíaco (RAHIMTOOLA; TAK, 1996). Além do efeito inotrópico positivo, os cardenolídeos produzem aumento do fluxo sanguíneo, diminuição da resistência vascular, dilatação venosa e redução da pressão venosa central e da frequência cardíaca (RATES; BRIDI, 2010).

Figura 5 - Mecanismo da ação cardiotônica dos cardenolídeos



Fonte: adaptado de GURE *et al.*, 2017, p. 6.

2.4.2 Potencial citotóxico e anticâncer de cardenólídeos

Na década de 60 surgiram as primeiras evidências do efeito de inibição da proliferação de células tumorais por cardenólídeos (SHIRATORI, 1967). Quase duas décadas depois, pesquisadores perceberam que as células tumorais de mama das mulheres que faziam tratamento concomitante com cardenólídeos, apresentavam características mais benignas do que as células tumorais de pacientes que não receberam os digitálicos. Além disso, a recorrência do tumor em mulheres tratadas com cardenólídeos também era menor (STENKVIST *et al.*, 1979). Um estudo com 9.271 pacientes que faziam uso de digitoxina estabeleceu uma correlação positiva entre altas concentrações plasmáticas desse fármaco e risco reduzido de leucemia e cânceres do trato urinário, sugerindo um importante efeito anticâncer pelos cardenólídeos (HAUX, 2001).

Vários trabalhos relatam os efeitos antiproliferativo e apoptótico dos cardenólídeos em linhagens tumorais humanas de mama (KOMETIANI, 2005; LOPEZ-LAZARO *et al.* 2005; BIELAWSKI, 2006), próstata (McCONKEY *et al.*, 2000; YEH *et al.*, 2003), pâncreas (NEWMAN *et al.*, 2007), pulmões (FRESE *et al.*, 2006; MIJATOVIC *et al.*, 2006, SCHNEIDER *et al.*, 2017a; XUE *et al.*, 2014), rins (LOPEZ-LAZARO *et al.*, 2005), além de melanomas (LOPEZ-LAZARO *et al.*, 2005; NEWMAN *et al.*, 2006), leucemias (WATABE *et al.*, 1997; RAGHAVENDRA *et al.*, 2007) e neuroblastomas (KULIKOV *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual esses compostos exercem tais efeitos ainda não foi completamente elucidado, mas vários estudos vêm sendo realizados com esse objetivo (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). Além da interação com a Na⁺K⁺ATPase, múltiplas vias de sinalização são potencialmente ativadas ou inibidas por cardenólídeos e, alguns estudos indicaram alvos intracelulares envolvidos nos efeitos antiproliferativos desses compostos. Já se sabe que cardenólídeos podem induzir morte celular por apoptose, autofagia, *anoikis* e morte celular imunogênica, dependendo do tipo de célula e das características químicas (SCHNEIDER *et al.*, 2017a). Por outro lado, em células não-tumorais, os cardenólídeos não apresentam citotoxicidade após inibição da Na⁺K⁺ATPase, o que sugere uma seletividade desses compostos em relação às células tumorais, já que essas naturalmente apresentam maior expressão de Na⁺K⁺ATPase, alvo primário de cardenólídeos (SCHNEIDER *et al.*, 2017a; NEWMAN *et al.*, 2008).

Embora *in vitro*, tenham sido estudadas amplamente as propriedades citotóxicas dos cardenolídeos, poucos relatos evidenciaram a sua atividade antitumoral em modelos *in vivo* (MIJATOVIC, 2012). Dados recentes sugerem que de fato, existe uma diferença na composição das subunidades α e β da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, que é dependente do tipo celular. A subunidade $\alpha 1$, por exemplo, é superexpressa em alguns tipos de câncer, como CPCNP, carcinoma renal, glioma e melanona e a $\alpha 3$ em carcinoma de cólon. Em roedores, as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$ são sensíveis aos cardenolídeos e a subunidade $\alpha 1$ é resistente (SCHNEIDER *et al.*, 2017a). Essa diferença das subunidades pode explicar a sensibilidade diferencial dependente do tipo celular e da espécie animal, para cardenolídeos (NEWMAN *et al.*, 2008).

Modelos xenográficos de carcinoma hepático (HAN *et al.*, 2007), CPCNP (MIJATOVIC *et al.*, 2006), neuroblastoma (LOPEZ-LAZRA *et al.*, 2005), retinoblastoma (ANTCZAK *et al.*, 2009) e câncer de próstata (GAYED *et al.*, 2012) têm sido usados para avaliação da atividade antitumoral de cardenolídeos e, esses compostos produziram significativa redução do volume tumoral e aumento da sobrevivência dos animais xenoenxertados (NEWMAN *et al.*, 2008). Alguns cardenolídeos já estão nas fases I e II de estudos clínicos, como a digoxina (MENGER *et al.*, 2013), extratos de *Nerium oleander* (SLINGERLAND *et al.*, 2013) e o cardenolídeo semissintético UNBS1450 (VAN QUAQUEBEKE *et al.*, 2005), sendo avaliados isoladamente ou em associação com quimioterapia e imunoterapia, em câncer de mama, próstata, pulmão, cabeça e pescoço, entre outros (SCHNEIDER *et al.*, 2017a). Sabe-se que, além de ser eficaz, um promissor agente antineoplásico deve induzir morte seletivamente em células tumorais (MONTAÑO *et al.*, 2014). Tendo em vista a expressão diferenciada da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ em células tumorais, torna-se fundamental a busca por novos cardenolídeos, a fim de se encontrar um composto que seja potencialmente citotóxico em células tumorais e não nocivo às células saudáveis.

2.4.3 Bioprospecção de novos cardenolídeos

Digoxina, digitoxina, ouabaína e oleandrina, são alguns dos cardenolídeos que têm apresentado potencial ação anticâncer em vários tipos de tumor (BIELAWSKI, 2006). Porém, devido ao baixo índice terapêutico, o uso desses como anticancerígenos pode se tornar limitado. Estudos recentes mostraram que pequenas modificações estruturais no núcleo esteroidal ou na cadeia osídica de cardenolídeos podem levar a

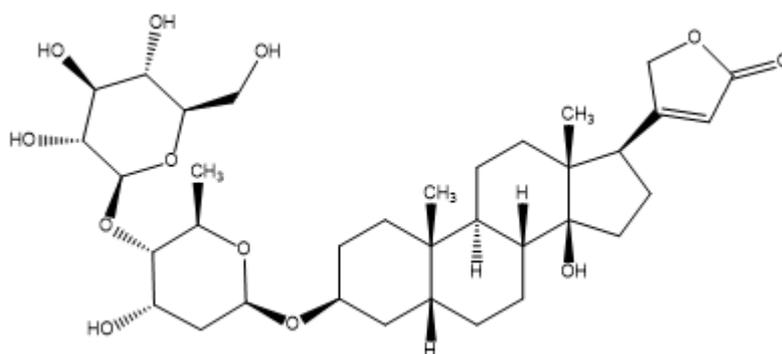
aumento da atividade citotóxica e diminuição da toxicidade sistêmica (KAUSHIK *et al.*, 2017).

O cardenólídeo semissintético UNBS1450, derivado de 2-oxovoruscarina apresentou maior citotoxicidade que o cardenólídeo isolado da espécie de planta *Calotropis procera*. UNBS1450 apresentou CI_{50} (concentração inibitória de 50% do crescimento celular) entre 10 a 50 nM em 58 linhagens celulares tumorais humanas de 11 diferentes tipos histopatológicos, sendo selecionado para a avaliação clínica de fase I (VAN QUAQUEBEKE *et al.*, 2005).

Uma triagem feita com 64 cardenólídeos de origem vegetal e semissintética, obtidos por semissíntese química ou biotransformação fúngica, avaliou a citotoxicidade desses compostos em duas linhagens celulares tumorais humanas. O glicoevatromonosídeo (GEV) apresentou maior citotoxicidade em carcinoma de pulmão humano (A549), com um valor de CI_{50} de 19 nM, sendo sete vezes mais citotóxico que a digoxina (CI_{50} de 134 nM) e dezenove vezes mais citotóxico que a digitoxina (CI_{50} de 369 nM), confirmando que alterações estruturais nos cardenólídeos, podem potencializar sua atividade citotóxica em linhagens tumorais (CARVALHO, 2012).

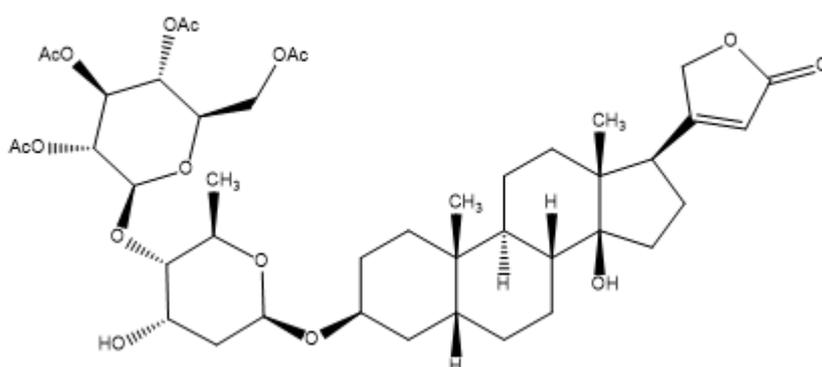
O GEV (Figura 6) pode ser extraído da espécie de planta em extinção *Digitalis mariana* ssp. *heywoodii*. Pode também ser obtido por reação de biotransformação usando culturas de células da planta *Digitalis lanata* e por semissíntese, ambas a partir do evatromonosídeo. A síntese química total não é possível economicamente, devido a estrutura química complexa do GEV (MUNKERT *et al.*, 2017).

Figura 6 - Estrutura química do glicoevatromonosídeo (GEV)



O derivado do GEV apresentando as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP) (Figura 7), (MUNKERT *et al.*, 2017), foi também selecionado para esse estudo. GEV e GEVGP são poucos solúveis em água e necessitam do uso de uma estratégia farmacotécnica, como a sua incorporação em lipossomas, permitindo a veiculação e administração endovenosa desses compostos.

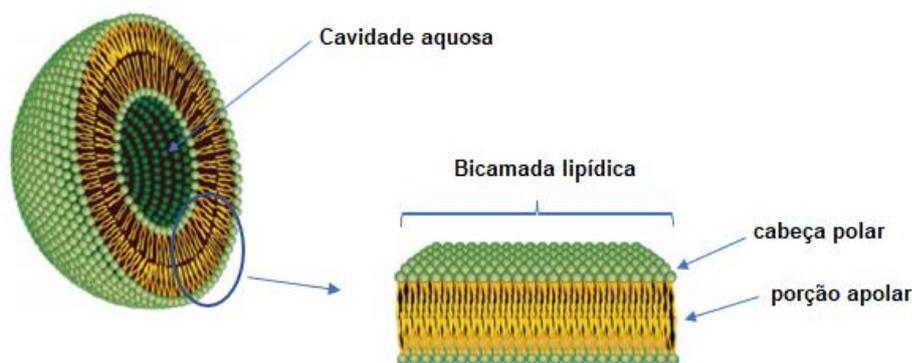
Figura 7 - Estrutura química do glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP)



2.5 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas formadas por lípides anfifílicos, geralmente fosfolípides, que em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas circundando uma cavidade aquosa interna (Figura 8) (LASIC, 1998). Essas vesículas são biocompatíveis, biodegradáveis e têm a capacidade de encapsular substâncias lipofílicas e hidrofílicas, na membrana lipídica e no compartimento aquoso, respectivamente (TORCHILIN, 2005; BOZZUTO; MOLINARI, 2015).

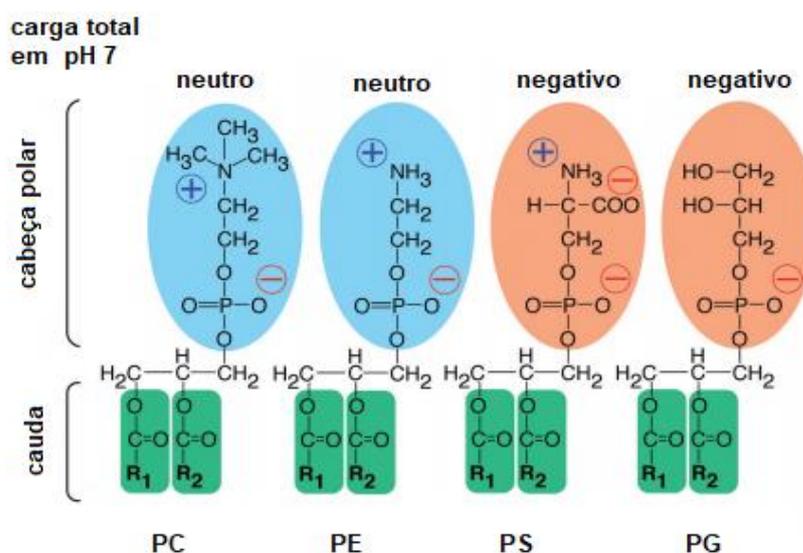
Figura 8 - Representação esquemática da estrutura de lipossomas



Fonte: adaptado de BOZZUTO; MOLINARI, 2015, p. 976.

Os fosfolípides podem ser de origem natural, sintética ou semissintética. Essas substâncias anfífilas possuem uma cabeça hidrofílica e duas cadeias hidrofóbicas apolares. A estrutura química geral de um fosfolípide apresenta um glicerol, cujas funções álcool foram esterificadas por duas cadeias longas de ácidos graxos e um ácido fosfórico. A porção polar do fosfolípide é o ácido fosfórico e esse, pode ainda ser esterificado por moléculas como colina, etanolamina, serina e glicerol, originando os fosfolípides fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilglicerol (PG), respectivamente (Figura 9) (MONTEIRO *et al.*, 2014).

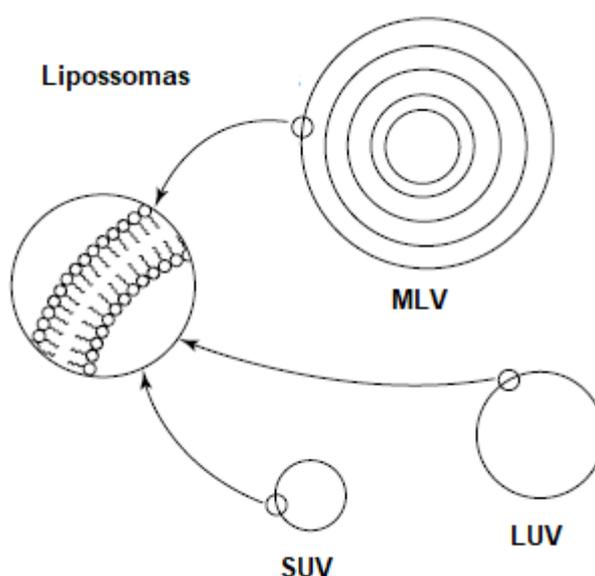
Figura 9 - Representação esquemática de alguns fosfolípides



Fonte: adaptado de KRAFT *et al.*, 2014, p. 32.

Os fosfolípides que constituem os lipossomas podem se organizar em uma única ou em múltiplas bicamadas lipídicas circundando a cavidade aquosa interna, originando vesículas unilamelares e multilamelares, respectivamente. Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas em vesículas unilamelares pequenas (SUV), com diâmetro entre 25-100 nm; vesículas unilamelares grandes (LUV), com diâmetro superior a 100 nm e vesículas multilamelares (MLV), com diâmetro entre 1-5 μm (Figura 10) (LOPES *et al.*, 2013).

Figura 10 - Classificação de lipossomas de acordo com o diâmetro e o número de bicamadas das vesículas

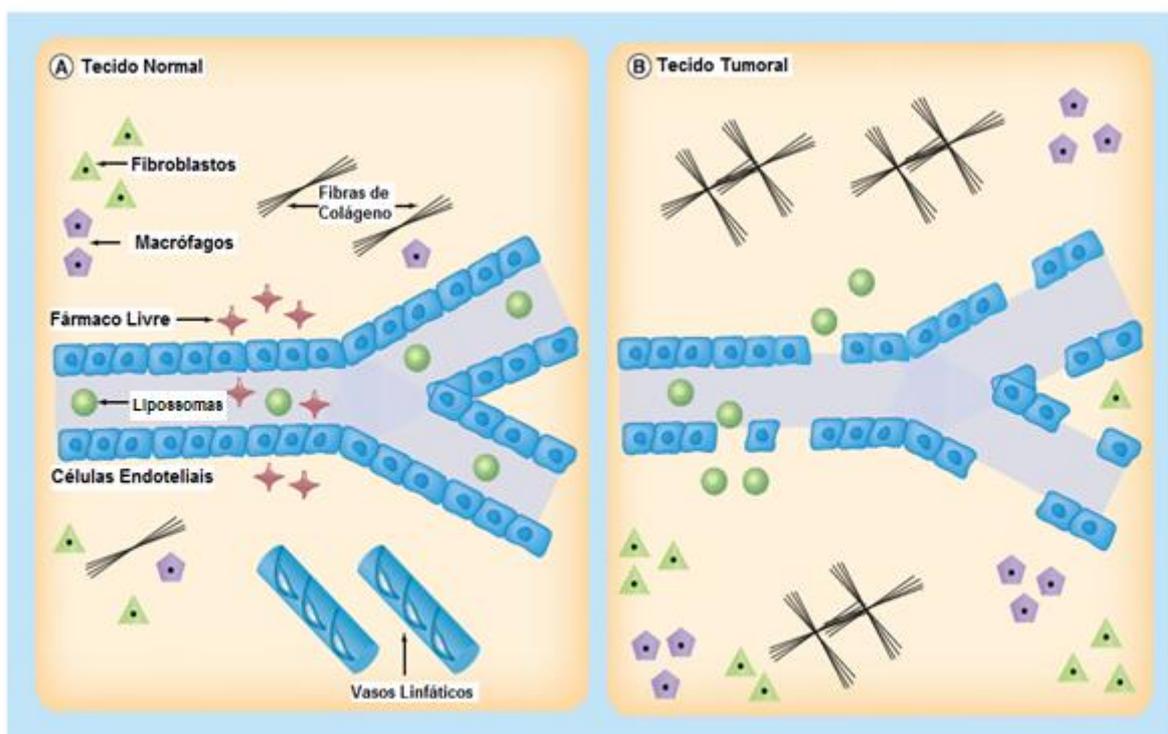


Fonte: adaptado de LASIC, 1998, p. 308.

Os lipossomas têm ganhado papel de destaque nos últimos tempos no tratamento do câncer, pois têm a capacidade de transportar fármacos para as células tumorais, em função do seu tamanho reduzido e da fisiopatologia única dos tumores. Os vasos sanguíneos presentes nos tecidos tumorais possuem fenestrações entre as células endoteliais adjacentes de tamanho até 800 nm. Além disso, na região tumoral a drenagem linfática não é adequada, levando ao acúmulo das vesículas. Esse aumento da permeabilidade e acúmulo preferencial dos lipossomas na região tumoral, é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (*Enhanced Permeability Retention - EPR*) (Figura 11). Assim lipossomas com diâmetro de até 400 nm apresentam direcionamento passivo à região tumoral, com acúmulo e liberação

do seu conteúdo nesse local, diminuindo a toxicidade sistêmica e aumentando a eficácia antitumoral (FERREIRA *et al.*, 2013).

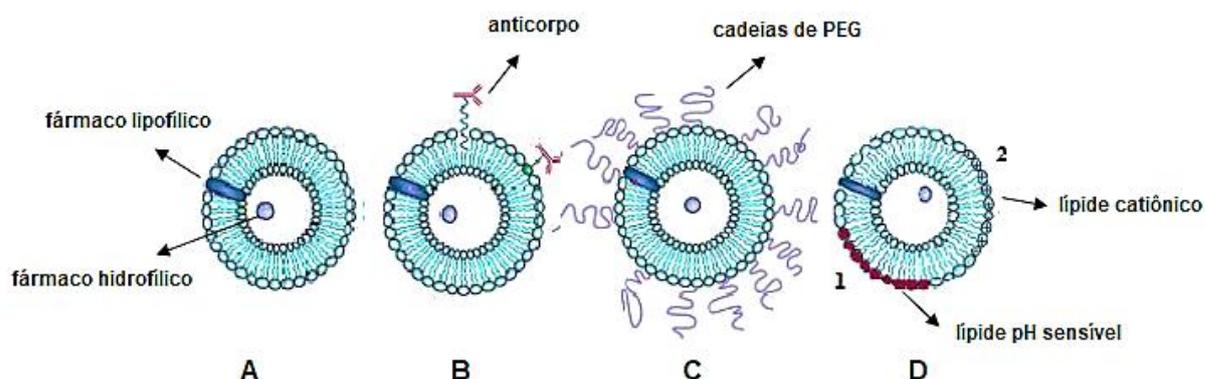
Figura 11 - Efeito EPR. Vasculatura em tecido não-tumoral com células endoteliais firmemente justapostas permitindo apenas a passagem do fármaco livre (A), vasculatura na região tumoral com fenestrações permitindo o extravasamento dos lipossomas (B)



Fonte: adaptado de FERREIRA *et al.*, 2013, p. 3.

Com relação à composição química e o mecanismo de liberação intracelular, os lipossomas podem ser classificados como convencionais, de superfície modificada, de circulação prolongada e polimórficos, incluindo nessa última, os lipossomas pH-sensíveis, termossensíveis e catiônicos (Figura 12) (TORCHILIN, 2005).

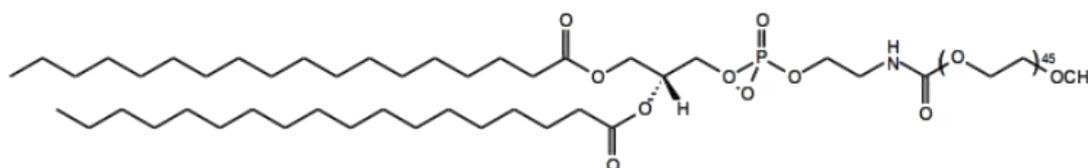
Figura 12 - Classificação dos lipossomas quanto à composição química. Lipossomas convencionais (A); lipossomas de superfície modificada com anticorpo direcionado (B); lipossomas de circulação prolongada (C); lipossomas polimórficos (D): lipossomas pH-sensíveis (1) e lipossomas catiônicos (2)



Fonte: adaptado de TORCHILIN, 2005, p. 146.

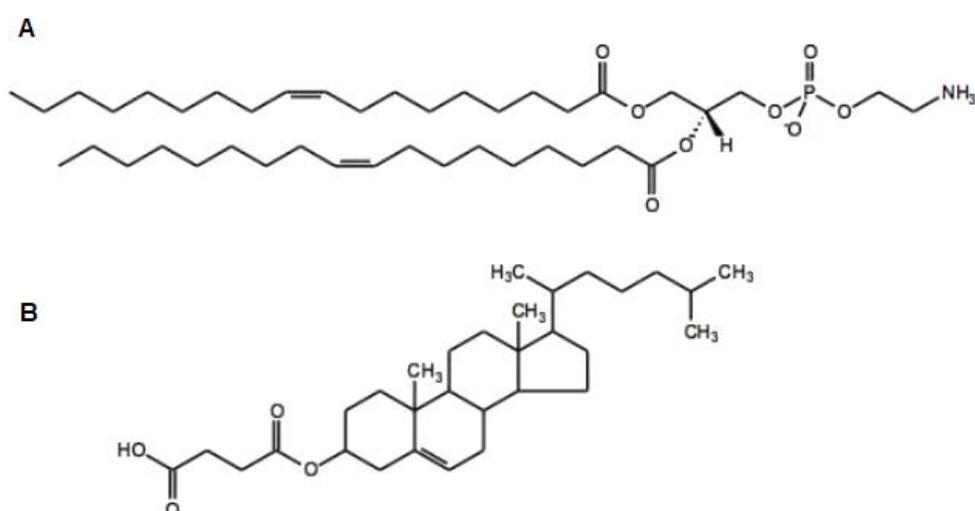
Os lipossomas convencionais são os mais simples, constituídos basicamente por fosfolípidos e colesterol. Após administração por via endovenosa, esses lipossomas são rapidamente removidos da circulação sistêmica, devido à adsorção das opsoninas em sua superfície e, conseqüentemente reconhecimento pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM). Assim, o uso desses lipossomas fica restrito a casos em que se deseja o acúmulo do fármaco em órgãos como baço, fígado e medula óssea, comprometendo sua aplicação em outras doenças. Um avanço na área da nanotecnologia levou ao desenvolvimento dos lipossomas de circulação prolongada ou furtivos, com a incorporação de um polímero hidrofílico, como o polietilenoglicol (PEG), na superfície do lipossoma que funciona como uma barreira estérica para a adesão das opsoninas, retardando a sua depuração da circulação sanguínea (TORCHILIN, 2005; IMMORDINO, 2006). O DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figura 13) é um fosfolípido associado ao PEG que vem sendo muito utilizado como constituinte das formulações lipossomais para esse propósito (ULRICH, 2002).

Figura 13 - Estrutura química da distearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀)



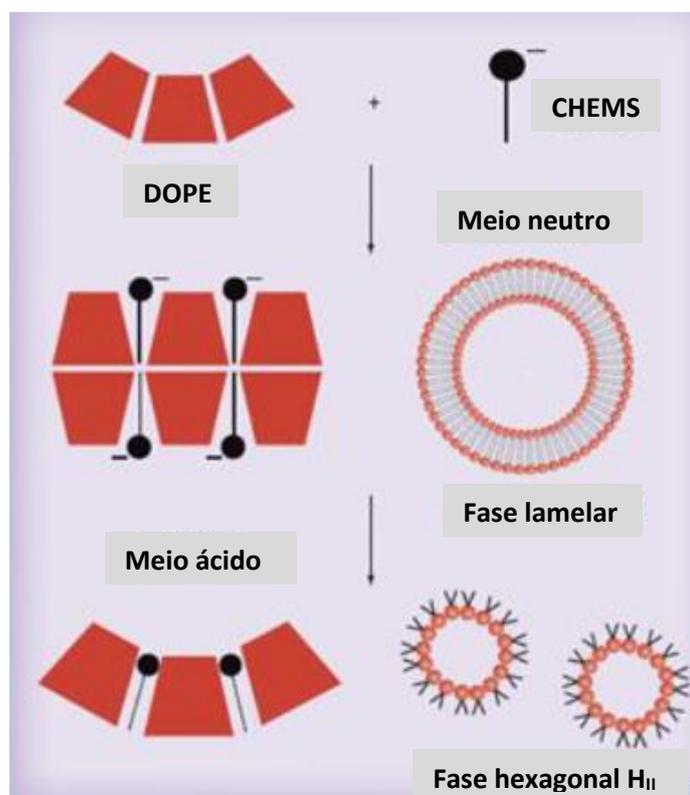
Lipossomas contendo oleandrina, digoxina e digitoxina, constituídos por derivados de PC, colesterol e DSPE-PEG apresentaram menor toxicidade, direcionamento a região tumoral e maior eficácia antitumoral, quando comparado aos cardenólídeos administrados na forma livre (HODGINS, 2004). Em geral, os lipossomas convencionais e de liberação prolongada podem apresentar uma liberação lenta do seu conteúdo e ausência de atividade fusogênica. Desta forma, a inclusão de lípides com propriedades fusogênicas na superfície dos lipossomas, resulta nos chamados lipossomas pH-sensíveis ou polimórficos, que quando submetidos a um meio ácido, como no interior dos endossomas e no tecido tumoral, são capazes de interagir e promover a fusão ou desestabilização da membrana alvo, liberando seu conteúdo diretamente no citoplasma celular. Esses lipossomas pH-sensíveis têm sido preparados com a combinação de PE ou seus derivados e um agente estabilizante que contém um grupo ácido, exemplificados pela dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) e pelo hemisuccinato de colesterila (CHEMS), respectivamente (Figura 14) (FERREIRA *et al.*, 2013).

Figura 14 – Estrutura química das moléculas de DOPE (A) e CHEMS (B)



Diferentemente da maioria dos fosfolípidos, a molécula de DOPE requer um agente estabilizante para se organizar em bicamada. A explicação para isso é que a molécula de DOPE possui uma cabeça polar pequena e pouco hidratada, que ocupa um pequeno volume comparado com o ocupado pelas respectivas cadeias de hidrocarbonetos, resultando assim, em uma organização geométrica molecular do tipo cone, que favorece interações eletrostáticas e/ou formação de ligações de hidrogênio entre o grupo amino e o fosfato da cadeia polar, justificando a forte tendência das moléculas de DOPE em se organizarem sob a forma hexagonal invertida (H_{II}). Quando ocorre a desprotonação do ácido carboxílico das moléculas de CHEMS, resultando em uma repulsão eletrostática entre os grupos fosfato e carboxilato, das moléculas de DOPE e do CHEMS, respectivamente, favorecendo a organização lamelar do sistema (Figura 15). Adicionado a isso, a presença do colesterol aumenta a estabilidade das vesículas por reduzir a permeabilidade da membrana lipídica quando associado a fosfolípido que apresenta baixa temperatura de transição de fase principal, como é o caso da DOPE. Enquanto em pH fisiológico os lipossomas permanecem estáveis, a acidificação resulta na protonação das moléculas de CHEMS, levando a desestabilização lipossomal, uma vez que as moléculas da DOPE retomam a forma H_{II}, liberando o conteúdo das vesículas (FERREIRA *et al.*, 2013).

Figura 15 - Representação esquemática da formação das fases lamelar e hexagonal da molécula de DOPE



Fonte: adaptado de FERREIRA *et al.*, 2013, p. 6.

Diante disso, o uso de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo GEV ou GEVGP pode ser uma alternativa promissora para o aumento da eficácia antitumoral e redução da toxicidade sistêmica, uma vez que essas vesículas têm um direcionamento passivo para a região tumoral pelo efeito EPR e uma liberação preferencial do seu conteúdo na região tumoral devido ao pH menor nesse ambiente comparado às regiões não-tumorais. Inicialmente, lipossomas contendo GEV foram preparados, porém não apresentaram estabilidade físico-química. Sendo assim, optou-se por encapsular o GEVGP, que por apresentar maior lipofilia, pode favorecer interações com a bicamada lipídica dos lipossomas, facilitando o processo de encapsulação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos geral

Preparar e caracterizar, do ponto de vista químico e físico-químico, uma formulação de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (LpHS-GEVGP), assim como investigar a sua potencial ação citotóxica e antitumoral.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade de GEV e GEVGP livres, em linhagens de células tumorais humanas (MDA-MB-231, MCF-7 e A549).
- Validar o método analítico para doseamento de GEVGP por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Desenvolver os LpHS- GEVGP.
- Caracterizar os LpHS-GEVGP mediante a determinação do diâmetro, potencial zeta (PZ), índice de polidispersão (IP) e teor de encapsulação (TE).
- Estudar a estabilidade química e físico-química da formulação de LpHS-GEVGP.
- Avaliar a liberação de GEVGP, em pH 5 e 7,4, a partir da formulação de LpHS-GEVGP.
- Avaliar a citotoxicidade de GEVGP e LpHS-GEVGP em linhagens de células tumorais humanas de mama (SKBR-3, MDA-MB-231 e MCF-7).
- Avaliar a citotoxicidade de GEVGP e LpHS-GEVGP em linhagem de células tumorais humanas de pulmão (A549).
- Avaliar a seletividade do GEVGP e LpHS-GEVGP para células tumorais em relação à cultura primária de fibroblastos humanos saudáveis.
- Avaliar o efeito antiproliferativo a longo prazo do GEVGP e LpHS-GEVGP, por meio do ensaio de duplicação cumulativa da população (CPD), em células A549.

- Avaliar e quantificar as células que readquirem capacidade proliferativa após tratamento com GEVGP e LpHS-GEVGP, por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica em células A549.
- Avaliar a atividade antitumoral dos LpHS-GEVGP em camundongos Balb/c nude acometidos pelo tumor de pulmão da linhagem humana A549, por meio de determinação do volume tumoral e análises histopatológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O GEV e o GEVGP foram cedidos gentilmente pelo Professor Dr. Rodrigo Maia de Pádua, do Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG (Belo Horizonte, Brasil). O ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico (HEPES), bicarbonato de sódio, CHEMS e a tripsina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os lípides DOPE e DSPE-mPEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). A acetonitrila (ACN) de grau analítico para CLAE, o cloreto de sódio e o fosfato de sódio dibásico heptahidratado foram obtidos da Merck (Frankfurter, Alemanha). DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), McCoy, MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*), sulforrodamina B e Tris base foram adquiridos da Sigma Aldrich (St Louis, EUA). Clorofórmio P.A., tween 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). Álcool isopropílico de grau analítico para CLAE, fosfato de potássio monobásico anidro P.A e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Células das linhagens tumorais MCF-7 (ATCC® HTB22™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™), SKBR-3 (ATCC® HTB30™) e A549 (ATCC® CCL185™) foram adquiridas da ATCC (Manassas, EUA). Fibroblastos humanos não-tumorais oriundos de cultura primária de tecido gengival foram isolados pela Dra. Ariadne Cruz e cedidos gentilmente pela Professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, número 021/2009). O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, EUA). A solução de xilazina (Dopaser® 2%) foi adquirida da Hertape Calier (Juatuba, Brasil). A solução de cloridrato de ketamina (Dopalen® 10%) foi fornecida pela Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil). Os animais Balb/c nude fêmeas foram adquiridos no Biotério da Faculdade de Medicina da USP (São Paulo, Brasil). As demais substâncias utilizadas foram de grau analítico.

4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para doseamento de GEVGP por CLAE

A validação foi realizada para demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina. Os parâmetros considerados para a validação do método de doseamento de GEVGP por CLAE foram especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação (ANVISA, 2003).

4.2.1 Condições cromatográficas

Foi utilizado um equipamento Agilent 1260 Infinity, composto por uma bomba modelo G1311B, auto-injetor G1329B, forno de coluna G1316A e detector G4212B (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), monitorado por um computador utilizando um *software* Agilent OpenLab CDS EZChrom[®]. Partindo de trabalho anterior, foram modificadas as condições cromatográficas, para o desenvolvimento do método analítico de doseamento de GEVGP (PÁDUA, 2003). Para separação foi utilizado como fase estacionária uma coluna LiChrospher[®] RP-18 250-4,6mm (5 µm) LiChrocart[®] Merck. A fase móvel utilizada era constituída por ACN e água, eluição gradiente (Tabela 2), em fluxo de 1mL/minuto. O volume das injeções foi de 10 µL e o tempo de corrida de 16 minutos. O material eluído foi detectado em comprimento de onda igual a 220 nm, a 40 °C.

Tabela 2 - Gradiente de eluição utilizado nas análises de GEVGP por CLAE

Tempo (minutos)	ACN (%)	Água (%)
0	30	70
6	95	5
12	95	5
12,5	30	70
16	30	70

4.2.2 Especificidade

Para determinação da possível interferência dos componentes lipídicos na quantificação de GEVGP, comparou-se o cromatograma obtido para uma solução de GEVGP (6 µg/mL), com o cromatograma obtido após solubilização de lipossomas brancos (na ausência de GEVGP). A especificidade do método foi realizada por meio da sobreposição e análise dos cromatogramas obtidos.

4.2.3 Linearidade

Para a determinação da linearidade foi construída uma curva padrão composta de cinco pontos referentes às diferentes concentrações da solução de GEVGP em ACN, preparadas em triplicata. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque (SE) de 200 µg/mL de GEVGP, solubilizando-se 2 mg de GEVGP em 10 mL de ACN, em balão volumétrico. A partir dessa solução, foram realizadas diluições para se obter as soluções de trabalho em cinco níveis de concentração de GEVGP (Tabela 3). As soluções foram analisadas em triplicata por CLAE, utilizando-se as condições descritas no item 4.2.1. As áreas dos picos foram registradas e utilizadas para a construção da curva analítica. Os valores dispersos (*outliers*) foram avaliados pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados, com verificação prévia das premissas de normalidade (Teste de Ryan-Joiner) e homocedasticidade (Teste de Levene modificado) (ANVISA, 2003). Os testes foram realizados em planilhas do *software* Microsoft Excel® (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; SOUZA, 2007). Para avaliação da linearidade do método analítico, o coeficiente de correlação (r), o coeficiente angular (b) e o coeficiente linear (a) foram estimados (ANVISA, 2003).

Tabela 3 - Preparo das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método de doseamento de GEVGP por CLAE

Intervalo (%)	Volume da SE (µL)	ACN q.s.p. (mL)	Concentração de GEVGP (µg/mL)
33,3	50	5	2
66,7	100	5	4
100	150	5	6
133,3	200	5	8
166,7	250	5	10

4.2.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em um mesmo dia (intradia ou repetibilidade) e em dias diferentes (interdia ou precisão intermediária) conforme descrito a seguir (ANVISA, 2003). A partir de uma SE de GEVGP 200 µg/ mL foram preparadas soluções de GEVGP, em triplicata, a 2 µg/mL (menor concentração), 6 µg/mL (concentração média) e 10 µg/mL (maior concentração) em ACN, as quais foram injetadas em cromatógrafo líquido, utilizando as condições descritas no item 4.2.1. A precisão do método analítico foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), dado pela fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. A precisão do método foi demonstrada pela obtenção de valores de DPR inferiores a 5% (ANVISA, 2003).

4.2.5 Exatidão

Foi adicionado aos lipossomas brancos (LpHS brancos), quantidade de SE de GEVGP 200 µg/ mL, para obter em triplicata, soluções de LpHS brancos contendo GEVGP a 2 µg/mL (menor concentração), 6 µg/mL (concentração média) e 10 µg/mL (maior

concentração). Os resultados da exatidão foram expressos em porcentagem de recuperação de GEVGP adicionado ao LpHS brancos, conforme a fórmula:

$$\text{recuperação de GEVGP (\%)} = \frac{\text{GEVGP exp.}}{\text{GEVGP teo.}} \times 100$$

onde, $\text{GEVGP}_{\text{exp.}}$ é a concentração de GEVGP determinada experimentalmente e $\text{GEVGP}_{\text{teo.}}$ é a concentração teórica de GEVGP adicionada à amostra. A faixa aceitável adotada foi entre 98% a 102% (GREEN, 1996).

4.2.6 Robustez

A avaliação da robustez do método foi realizada alterando o fluxo da fase móvel em $\pm 10\%$ e a temperatura da coluna em $\pm 12,5\%$. A partir da SE de GEVGP 200 $\mu\text{g/mL}$ foram preparadas soluções na concentração de trabalho (6 $\mu\text{g/mL}$), que foram analisadas alterando as condições cromatográficas propostas neste item. Os resultados foram expressos como a média da concentração do GEVGP, sendo a faixa aceitável adotada de 95% a 105% (ANVISA, 2003).

4.2.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A determinação do LD e LQ foi realizada com base nas fórmulas a seguir:

$$LD = \frac{3,3 DP_a}{IC}$$

$$LQ = \frac{10 DP_a}{IC}$$

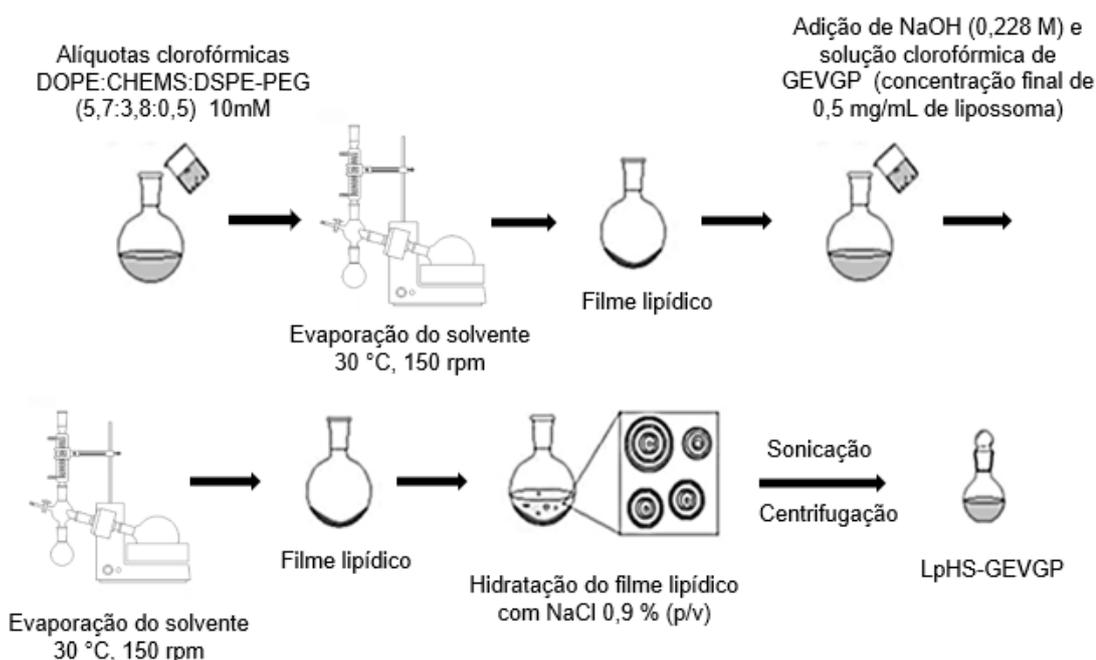
onde, LD é o limite de detecção estimado ($\mu\text{g/mL}$), LQ é o limite de quantificação estimado ($\mu\text{g/mL}$), DP_a é o desvio padrão do coeficiente linear (a) e IC é a inclinação da curva de calibração (b) (ANVISA, 2003).

4.3 Preparo dos LpHS-GEVGP

Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico (BANGHAM, 1965), seguido de redução do tamanho por sonicação (Figura 16). Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS, DSPE-mPEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 10 mM; razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram

transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação do solvente em rotavapor da marca Buchi Labortechnik AG, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça), em banho maria a 30 °C e rotação de 150 rpm. Em seguida, adicionou-se ao filme lipídico, uma solução de NaOH (0,228 M), para promover ionização completa das moléculas de CHEMS. O filme lipídico contendo NaOH foi solubilizado em clorofórmio e em seguida foi adicionada a solução clorofórmica contendo GEVGP (concentração final de 0,5 mg/mL), a fim de evitar a hidrólise em pH básico dos grupos hidroxila acetilados e/ou abertura do anel lactônico do derivado cardenolídeo. A mistura foi novamente submetida à evaporação sob as mesmas condições. O filme lipídico final foi hidratado à temperatura ambiente com solução de NaCl 0,9% (p/v) mediante agitação em vórtex. Os LpHS brancos foram preparados nas mesmas condições descritas acima, sem adição de GEVGP e a hidratação com solução de NaCl 0,9% (p/v) foi realizada logo após a adição de NaOH. A redução do tamanho das vesículas multilamelares foi realizada mediante sonicação no sonicador da marca Cole Parmer® modelo CPX500, durante 5 minutos em amplitude de 21%. O material não encapsulado foi removido por centrifugação na centrífuga baby Thermo Scientific® modelo 11210801, a 5000 rpm por 1 minuto.

Figura 16 - Esquema de preparo dos LpHS-GEVGP



Fonte: adaptado de LOPES, 2014, p. 72.

4.4 Caracterização química e físico-química dos LpHS-GEVGP

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro, IP, PZ e TE conforme descrições abaixo.

4.4.1 Determinação do diâmetro, IP e PZ

O diâmetro e o IP das vesículas foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando o equipamento Malvern Zeta Sizer nano series ZS90 (Malvern, Inglaterra). As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente, a 25 °C, utilizando um ângulo de incidência do laser de 90°. O PZ das vesículas foi determinado por DLS associado à mobilidade eletroforética utilizando o mesmo equipamento. Para a realização de ambas as medidas, 50 µL de lipossomas foram diluídos em 1 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) filtrada em 0,45 µm. As medidas foram feitas em triplicata e os resultados foram apresentados como a média ± desvio padrão.

4.4.2 Determinação do TE de GEVGP em LpHS-GEVGP

A determinação da porcentagem de GEVGP encapsulado em LpHS-GEVGP foi realizada por CLAE, empregando as condições descritas no item 4.2.1. Inicialmente, a membrana lipídica dos lipossomas foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:5, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída em ACN e injetada no cromatógrafo. O teor de GEVGP foi determinado nos lipossomas antes (GEVGP total) e após centrifugação (GEVGP encapsulado) e calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TE (\%) = \frac{GEVGP \text{ encapsulado}}{GEVGP \text{ total}} \times 100$$

4.5 Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP

As amostras de LpHS-GEVGP foram mantidas em geladeira, entre 4 °C a 8 °C, em frascos de penicilina com atmosfera de nitrogênio. A estabilidade da formulação foi avaliada nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 90 dias. Após cada tempo do estudo, as amostras foram verificadas quanto ao teor de GEVGP presente nas vesículas, diâmetro médio, IP e PZ. Para o doseamento do GEVGP, as amostras foram submetidas a centrifugação a 25 °C, 5000 rpm durante 1 minuto antes da análise por CLAE. Essa etapa objetiva purificar a amostra, uma vez que elimina o GEVGP que foi

expulso das vesículas durante o tempo de armazenamento. A determinação do teor de GEVGP nos lipossomas em cada tempo de estabilidade, foi realizada conforme as condições descritas no item 4.2.1. Inicialmente, a membrana lipídica dos lipossomas foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:5, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída em ACN e injetada no cromatógrafo.

4.6 Estudo de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP

O estudo de liberação foi realizado em dois meios com diferentes pH, sendo eles 5 e 7,4. Para ambos, o estudo foi realizado de maneira semelhante, como segue. Foram colocados 370 µL de formulação em membrana de celulose para diálise com *cut-off* 10 KDa da marca Sigma, a qual teve as duas extremidades vedadas. A membrana foi inserida em um frasco contendo 100 mL de tampão HEPES acrescido de Tween 80 (1% p/v) para garantir a condição *sink* para o GEVGP (185 µg de GEVGP em 100 mL do tampão descrito acima). No caso do estudo em pH 7,4 o pH da solução receptora foi ajustado até esse valor utilizando NaOH 1M. Para cada tempo de investigação (0, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas) existiu um frasco correspondente. Os frascos foram mantidos em agitador orbital da incubadora IKA KS 4000 i control (Xangai, China) a 37 °C, sob agitação de 156 rpm. Posteriormente, a cada tempo de investigação, uma amostra foi retirada do interior da membrana de diálise e procedeu-se com a caracterização das mesmas para os parâmetros de diâmetro médio, IP, PZ e teor de GEVGP. Foram realizados três experimentos independentes para cada tempo avaliado.

4.7 Estudos *in vitro*

4.7.1 Culturas celulares

A atividade citotóxica foi avaliada em três linhagens celulares de tumores de mama humana com diferentes padrões de expressão gênica, MDA-MB-231 (triplo negativa), SKBR3 (HER2⁺) e MCF-7 (ER⁺), uma linhagem celular de tumor de pulmão humano A549 (CPCNP) e em fibroblastos humanos não-tumorais oriundos de tecido gengival.

Todas as linhagens celulares utilizadas foram mantidas em frascos de cultura celular T-75 da marca Corning® em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. As células MDA-MB-231 e os fibroblastos foram mantidos em DMEM, SKBR3 em meio McCoy, MCF-7 em MEM suplementado com insulina (10mg/L) e A549 em MEM.

As culturas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C, sendo realizado subcultivo celular a cada dois ou três dias.

4.7.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Sulforrodamina B

O ensaio de Sulforrodamina B foi realizado nas quatro linhagens celulares humanas tumorais e nos fibroblastos humanos não-tumorais. Após contagem no hemocítômetro, suspensões de cada linhagem celular foram distribuídas em placas de 96 cavidades (1x10⁴ células/cavidade) e mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, soluções de GEV livre, GEVGP livre, LpHS-GEVGP e LpHS brancos foram adicionadas às cavidades (intervalo de concentração de GEV e GEVGP de 0,001 µM a 5 µM nas linhagens tumorais e de 0,4 µM a 50 µM de GEVGP em fibroblastos não-tumorais). Em todas as linhagens celulares tumorais foi adicionado um tratamento com fármaco utilizado na clínica, como controle positivo do experimento. A doxorubicina (DXR) foi testada nas três linhagens celulares de tumor de mama (intervalo de concentração de 0,05 µM a 50 µM) e o paclitaxel (PTX) na linhagem celular de tumor de pulmão (intervalo de concentração de 0,001 nM a 10 µM). Após 48 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, sem remover o sobrenadante, foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético 10% (p/v) em cada cavidade. Em seguida, as placas foram mantidas a 4 °C por 1 hora. Após esse período, as cavidades foram lavadas com água destilada e as placas foram mantidas a temperatura ambiente para secagem. Após totalmente secas, foram adicionados 100 µL da solução de sulforrodamina B 0,057% (p/v) em cada cavidade e o corante foi mantido nas placas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período as cavidades foram lavadas com solução de ácido acético 1% (v/v) para remover o corante não ligado às proteínas. Novamente as placas foram mantidas a temperatura ambiente para secagem. Após totalmente secas foram adicionados 100 µL da solução de Tris base 10 mM (pH 10,5) em cada cavidade para solubilizar o corante ligado as proteínas celulares. Em seguida, foram realizadas as leituras a 510 nm em um espectrofotômetro de placas modelo Spectra Max Flux 384, da marca Molecular Devices®, utilizando o *software* Softmax Pro 6.51®. Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens celulares diferentes, para cada linhagem celular. Após subtrair todos os valores do branco (Tris base), a porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela porcentagem de absorbância em relação ao controle não tratado de células, que foi considerado como 100% de viabilidade

celular. Os percentuais de viabilidade celular foram transferidos para o *software* de estatística GraphPad Prism versão 6 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, EUA), e, por meio de análise de regressão não linear, foram calculados os valores de CI_{50} , ou seja, a concentração de cada amostra que reduz em 50% a viabilidade celular. Os valores de CI_{50} foram apresentados como média \pm desvio padrão.

4.7.3 Seletividade

A seletividade do GEVGP livre e LpHS-GEVGP para as células tumorais em relação aos fibroblastos não-tumorais de gengiva humana obtidos por cultura primária, foi determinada utilizando o ensaio de Sulforrodamina B, conforme descrito acima. O uso de culturas de fibroblastos se dá pela fácil obtenção dessas células por biopsia e do fato de, após isolamento e estabelecimento das culturas, os fibroblastos apresentarem uma proliferação rápida e contínua na presença de soro, comparativamente a outros tipos de células que necessitam de fatores de crescimento adicionais (TAKASHIMA, 1998).

Depois de calculados os valores de CI_{50} das amostras nas diferentes linhagens tumorais e nos fibroblastos não-tumorais, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), dado pela fórmula:

$$IS = \frac{CI_{50 \text{ FIB}}}{CI_{50 \text{ TUM}}}$$

onde $CI_{50 \text{ FIB}}$ equivale ao valor de CI_{50} em fibroblastos não-tumorais, e $CI_{50 \text{ TUM}}$ equivale ao valor de CI_{50} em linhagem tumoral (SILVA, 2013).

4.7.4 Duplicação cumulativa da população

Células tumorais da linhagem A549 foram distribuídas em placas de 12 poços (10^5 células/cavidade) e mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO_2 , a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, soluções de GEVGP livre, LpHS-GEVGP, LpHS brancos e PTX foram adicionadas às cavidades nas respectivas concentrações de CI_{50} e as placas foram mantidas incubadas durante 48 horas. Em seguida, as células sobreviventes foram contadas, replaqueadas em placas de 12 poços ($2,5 \times 10^4$ células/cavidade) e avaliadas durante 21 dias. A cada três a cinco dias, respeitando a confluência máxima de 80%, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas, e a cinética de crescimento das células foi determinada. Após esse tempo, foi plotado

um gráfico de CPD em função do tempo, a fim de facilitar a visualização do momento que as células tumorais resistentes ao tratamento readquiriram ou não capacidade proliferativa. O gráfico e os parâmetros de CPD foram analisados em planilhas específicas utilizando o Excel® 2016 (SILVA *et al.*, 2016).

4.7.5 Ensaio clonogênico

Células tumorais da linhagem A549 foram distribuídas em placas de 12 poços (10^5 células/cavidade) e mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO_2 , a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, soluções de GEVGP livre, LpHS-GEVGP, LpHS brancos e PTX foram adicionadas às cavidades nas respectivas concentrações de CI_{50} e as placas foram mantidas incubadas durante 48 horas. Em seguida, as células sobreviventes foram contadas, replaqueadas em placas de 6 poços (200 células/cavidade) e avaliadas durante 21 dias, sendo realizada troca do meio de cultura a cada três dias. Após 21 dias de experimento, as células foram fixadas com álcool 70° GL e coradas com corante de Giemsa.

Agregados com mais de 50 células foram classificados como sobreviventes e reconhecidos como clone. Os clones foram identificados por meio de análise em microscópio óptico no aumento de 5 x. Considerou-se o número de clones referentes ao grupo sem tratamento (controle celular) correspondentes a 100% de viabilidade celular (LOPES, 2012). O percentual do número de clones nas amostras testadas foi calculado em relação ao controle negativo, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{número de colônias (\%)} = \frac{\text{número de colônias na amostra}}{\text{número de colônias do controle celular}} \times 100$$

A imagem representativa das colônias após os tratamentos foi obtida através de fotografia macroscópica dos poços da placa de cultivo.

4.8 Estudos *in vivo*

4.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c nude fêmeas, entre seis-sete semanas de idade (pesando aproximadamente 20 g), adquiridos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de

plástico com maravalha, ração e água autoclavadas, em ambiente com controle de ciclo de luz e temperatura. Os estudos *in vivo* foram realizados sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG – Protocolo 303/2017. Esse estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André Luís Branco de Barros e a Profa. Dra. Elaine Amaral Leite, ambos da Faculdade de Farmácia da UFMG, e com o Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.8.2 Implante das células A549 em animais Balb/C nude

No momento em que as células A549 atingiram a fase logarítmica de crescimento, as mesmas foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura incompleto com uma densidade de 10^6 células/ 50 μ L. A suspensão celular foi misturada em Matrigel[®] (1:1) e 100 μ L dessa mistura foram inoculados, subcutaneamente, no flanco inferior direito de cada animal. Os animais foram acompanhados quanto ao peso e medidas quantitativas do volume tumoral durante todo o período do experimento, em intervalos de dois dias.

4.8.3 Tratamento dos animais

No vigésimo quinto dia após o inóculo das células tumorais, os animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos experimentais, os quais receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 – LpHS brancos (controle negativo)

Grupo 2 – PTX 10 mg/Kg (controle positivo)

Grupo 3 – LpHS-GEVGP 0,5 mg/kg

Grupo 4 – LpHS-GEVGP 1,0 mg/kg

Grupo 5 – LpHS-GEVGP 2,0 mg/kg

Para o preparo da solução de PTX 2,0 mg/mL, foram solubilizados 30 mg de PTX em Cremophor[®]:álcool etílico 98% (1:1) em balão volumétrico de 2 mL. No momento do tratamento, 133 μ L da solução anterior foi misturada à 867 μ L de NaCl 0,9% (p/v), obtendo assim a solução na concentração final.

Os tratamentos foram administrados por via endovenosa, com intervalo entre as doses de três dias, em um total de seis administrações. O primeiro dia de administração foi considerado o dia 0 do estudo e os tratamentos foram, portanto, administrados nos

dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15. Os tratamentos foram administrados pela veia caudal, em um volume de 100 μ L, utilizando seringas de insulina de 1 mL.

4.8.4 Avaliação da atividade antitumoral

4.8.4.1 Volume tumoral e peso dos animais

O acompanhamento do volume tumoral e do peso dos animais foi realizado a cada dois dias, desde o primeiro dia do tratamento até cinco dias após o fim do tratamento. O volume tumoral foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $VT = 0,5 \times (d1 \times d2^2)$, onde $d1$ e $d2$ representam o maior e o menor diâmetros perpendiculares, respectivamente, medidos com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Tóquio, Japão) (ROLLAND *et al.*, 2009). A variação do volume tumoral foi determinada considerando-se o volume inicial (dia 0) como 100% e calculando-se a porcentagem de aumento ou redução do volume de acordo com esse volume inicial.

No final do período experimental (5 dias após o último tratamento), o volume relativo do tumor (VRT) foi calculado de acordo com a fórmula:

$$VRT = \frac{\text{volume do tumor no dia 20}}{\text{volume do tumor no dia 0}}$$

A porcentagem de inibição do crescimento do tumor (IC) também foi determinada mediante o emprego da seguinte equação:

$$IC = 1 - \frac{VRT \text{ do grupo tratado}}{VRT \text{ do grupo controle negativo (LpHS brancos)}} \times 100$$

4.8.4.2 Avaliação histopatológica

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical quarenta e seis dias após a inoculação das células tumorais A549. Fígado, baço, rins e os tumores foram removidos para avaliação histopatológica. Os fragmentos dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 μ m de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas utilizando câmera digital Spot Insign Color adaptado a um microscópio Olympus BX-41 (Hamburgo, Alemanha) e o *software* de captura SPOT® versão 3.4.5.

4.9 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram analisados com o *software* GraphPad Prism versão 6 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste KS e D'Agostino e Pearson e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pela equação $y = \log(100 + \text{variável})$. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância seguida do teste de Tukey. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da citotoxicidade de GEV e GEVGP por Sulforrodamina B

A sulforrodamina B é um corante brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfônicos, que tem capacidade de ligar-se à componentes proteicos de células previamente fixadas com ácido tricloroacético. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à massa celular, uma vez que a ligação do corante com o conteúdo proteico é estequiométrica (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade de GEV e GEVGP livres, conforme descrito no item 4.7.2, em três linhagens tumorais humanas, para selecionar qual dos dois compostos seria encapsulado em lipossomas. Os valores de CI_{50} obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de CI_{50} de GEV e GEVGP para diferentes linhagens celulares tumorais

Linhagens celulares	CI_{50} (μM)		
	GEV	GEVGP	Digoxina
MDA-MB-231	0,280 \pm 0,059	0,170 \pm 0,007	0,998 \pm 0,156*
MCF-7	0,583 \pm 0,069*	0,347 \pm 0,032	ND
A549	0,013 \pm 0,003*	0,044 \pm 0,008	ND

Foram realizados três experimentos e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. *Valores significativamente diferentes em relação aos valores representados na mesma linha ($p < 0,05$). ND = não determinado.

Pela análise da Tabela 4, pode-se observar que o valor de CI_{50} da digoxina na linhagem celular MDA-MB-231 foi cerca de 3,5 e 5,8 vezes maior em relação ao GEV e GEVGP, respectivamente. Esse resultado está em acordo com o apresentado por Carvalho (2012), confirmando que alterações na estrutura dos cardenolídeos podem potencializar a atividade citotóxica desses compostos frente às células tumorais. Para GEV e GEVGP livres, não houve diferença significativa entre os valores de CI_{50} nessa mesma linhagem celular.

Para as outras duas linhagens celulares testadas (MCF-7 e A549), há diferença significativa entre os valores de CI_{50} após os tratamentos com GEV e GEVGP. Ambos os compostos apresentaram baixos valores de CI_{50} , e, portanto, foram potencialmente citotóxicos para as células tumorais avaliadas. Como a encapsulação do GEV em

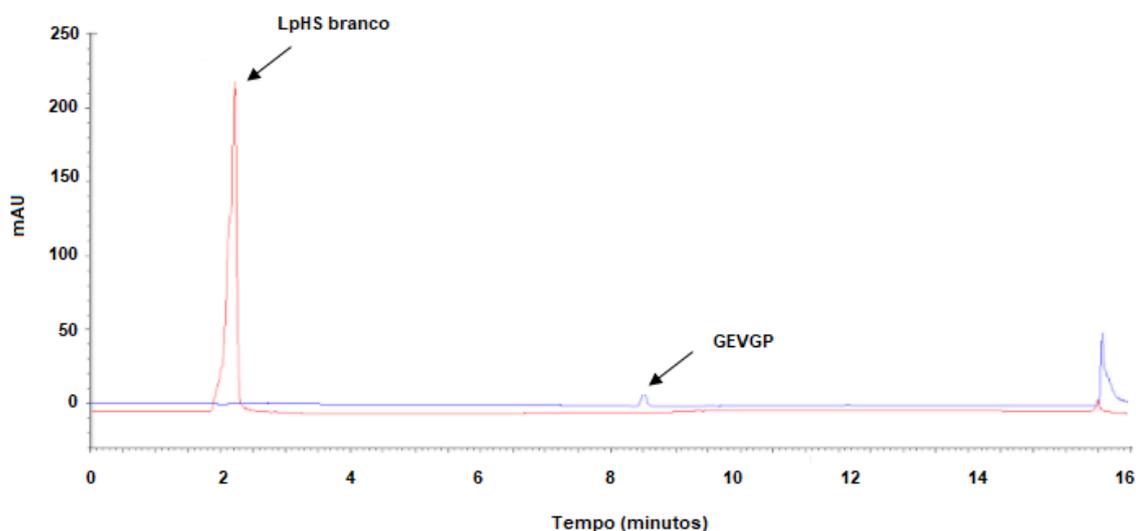
lipossomas não apresentou estabilidade, o GEVGP foi selecionado para ser encapsulado em lipossomas, por apresentar maior lipofilia, permitindo assim, fortes interações com a bicamada lipídica das vesículas, favorecendo assim o processo de encapsulação.

5.2 Validação do método analítico para doseamento de GEVGP por CLAE

5.2.1 Especificidade

A especificidade de um método analítico é demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de outros componentes tais como, impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2003). Na Figura 17 estão apresentados o cromatograma da solução de GEVGP na concentração de 6 µg/mL (em azul) e o cromatograma obtido para os LpHS brancos (em vermelho). O tempo de retenção do GEVGP foi de aproximadamente 8,5 minutos. A análise de sobreposição dos cromatogramas demonstrou que no cromatograma obtido para os LpHS brancos não foi observado nenhum pico interferente próximo ao tempo de retenção do GEVGP, indicando que os componentes lipídicos da formulação lipossomal não interferiram na determinação do GEVGP. Assim, o método analítico descrito é específico para determinação do GEVGP (ANVISA,2003).

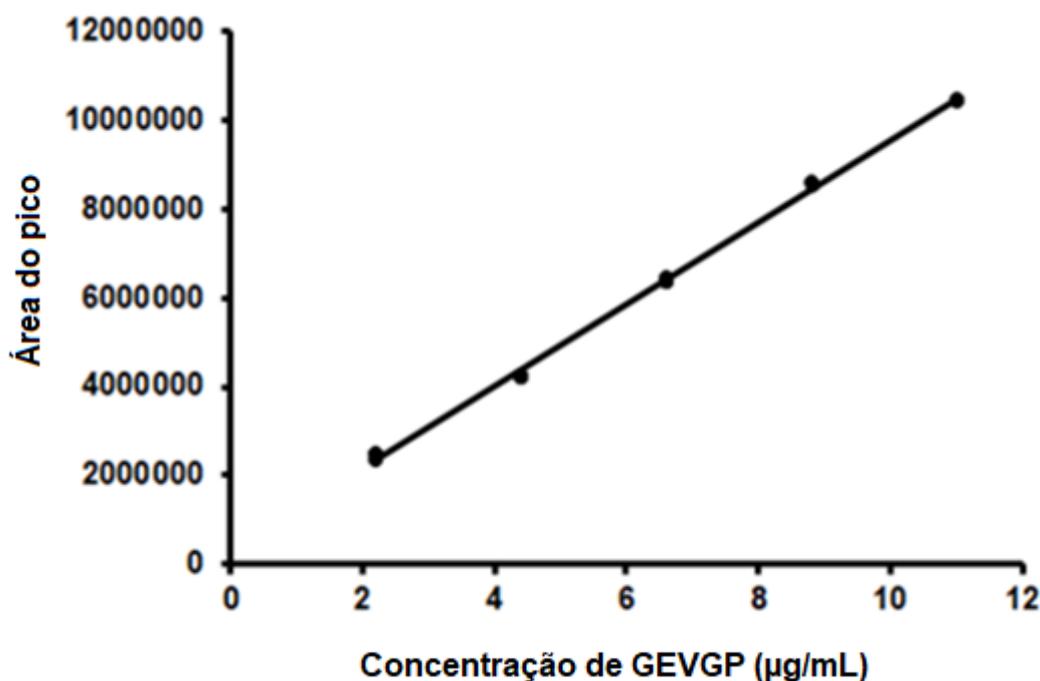
Figura 17 – Sobreposição de perfis cromatográficos obtidos para solução de GEVGP (em azul) e lipossomas brancos (LpHS brancos, em vermelho)



5.2.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse, dentro de um determinado intervalo (ANVISA, 2003). A linearidade do método analítico para doseamento de GEVGP por CLAE foi confirmada pela construção da curva padrão no intervalo de concentração de 2 a 10 µg/mL. Foram aplicados os testes estatísticos para avaliar as premissas da regressão linear simples. O diagnóstico de *outliers* foi realizado pelo resíduo padronizado de *Jackknife* e, foram detectados dois *outliers*. Para avaliar se os resíduos seguem a distribuição normal, foi aplicado o teste de *Ryan-Joiner*, no qual verificou-se que os resíduos seguem a distribuição normal, com $R_{eq} (0,9653) > R_{crítico} \alpha = 0,05 (0,9315)$. Foi verificado que há homocedasticidade, pelo teste de Levene modificado. Após análise de variância (ANOVA), concluiu-se que a regressão linear é altamente significativa e que não há desvio da linearidade. A equação da reta obtida foi $y = 926704 x + 296700$ (Figura 18) e o coeficiente de correlação linear obtido foi satisfatório ($r = 0,9984$), em conformidade com o especificado ($r > 0,99$) (ANVISA, 2003).

Figura 18 – Representação gráfica da curva de calibração para o doseamento de GEVGP obtida pelo método de CLAE



5.2.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos a partir de ensaios com amostras preparadas em condições idênticas, no mesmo dia e em dias diferentes, conforme descrito no método analítico a ser validado (ANVISA, 2003). Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios das áreas dos picos e de DPR referentes às soluções de GEVGP, nas concentrações de 2, 6 e 10 µg/mL, determinados em um mesmo dia e em dias diferentes, respectivamente.

Tabela 5 – Determinação da precisão intradia e interdia do método de doseamento de GEVGP por CLAE

Dia	Área do pico	Concentração de GEVGP (µg/mL)	DPR	
			Intradia	Interdia
1	2473985	2,35	3,06	2,57
	2474253	2,35		
	2326006	2,19		
	2387782	2,26		
	2389974	2,26		
2	2399444	2,27	1,9	
	6363680	6,55		
1	6352358	6,53	0,81	1,00
	6460723	6,65		
	6506346	6,70		
2	6497017	6,69	0,85	
	6393255	6,58		
1	10417677	10,92	3,34	4,46
	10473373	10,98		
	11146505	11,71		
	10664020	11,19		
2	10743427	10,45	2,57	
	11178331	11,74		

Os valores de DPR foram inferiores a 5%, indicando boa precisão do método analítico empregado para doseamento do GEVGP (ANVISA, 2003).

5.2.4 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados obtidos pelo método analítico em estudo em relação ao valor aceito como verdadeiro. É expressa pela relação percentual de recuperação do analito adicionado em concentrações conhecidas à amostra (ANVISA, 2003). Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para a determinação da exatidão do método de doseamento de GEVGP por CLAE.

Tabela 6 – Determinação da exatidão do método de doseamento de GEVGP por CLAE

Concentração teórica de GEVGP (µg/mL)	Área do pico	Concentração calculada de GEVGP (µg/mL)	Recuperação média de GEVGP (%)	DPR
2,1	2247392	2,10	100,93	1,37
	2299289	2,15		
	2243858	2,10		
6,3	6035018	6,19	99,49	0,97
	6141786	6,31		
	6133623	6,29		
10,5	10023406	10,49	101,12	1,02
	10223410	10,71		
	10171409	10,65		

O método apresentou exatidão adequada, uma vez que a recuperação média de GEVGP para cada nível de concentração avaliado permaneceu no intervalo de 98 a 102% (GREEN, 1996).

5.2.5 Robustez

A robustez é definida como a capacidade de um método analítico em resistir à pequenas e deliberadas variações analíticas (ANVISA, 2003). Na Tabela 7 estão apresentados os resultados de robustez obtidos após duas alterações no fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. O método analítico apresentou robustez, uma vez que o teor médio de GEVGP nas amostras quantificadas permaneceu no intervalo de 95 a 105% em todas as condições testadas (ANVISA, 2003).

Tabela 7 – Determinação da robustez do método de doseamento de GEVGP por CLAE

Gradiente de ACN:água (condição descrita no item 4.2.1)										
Amostras	Fluxo 1mL/min		Fluxo 0,9mL/min		Fluxo 1,1mL/min		Fluxo 1mL/min		Fluxo 1mL/min	
	40 °C		40 °C		40 °C		35 °C		45 °C	
	Área do pico	Teor (µg/mL)	Área do pico	Teor (µg/mL)	Área do pico	Teor (µg/mL)	Área do pico	Teor (µg/mL)	Área do pico	Teor (µg/mL)
1	5931951	6,08	5963589	6,12	6048219	6,21	5908888	6,06	5826210	5,97
2	5891175	6,03	6144715	6,31	5991122	6,14	5877711	6,02	5863378	6,01
3	5995735	6,15	6065509	6,22	5751688	5,89	5854286	6,00	5870339	6,01
4	5862481	6,00	6276425	6,45	5859240	6,00	5850971	5,99	5846399	5,99
5	5797935	5,93	6140904	6,31	5802035	5,94	5799759	5,94	5797735	5,94
Teor médio (µg/mL)		6,04		6,28		6,03		6,00		5,98
Teor (%)		100,63		104,66		100,46		99,99		99,69
DPR		1,37		1,85		2,23		0,73		0,5

5.2.6 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Os LD e LQ foram determinados conforme as equações descritas no item 4.2.7 e os resultados estão descritos abaixo:

$$LD = 0,028 \mu\text{g/mL}$$

$$LQ = 0,085 \mu\text{g/mL}$$

5.3 Caracterização química e físico-química dos LpHS-GEVGP

As características químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVGP estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Características químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVGP

Parâmetros avaliados	LpHS-GEVGP
Diâmetro médio (nm)	182,2 ± 2,7
IP	0,363 ± 0,033
PZ (mV)	-2,37 ± 0,31
TE de GEVGP (%)	75,0 ± 7,7
TE de GEVGP (mg/mL)	0,38 ± 0,04

Foram realizados quatro experimentos e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

O diâmetro médio e a distribuição das vesículas são parâmetros de grande importância, especialmente quando os lipossomas são destinados a uso terapêutico por via parenteral (LAOUINI *et al.*, 2012). Nanopartículas com um diâmetro entre 50 e 400 nm podem ser utilizadas para entrega direcionada de fármacos em tecidos tumorais (SIAFAKA *et al.*, 2016). O diâmetro médio dos LpHS-GEVGP foi de 182,2 ± 2,7 nm, permitindo que a formulação apresente direcionamento passivo à região tumoral, com acúmulo e liberação do seu

conteúdo nesse local, diminuindo a toxicidade sistêmica e aumentando a eficácia antitumoral (FERREIRA *et al.*, 2013). O valor de IP igual a 0,36 indica uma proximidade na distribuição de tamanho dos lipossomas (RAMADASS *et al.*, 2015). A determinação do PZ permite prever a estabilidade de sistemas coloidais. Vesículas que apresentam valor elevado de PZ positivo ou negativo têm menor tendência a agregação, devido à repulsão eletrostática (LAOUINI *et al.*, 2012). LpHS-GEVGP apresentaram PZ próximo à neutralidade, com valor médio de $-2,4 \pm 0,31$ mV, conforme esperado devido à presença do PEG em sua composição lipídica. Sabe-se que vesículas com valor pequeno de PZ tendem a ser menos estáveis, devido à agregação (LAOUINI *et al.*, 2012). Porém, a presença de PEG nos lipossomas caracteriza a formação de uma barreira estérica que desfavorece a aproximação desses, conferindo maior estabilidade aos sistemas coloidais (IMMORDINO, 2006). Além disso, há um retardo na depuração dos lipossomas da circulação sanguínea uma vez que o PEG funciona como uma barreira estérica para a adesão das opsoninas, (TORCHILIN, 2005; IMMORDINO, 2006). O TE de GEVGP nos lipossomas foi de $75,0 \pm 7,7\%$, equivalente à $0,38 \pm 0,04$ mg/mL. Pode-se sugerir que o elevado TE de GEVGP esteja associado à sua alta lipofilia e à sua estrutura semelhante ao colesterol, que favorece as interações do composto com os fosfolípidos presentes na bicamada lipídica.

5.4 Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP

A estabilidade de armazenamento dos lipossomas é determinada por suas características químicas e físico-químicas ao longo do tempo (LASIC, 1998). Na Tabela 9 está apresentado o estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP por um período de 90 dias.

Tabela 9 – Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP ao longo do tempo

Tempo (dias)	Teor GEVGP (%)	Diâmetro médio (nm)	IP	PZ (mV)
0	75,0 ± 7,7	182,2 ± 2,7	0,36 ± 0,033	-2,37 ± 0,31
15	75,0 ± 7,5	182,1 ± 13,7	0,33 ± 0,06	-2,08 ± 0,21
30	72,3 ± 9,2	182,7 ± 12,2	0,32 ± 0,04	-2,90 ± 0,72
60	53,0 ± 9,1 *	173,9 ± 8,5	0,33 ± 0,03	-3,29 ± 0,53
90	42,0 ± 2,7 *	157,9 ± 1,9 *	0,32 ± 0,05	-3,49 ± 0,23 *

Foram realizados quatro experimentos e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. *Valores significativamente diferentes em relação ao tempo 0 ($p < 0,05$).

As análises no tempo 0 foram realizadas logo após o preparo da formulação, cujas características foram descritas no item 5.3. O teor de GEVGP no tempo 0 foi calculado em relação a quantidade do composto adicionado durante o preparo dos lipossomas (0,5 mg/mL). Para os demais tempos propostos no estudo de estabilidade, o teor de GEVGP nos lipossomas foi calculado em relação ao tempo 0. Ao longo de 30 dias não houve alterações nos valores de teor de GEVGP, podendo essa estabilidade ser explicada pela lipofilia do composto que possibilita uma forte interação com a bicamada lipídica das vesículas, evitando sua liberação indesejada. A partir do tempo de 60 dias, há uma diminuição em torno de 20% do teor de GEVGP nos lipossomas e os valores são significativamente diferentes do tempo 0.

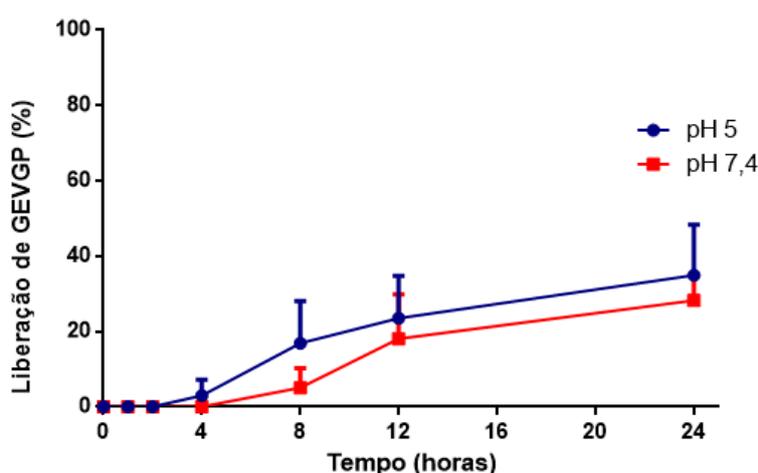
O diâmetro médio dos LpHS-GEVGP não apresentou variação durante 60 dias de armazenamento. Somente a partir do tempo de 90 dias foi possível observar diferença significativa nesse parâmetro em relação ao tempo 0. A redução do diâmetro dos lipossomas após 90 dias pode ser consequência da saída do GEVGP da bicamada das vesículas. No tempo de 90 dias, o valor de PZ apresentou uma diferença significativa em relação ao tempo 0, mas se manteve próximo a neutralidade. Adicionalmente, ao longo de 90 dias não houve alteração significativa nos valores de IP dos lipossomas. Nesse contexto, a manutenção

do diâmetro médio, PZ próximo à neutralidade e homogeneidade da dispersão dos lipossomas, pode ser explicada pela presença das cadeias poliméricas presentes no DSPE-mPEG₂₀₀₀, que desfavorece a aproximação das vesículas, conferindo maior estabilidade ao sistema coloidal (IMMORDINO, 2006).

5.5 Estudo de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP

A cinética de liberação de lipossomas é dependente da composição lipídica, natureza do material encapsulado e método de encapsulação das vesículas e, tem grande importância na garantia de segurança e eficácia terapêutica dos nanossistemas (MONTEIRO *et al.*, 2014). O perfil de liberação *in vitro* de GEVGP dos lipossomas foi avaliado por meio de estudos de diálise em tampão HEPES acrescido de Tween 80 1% (p/v), à 37° C, pH 5 e 7,4, durante um período de 24 horas. A quantificação do GEVGP foi realizada por meio de análises de CLAE, conforme descrito anteriormente. Os perfis de liberação estão representados na Figura 19. O pH 7,4 foi avaliado como indicativo da liberação *in vivo*, na circulação sanguínea, uma vez que mimetiza o pH fisiológico e o pH 5 como indicativo da liberação *in vivo* no interior dos endossomas e no tecido tumoral.

Figura 19 – Estudo de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP em pH 5 (linha azul) e 7,4 (linha vermelha)



Foram realizados três experimentos e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

Em ambos os pH estudados, a liberação do GEVGP a partir dos lipossomas foi lenta. Para o meio de pH 7,4, a liberação de GEVGP após 24 horas foi de $28,3 \pm 6,8\%$, enquanto no pH 5 foi de $34,9 \pm 13,4\%$. Essa liberação lenta pode indicar que o GEVGP foi fortemente incorporado na bicamada lipídica, devido à sua estrutura lipofílica e que o efeito de proteção estérica, pelas cadeias poliméricas presentes no DSPE-mPEG₂₀₀₀ retarda a liberação do composto (LI *et al.*, 2014).

Os perfis de liberação foram semelhantes em ambos os pH, demonstrando que o sistema não apresentou pH sensibilidade. Isso pode ser explicado pela alteração da estrutura da bicamada lipídica devido à presença de GEVGP, afetando a pH sensibilidade. Apesar da perda da pH sensibilidade, os lipossomas compostos de DOPE:CHEMS ainda são capazes de liberar o material encapsulado no citoplasma, devido ao seu caráter fusogênico, que os permite internalizar nas células mais facilmente que os lipossomas convencionais (VANIC *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2013). As amostras não apresentaram variação significativa nas medidas de diâmetro médio, IP e PZ, ao longo do tempo de liberação.

5.6 Estudos *in vitro*

5.6.1 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de Sulforrodamina B

A citotoxicidade de GEVGP livre e LpHS-GEVGP frente quatro linhagens tumorais humanas foi determinada e em cultura primária de fibroblastos humanos não-tumorais, e os valores de CI_{50} estão apresentados na Tabela 10. DXR foi testada nas três linhagens celulares de tumor de mama (MDA-MB-231, SKBR-3 e MCF-7) e PTX na linhagem celular de tumor de pulmão (A549), como controles positivos do experimento. Não se observou citotoxicidade significativa após tratamento com LpHS brancos nas quatro linhagens tumorais.

Tabela 10 – Valores de CI_{50} dos tratamentos com GEVGP, LpHS-GEVGP, DXR e PTX para diferentes linhagens celulares

Linhagens celulares	CI_{50} (μM)			
	GEVGP	LpHS-GEVGP	DXR	PTX
MDA-MB-231	0,170 \pm 0,007	0,168 \pm 0,070	0,828 \pm 0,148*	ND
SKBR3	0,136 \pm 0,002	0,158 \pm 0,010	0,270 \pm 0,019*	ND
MCF-7	0,347 \pm 0,032	0,343 \pm 0,048	0,498 \pm 0,134	ND
A549	0,044 \pm 0,008*	0,027 \pm 0,005	ND	0,020 \pm 0,005
FHNT	48,05 \pm 3,05*	4,02 \pm 0,07	> 50	> 10

DXR: doxorubicina e PTX: paclitaxel. Foram realizados três experimentos e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. *Valores significativamente diferentes em relação às outras médias representadas na mesma linha ($p < 0,05$). ND = não determinado.

Pela análise da Tabela 10, pode-se observar que os valores de CI_{50} obtidos para as linhagens celulares MDA-MB-231 e SKBR3, após tratamento com GEVGP livre e LpHS-GEVGP foram menores que o valor de CI_{50} obtido após o tratamento com DXR, indicando maior citotoxicidade do composto livre e da formulação lipossomal em relação ao fármaco utilizado na clínica. Para a linhagem celular MCF-7 não houve diferença significativa entre os tratamentos com DXR, GEVGP e LpHS-GEVGP. Nas três linhagens tumorais de mama, os valores de CI_{50} obtidos após o tratamento com GEVGP livre e LpHS-GEVGP foram iguais. Esse resultado revela que não houve redução na atividade citotóxica do GEVGP incorporado nos lipossomas quando comparada à atividade citotóxica de GEVGP livre. Nesse contexto, a encapsulação de GEVGP em lipossomas pode representar uma estratégia promissora para carreamento de GEVGP, permitindo a sua administração parenteral.

Para a linhagem tumoral A549 pode-se observar que não houve diferença significativa entre os valores de CI_{50} obtidos após o tratamento com PTX e LpHS-GEVGP, indicando que a formulação apresenta citotoxicidade semelhante ao fármaco utilizado na clínica. Adicionalmente, o valor de CI_{50} obtido após tratamento com LpHS-GEVGP foi menor que o valor observado após o tratamento com GEVGP livre. Esse resultado indica que os lipossomas podem

facilitar a captação de GEVGP por essas células tumorais e, desta forma, aumentar a citotoxicidade do composto.

5.6.2 Seletividade

A citotoxicidade de GEVGP livre, LpHS-GEVGP, DXR e PTX frente a fibroblastos não-tumorais de gengiva humana foi avaliada pelo ensaio de Sulforrodamina B e os valores de CI_{50} , obtidos após tratamento, foram apresentados na Tabela 10. Não se observou citotoxicidade significativa após tratamento com LpHS brancos.

A partir dos resultados de CI_{50} calculou-se o IS de GEVGP e LpHS-GEVGP para as diferentes linhagens celulares tumorais em relação à cultura primária de fibroblastos não-tumorais de gengiva humana. O IS de DXR foi calculado para as três linhagens tumorais de mama e o IS de PTX para a linhagem de tumor de pulmão. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores de IS para diferentes linhagens celulares tumorais em relação à cultura primária de fibroblastos não-tumorais de gengiva humana

Linhagens celulares	IS ($CI_{50 \text{ FIB}} / CI_{50 \text{ TUM}}$)			
	GEVGP	LpHS-GEVGP	DXR	PTX
MDA-MB-231	282,65	23,92	> 60	ND
SKBR3	353,31	25,44	> 185	ND
MCF-7	138,47	11,72	> 100	ND
A549	1092,04	148,9	ND	> 500

GEVGP mostrou-se cerca de 282, 353, 138 e 1000 vezes mais seletivo para as células MDA-MB-231, SKBR3, MCF-7 e A549, respectivamente. Sabe-se que células tumorais têm maior expressão da $Na^+K^+ATPase$, comparada às células não-tumorais e que, os cardenólídeos não apresentam alta citotoxicidade em células não-tumorais (SCHNEIDER *et al.*, 2017a; NEWMAN *et al.*, 2008). Isso pode justificar a alta seletividade do GEVGP livre para as diferentes linhagens celulares tumorais em relação à linhagem de fibroblastos não-tumorais.

LpHS-GEVGP também se mostraram seletivos para as mesmas linhagens celulares tumorais, porém a seletividade do GEVGP encapsulado em lipossomas foi menor que a do GEVGP livre. A diferença de IS entre GEVGP livre e LpHS-GEVGP pode ser explicada pela internalização dos lipossomas nas células, com liberação do GEVGP a partir dos endossomas, aumentando a citotoxicidade do composto (FERREIRA *et al.*, 2013; SAHAY, 2010). Adicionalmente, esse resultado pode sugerir que, de fato, além da Na⁺K⁺ATPase, alvos intracelulares podem estar relacionados aos efeitos citotóxicos dos cardenolídeos (SCHNEIDER *et al.*, 2017a).

Tendo em vista que somente na linhagem celular tumoral A549 houve uma diferença significativa entre o valor de CI₅₀ do GEVGP livre comparado aos LpHS-GEVGP, os valores de CI₅₀ dos tratamentos com GEVGP e LpHS-GEVGP na linhagem A549 foram significativamente diferentes dos valores de CI₅₀ desses tratamentos nas demais linhagens celulares tumorais (MDA-MB-231, SKBR3 e MCF-7) e dos fibroblastos não-tumorais, e que o índice de seletividade em células A549 em relação à fibroblastos não-tumorais foi significativamente maior em relação à outras linhagens tumorais testadas, a linhagem celular A549 foi selecionada para realização de experimentos *in vitro* a longo prazo e experimentos *in vivo*.

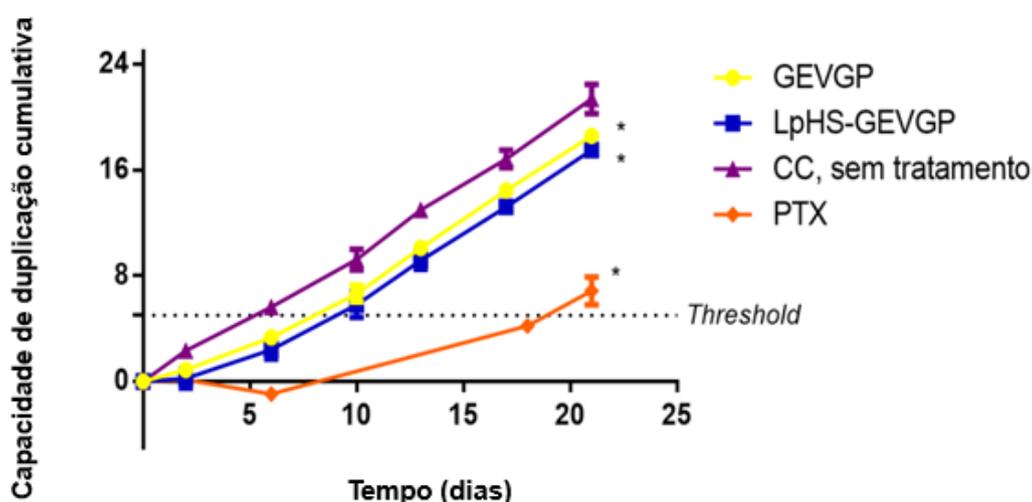
5.6.3 Duplicação cumulativa da população

Duplicação cumulativa da população (CPD), do inglês *Cumulative population doubling*, é um ensaio que avalia o comportamento *in vitro* a longo prazo das células sobreviventes após um tratamento, que pode correlacionar melhor com os experimentos *in vivo* comparado aos experimentos de curto prazo. É um importante experimento para avaliação da capacidade proliferativa readquirida por células tumorais quando submetidas a tratamento (SILVA *et al.*, 2016).

Experimentos que permitem análise dos tratamentos a longo prazo podem ser fundamentais para planejar experimentos *in vivo*, uma vez que o câncer é uma doença crônica. Além disso, experimentos *in vitro* de longa duração são importantes uma vez que a resistência das células tumorais ao tratamento é uma das principais causas das recidivas dos tumores (SILVA *et al.*, 2016). Sendo

assim, para avaliação da capacidade proliferativa readquirida, foi acompanhado, ao longo do tempo, o crescimento de uma população de células tumorais da linhagem A549 que sobreviveram ao tratamento com GEVGP livre, LpHS-GEVGP e PTX. A cinética de crescimento dos diferentes tratamentos está apresentada na Figura 20. Os LpHS brancos não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle celular, sem tratamento (CC).

Figura 20 – Avaliação *in vitro* a longo prazo das células da linhagem A549 sobreviventes após tratamentos com GEVGP, LpHS-GEVGP e PTX



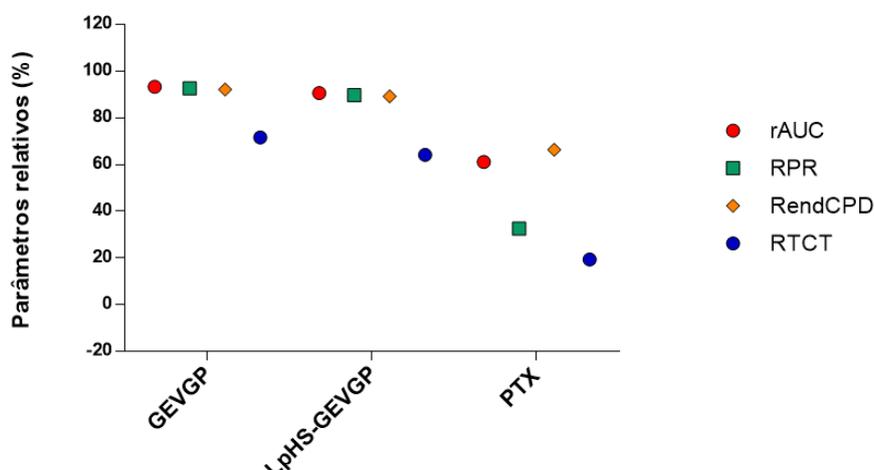
Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. *Valores significativamente diferentes em relação ao controle celular (CC) ($p < 0,05$).

A partir da avaliação da Figura 20, pode-se observar que as células sobreviventes após tratamento com PTX na concentração de 20 nM (controle positivo) proliferaram lentamente ao longo dos 21 dias. Isso era esperado, pois o PTX é um agente de estabilização de microtúbulos que interfere no processo de montagem do fuso mitótico, nas células em divisão, causando parada na metáfase (RANG *et al.*, 2011). Já as células tratadas com 44 nM de GEVGP e 27 nM de LpHS-GEVGP readquiriram a capacidade de proliferação ao longo dos 21 dias, contudo apresentaram diferença significativa em relação ao CC, sem tratamento, com menor crescimento das células após o tratamento. Essa diferença pode estar relacionada à capacidade dos cardenolídeos, como GEVGP de inibirem a replicação do DNA a partir da ligação à topoisomerase II, paralisando o ciclo de divisão celular (SLINGERLAND *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos nas células sobreviventes da linhagem A549, após

tratamento com o cardenolídeo convalotoxina (SCHNEIDER *et al.*, 2017b) e evatromonosídeo, ambos na concentração de 10 nM (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

A partir do gráfico de CPD *versus* tempo, foram calculados os seguintes parâmetros: CPD final relativo (RendCPD), que compara o valor de CPD obtido ao final dos 21 dias para os grupos tratados em relação ao CC; área sob a curva relativa (rAUC), que determina o efeito global do tratamento a partir da área sob a curva de cada grupo tratado em relação ao CC; tempo relativo para atingir o *threshold* (RTCT), que avalia o atraso na taxa de proliferação de cada grupo tratado em relação ao CC e a taxa de proliferação relativa (RPR), que determina a velocidade de crescimento relativo das células sobreviventes em cada grupo em relação ao CC (SILVA *et al.*, 2016). Os resultados estão apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Parâmetros relativos de CPD de células sobreviventes A549 após tratamento com GEVGP, LpHS-GEVGP e PTX



Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média.

Nos grupos tratados com GEVGP e LpHS-GEVGP, os valores de RendCPD, RPR e rAUC corresponderam à cerca de 90% em relação ao CC. O valor de RTCT nesses dois grupos foi cerca de 60% em relação ao CC, indicando que a taxa de proliferação das células do CC é cerca de 0,4 vezes maior que das células sobreviventes após tratamento com GEVGP e LpHS-GEVGP. Sendo assim, os tratamentos com GEVGP e LpHS-GEVGP nas concentrações de 44

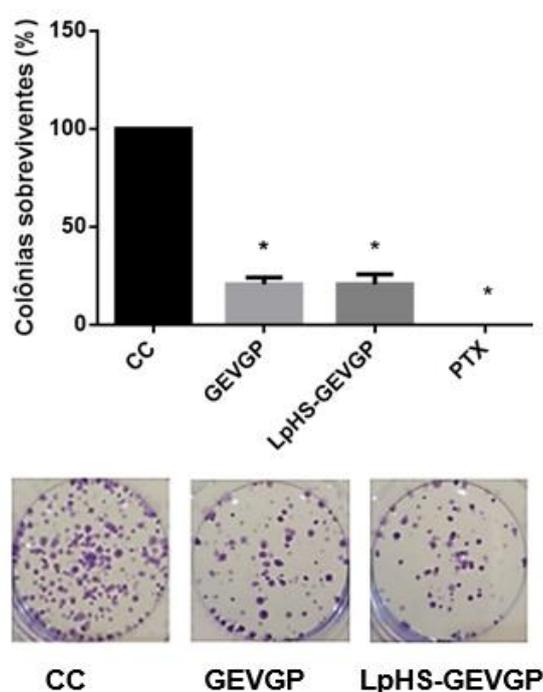
nM e 27 nM respectivamente, são capazes de inibir a capacidade proliferativa readquirida das células tumorais sobreviventes da linhagem A549, podendo ser uma alternativa promissora para a diminuição das recidivas de tumores, por resistência das células tumorais ao tratamento com antineoplásicos.

5.6.4 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico *in vitro* a longo prazo avalia o efeito do tratamento na capacidade de uma única célula sobrevivente formar uma grande colônia ou clone, sendo essa célula considerada clonogênica (LOPES, 2012).

Nesse ensaio, foi quantificado a porcentagem de clones de células que permaneceram viáveis após os tratamentos com GEVGP livre, LpHS-GEVGP e PTX, em relação ao CC. Os resultados estão expressos na Figura 22. A porcentagem de colônias formadas após tratamento com LpHS brancos não foi significativamente diferente do CC.

Figura 22 – Efeito dos tratamentos com GEVGP, LpHS-GEVGP e PTX sobre a capacidade das células tumorais da linhagem A549 formarem colônias



Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. *Valores significativamente diferentes em relação ao controle celular (CC) ($p < 0,05$).

O tratamento com PTX na concentração de 20nM inibiu totalmente a formação de colônias e os tratamentos com GEVGP e LpHS-GEVGP, nas concentrações de 44nM e 27 nM, respectivamente, apresentaram cerca de 75% de inibição, indicando que GEVGP e LpHS-GEVGP inibiram significativamente a capacidade clonogênica das células A549 que sobreviveram ao tratamento, podendo então ser uma alternativa promissora para diminuição das recidivas de tumores, por resistência das células tumorais ao tratamento com antineoplásicos.

Esses resultados foram semelhantes aos obtidos em células tumorais da linhagem A549, sobreviventes ao tratamento com o cardenolídeo convalotoxina na concentração de 10nM (SCHNEIDER *et al.*, 2017b) e evatromonosídeo na concentração de 100 nM (SCHNEIDER *et al.*, 2018).

GEVGP e LpHS-GEVGP inibiram significativamente a capacidade clonogênica das células sobreviventes da linhagem A549, após tratamento, enquanto que no CPD essas células foram menos afetadas. Essa diferença pode ser devido à pequena população de células sobreviventes replaqueadas em um ensaio clonogênico (200 células), enquanto no CPD uma população mais representativa das células sobreviventes é avaliada a longo prazo.

5.7 Estudos *in vivo*

5.7.1 Avaliação da atividade antitumoral

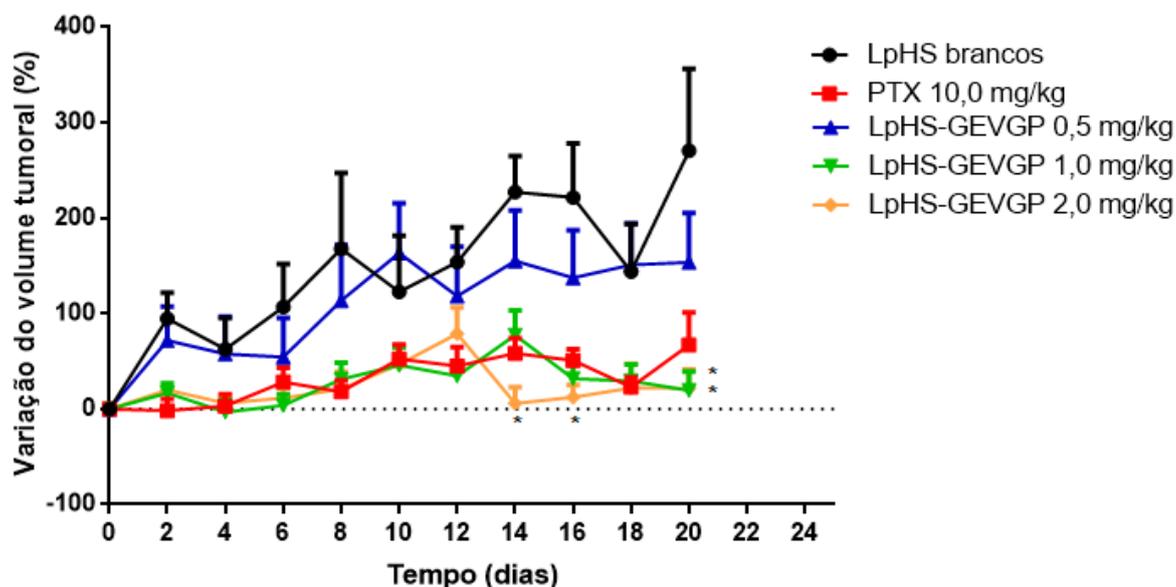
5.7.1.1 Volume tumoral e peso dos animais

Conforme apresentado em trabalhos anteriores, LpHS brancos não induzem toxicidade e não apresentam atividade antitumoral em modelo animal, sendo então escolhido como controle negativo do experimento (LEITE, 2012).

Durante os tratamentos, não se observou nenhuma perda de peso para todos os grupos experimentais, sugerindo que não houve toxicidade induzida pela administração de LpHS-GEVGP e do PTX.

Os dados da avaliação da atividade antitumoral baseados no acompanhamento do volume tumoral de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem A549 tratados com LpHS brancos, PTX e LpHS-GEVGP, estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Variação do volume tumoral (%) de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de carcinoma de pulmão da linhagem A549, durante tratamento com LpHS brancos, PTX e LpHS-GEVGP em diferentes doses



Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média: 5 animais no grupo LpHS-brancos (controle negativo); 6 animais para os demais grupos PTX (controle positivo), LpHS-GEVGP 0,5 mg/kg; LpHS-GEVGP 1,0 mg/kg e LpHS-GEVGP 2,0 mg/kg.

*Valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle negativo (LpHS brancos) ($p < 0,05$).

Durante 12 dias do estudo, não há diferença das variações de volumes tumorais entre todos os grupos de tratamento. Nos dias 14, 16 e 20 é possível detectar uma diferença entre o grupo tratado com LpHS-GEVGP na dose de 2,0 mg/kg e o grupo controle negativo (LpHS brancos). Somente no dia 20 é possível detectar uma diferença significativa entre o tratamento com LpHS-GEVGP na dose de 1,0 mg/kg e o grupo controle negativo. A partir desses resultados pode-se inferir que os tratamentos com LpHS-GEVGP nas doses de 1,0 mg/kg e 2,0 mg/kg promoveram um menor crescimento do volume tumoral em relação ao grupo controle negativo. Além disso, esses tratamentos (LpHS-GEVGP 1,0 mg/kg e LpHS-GEVGP 2,0 mg/kg) apresentaram atividade antitumoral semelhante ao tratamento com PTX na dose de 10mg/kg, fármaco aprovado e utilizado na clínica, para tratamento de CPCNP (SÁ *et al.*, 2016). Considerando as doses

utilizadas de PTX (10 mg/Kg) e LpHS-GEVGP (1,0 e 2,0 mg/Kg), pode-se verificar que a formulação lipossomal é 5 a 10 vezes mais potente do que o PTX.

Os valores de VRT e IC para cada um dos grupos, no dia 20, estão apresentados na Tabela 12. Os tratamentos com LpHS-GEVGP nas doses de 1,0 mg/kg e 2,0 mg/kg apresentaram valores de VRT significativamente diferentes do grupo controle negativo (LpHS brancos). Esses tratamentos resultaram em 67,6% de inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo controle negativo.

Tabela 12 – VRT e IC do tumor de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de carcinoma de pulmão da linhagem A549, após tratamento com LpHS brancos, PTX e LpHS-GEVGP em diferentes doses

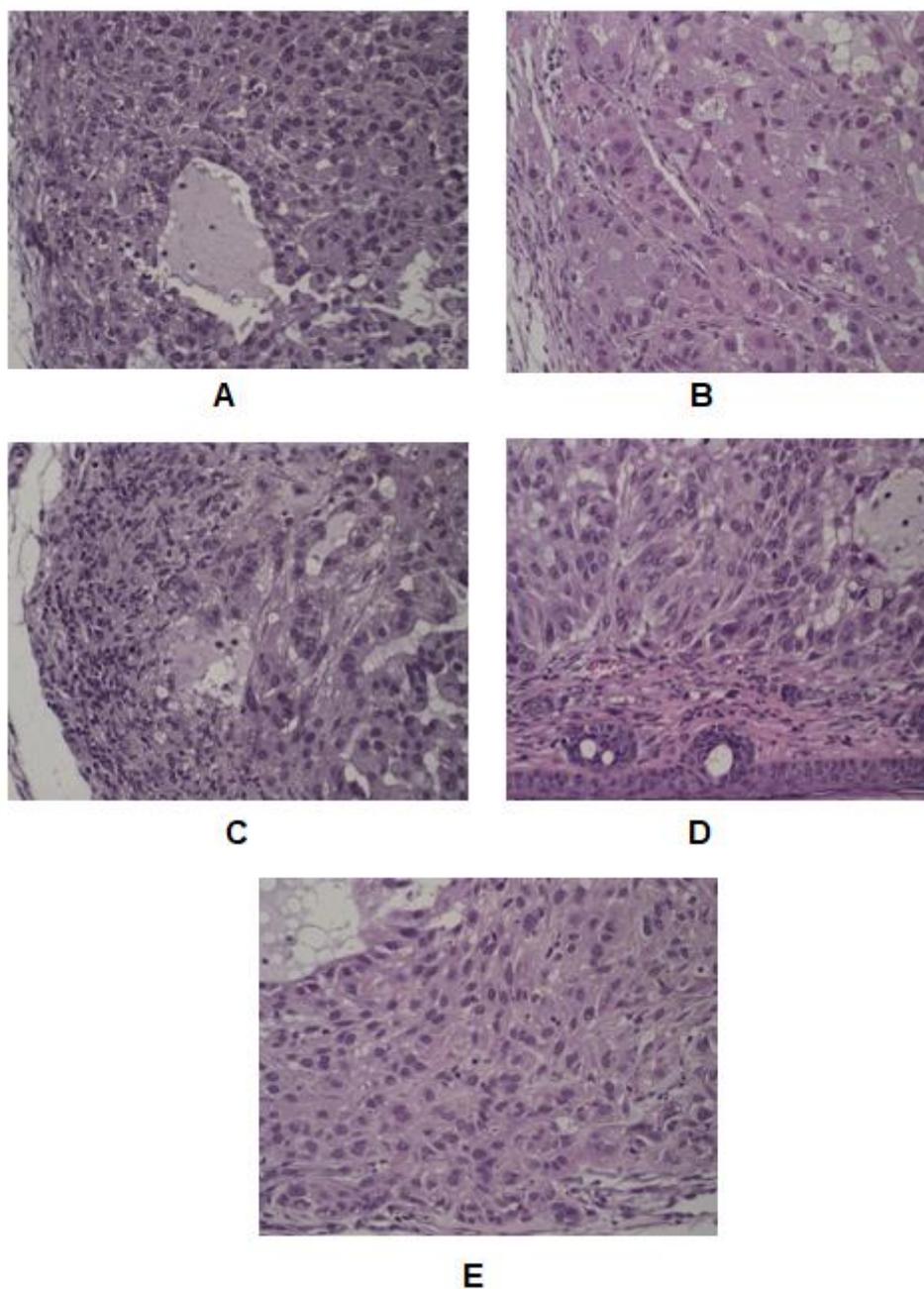
Tratamento	VRT	IC (%)
LpHS brancos	3,7 ± 1,9	-
PTX 10mg/kg	1,7 ± 0,8 *	54,1
LpHS-GEVGP 0,5 mg/kg	2,5 ± 1,3	32,4
LpHS-GEVGP 1,0 mg/kg	1,2 ± 0,5 *	67,6
LpHS-GEVGP 2,0 mg/kg	1,2 ± 0,5 *	67,6

VRT e IC significam volume relativo tumoral e inibição do crescimento do tumor, respectivamente e foram determinados utilizando 5 animais no grupo LpHS-brancos; 6 animais para os demais grupos PTX, LpHS-GEVGP 0,5 mg/kg; LpHS-GEVGP 1,0 mg/kg e LpHS-GEVGP 2,0 mg/kg. Os resultados de VRT foram expressos como média ± desvio padrão *Valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle negativo (LpHS brancos) (p < 0,05).

5.7.1.2 Avaliação histopatológica

Foram analisados os rins, fígado, baço e tumor de todos os animais envolvidos no estudo, individualmente, e abaixo foram apresentadas fotomicrografias dos animais representativos de cada grupo de tratamento. O fígado e o baço foram escolhidos por serem os locais de maior acúmulo de nanossistemas no organismo e os rins para avaliar se haveria alguma alteração histológica nesse órgão excretor.

Figura 24 – Fotomicrografias do tumor representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos



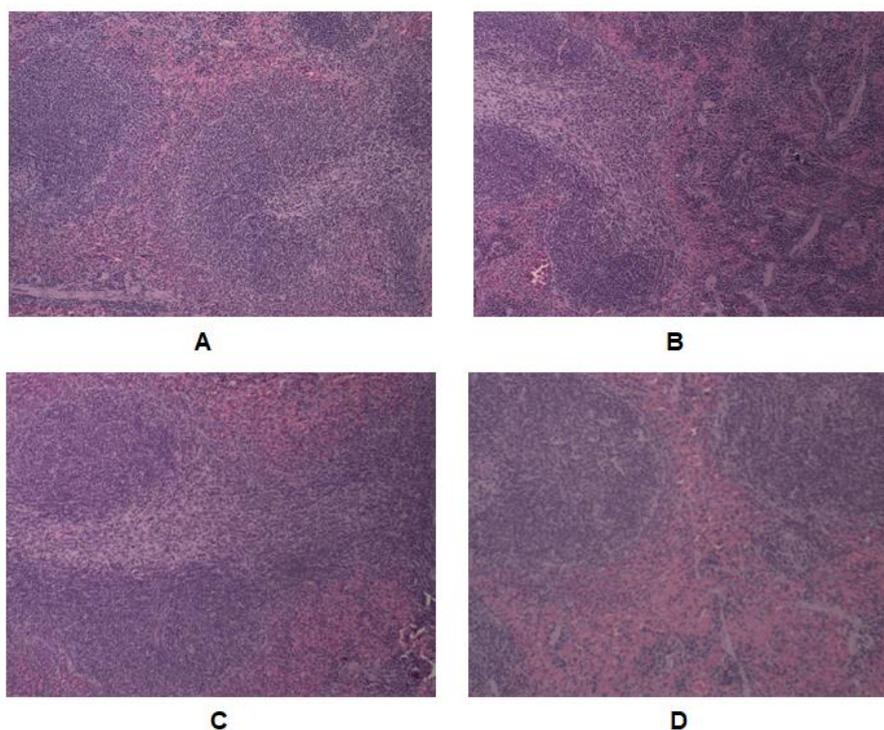
Os camundongos foram submetidos ao tratamento com LpHS brancos (A), PTX 10 mg/kg (B), LpHS-GEVGP 0,5mg/kg (C), LpHS-GEVGP 1,0mg/kg (D) e LpHS-GEVGP 2,0mg/kg (E). Coloração utilizada foi hematoxilina-eosina. O aumento foi de 40X.

Para todos os grupos de tratamento analisados, a neoplasia apresentou crescimento bem delimitado composto por células epiteliais em arranjo

predominantemente sólido e por vezes apresentando cavidades císticas com secreção eosinofílica. As células apresentam moderado pleomorfismo nuclear, com nucléolos evidentes e citoplasma amplo e granular. O estroma é escasso e delicado e as áreas de necrose no centro da massa tumoral por vezes são extensas.

As fotomicrografias do baço, fígado e rins estão apresentadas nas Figuras 25, 26 e 27, respectivamente. Os órgãos dos animais tratados com PTX não foram avaliados, uma vez que é conhecido que o tratamento não produz alterações histológicas indicativas de toxicidade nesses órgãos (ROQUE, 2016). Não foram observadas alterações histopatológicas importantes nos órgãos avaliados. Houve uma preservação da arquitetura de cada tecido e ausência de infiltrado inflamatório.

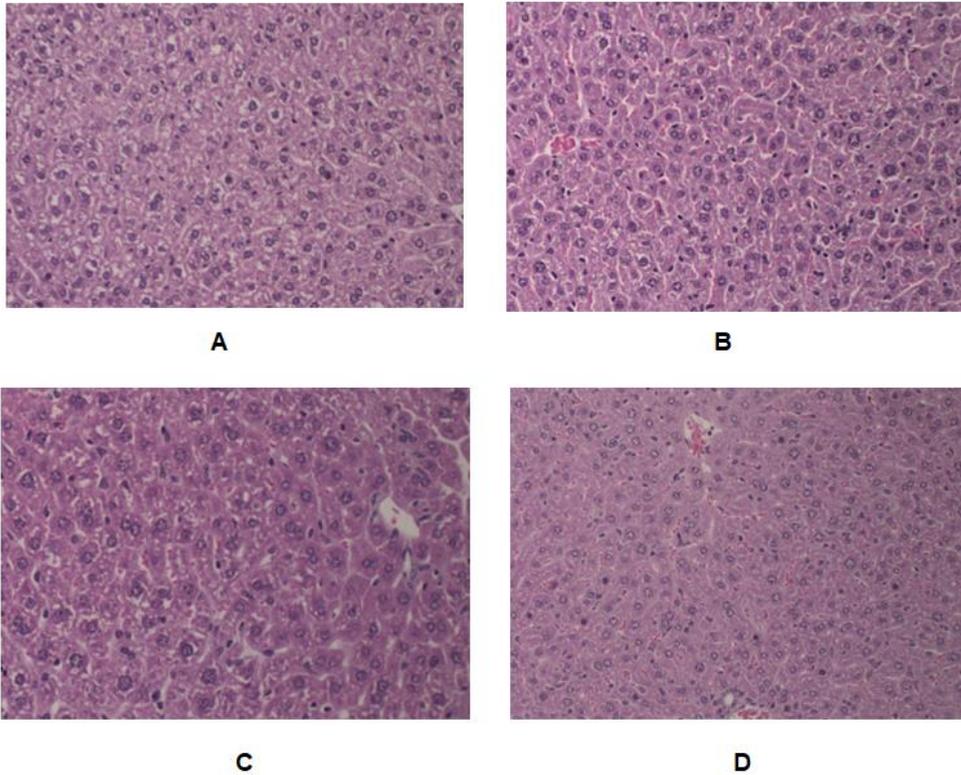
Figura 25 - Fotomicrografias do baço representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos



Os camundongos foram submetidos ao tratamento com LpHS brancos (A), LpHS-GEVGP 0,5mg/kg (B), LpHS-GEVGP 1,0mg/kg (C) e LpHS-GEVGP 2,0mg/kg (D).

Coloração utilizada foi hematoxilina-eosina. O aumento foi de 10X.

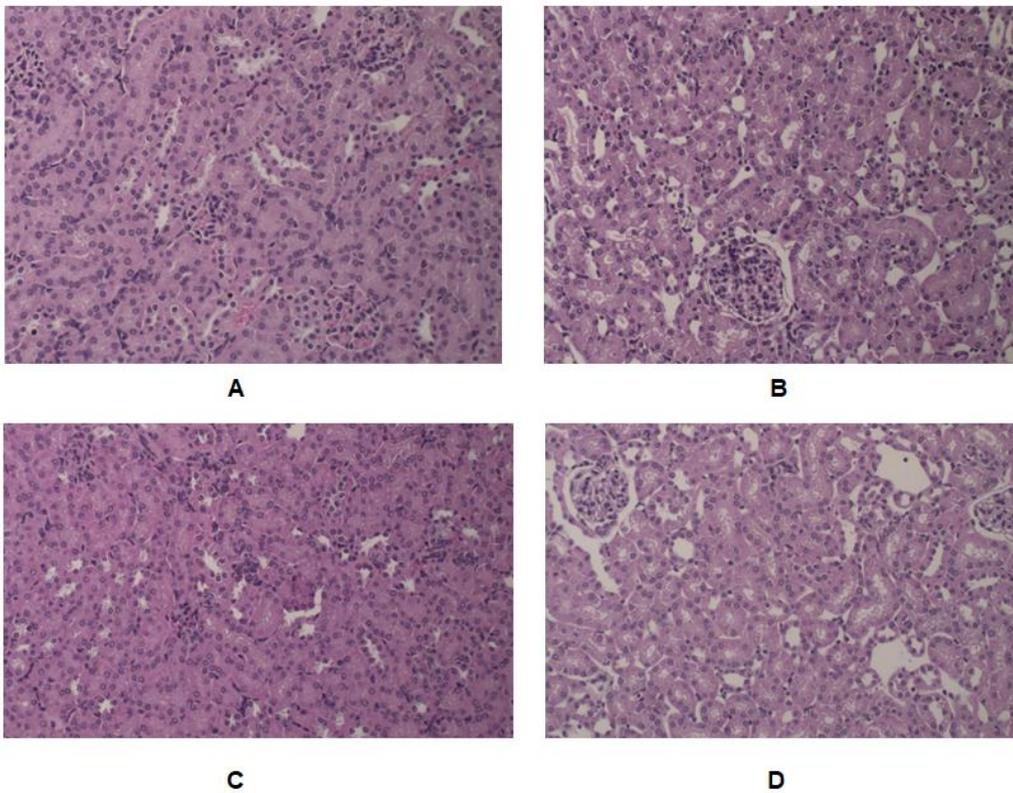
Figura 26 - Fotomicrografias do fígado representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos



Os camundongos foram submetidos ao tratamento com LpHS brancos (A), LpHS-GEVGP 0,5mg/kg (B), LpHS-GEVGP 1,0mg/kg (C) e LpHS-GEVGP 2,0mg/kg (D).

Coloração utilizada foi hematoxilina-eosina. O aumento foi de 20X.

Figura 27 - Fotomicrografias dos rins representativas de cada grupo de camundongos Balb/c nude fêmeas portadores de tumor de pulmão da linhagem celular A549 e submetidos a diferentes tratamentos



Os camundongos foram submetidos ao tratamento com LpHS brancos (A), LpHS-GEVGP 0,5mg/kg (B), LpHS-GEVGP 1,0mg/kg (C) e LpHS-GEVGP 2,0mg/kg (D). Coloração utilizada foi hematoxilina-eosina. O aumento foi de 20X.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que GEV e GEVGP livres apresentaram citotoxicidade semelhante nas três linhagens celulares tumorais humanas testadas (MDA-MB-231, MCF-7 e A549), sendo então o GEVGP escolhido para encapsulação em lipossomas, uma vez que é mais lipofílico que o GEV, aumentando a interação com a bicamada lipídica das vesículas.

O método analítico para doseamento do GEVGP nas formulações lipossomais foi adequadamente validado, conforme as diretrizes estabelecidas pela RDC 899 da ANVISA.

A formulação de LpHS-GEVGP possui características químicas e físico-químicas adequadas para a sua administração endovenosa. As vesículas mantiveram seu diâmetro, IP, PZ e teor de encapsulação de GEVGP durante o período de 30 dias, demonstrando sua boa estabilidade de armazenamento.

Os LpHS-GEVGP apresentaram uma liberação lenta do GEVGP ao longo das 24 horas avaliadas, o que sugere a existência de uma forte interação entre as moléculas do GEVGP com a bicamada lipídica. A formulação dos LpHS-GEVGP, apesar de composta por DOPE e CHEMS, não apresentou pH-sensibilidade.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram o potencial citotóxico dos LpHS-GEVGP nas linhagens de células tumorais de mama com características fenotípicas diferentes (triplo negativo, ER positivo e HER2 positivo) assim como em células não-pequenas de câncer de pulmão. Adicionalmente, a formulação dos LpHS-GEVGP mostrou-se seletiva para essas células tumorais em relação a células não-tumorais humanas (fibroblastos de gengiva).

Estudos *in vitro* a longo prazo confirmaram que LpHS-GEVGP diminuem a capacidade de crescimento das células tumorais sobreviventes após o tratamento e diminuem a capacidade dessas células em formarem colônias.

Por último, os estudos de avaliação da atividade antitumoral utilizando um modelo experimental portador de câncer de pulmão, permitiu demonstrar que os

LpHS-GEVGP nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg, apresentam capacidade semelhante ao PTX, na dose de 10 mg/kg, de inibir o crescimento do tumor.

Diante do exposto, os LpHS-GEVGP apresentam-se como uma formulação promissora para o tratamento do câncer de mama e pulmão, já que permitiu a administração sistêmica do GEVGP, demonstrou alto potencial citotóxico e seletividade, atividade antitumoral semelhante ao PTX e ausência de sinais de toxicidade a partir de um estudo preliminar.

7 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se propor algumas perspectivas, a saber:

- Estudos para investigação dos mecanismos da atividade citotóxica dos LpHS-GEVGP em diferentes linhagens tumorais. Propõe-se os seguintes ensaios: determinação do conteúdo de DNA subdiploide, por citometria de fluxo, para medida quantitativa da morte celular; ensaio de dupla coloração com anexina-V-FITC e TO-PRO-3, para quantificação de células em apoptose e/ou em necrose; ensaios para detecção de ativação das caspases 8 e 9 e ensaio para detecção de caspase-3 ativa, por citometria de fluxo.
- Estudos *in vitro* para investigação da cardiotoxicidade de LpHS-GEVGP em cardiomiócitos humanos.
- Avaliar a toxicidade de LpHS-GEVGP mediante a quantificação de parâmetros bioquímicos e hematológicos
- Avaliar a eficácia antitumoral de LpHS-GEVGP em modelo animal experimental de tumor de mama em diferentes doses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos. **Resolução nº 899, de 20 de maio de 2003**. 20p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b>. Acesso em 13 de dezembro de 2017.

ALMEIDA, V.L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, nº 1; 118-129, 2005.

AMATO, N.C.D. *et al.* Evidence for Phenotypic Plasticity in Aggressive TripleNegative Breast Cancer: Human Biology Is Recapitulated by a Novel Model System. **Plos One**, v.7, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS: Cancer facts and figures 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>>. Acesso em 22 de novembro de 2017.

AMIN A. *et al.* Overview of major classes of plant derived anticancer drugs. **International journal of biomedical Science**, v.5, nº 1, p.1-11, 2009.

ANTCZAK, C. *et al.* Revisiting old drugs as novel agents for retinoblastoma: *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of cardenolides. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, nº 7, p. 3065-3073, 2009.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, nº. 1, p. 238–252, 1965.

BARRETO, A. C. P. Digitálicos. **Revista da Sociedade de Cardiologia de São Paulo**, São Paulo, v.10, p. VI-XIV, 2000.

BIELAWSKI, K.; WINNICKA, K.; BIELAWSKA, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1493–1497, 2006.

BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975 – 999, 2015.

BRASILEIRO-FILHO, G.; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios da proliferação e da diferenciação celulares. In: Brasileiro-Filho, G. **Bogliolo: Patologia**. 8 edição. Geraldo Brasileiro Filho. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, p. 219-276.

CHABNER, B. A. *et al.* Agentes antineoplásicos. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's: As Bases Farmacológicas da**

Terapêutica. 11ª edição. Trad. Sob a direção de Carlos Henrique de Araújo Cosendey. Porto Alegre: AMGH, 2010, p.1185-1264.

CARVALHO, Annelise de. **Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenólídeos em células tumorais**. 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

DINIZ, S. O. F. *et al.* Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in a experimental model of acute osteomyelitis in rats. **Nuclear Medicine Communications**, v. 29, p. 830-836, 2008.

FAKIM, A.G. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n° 1, p. 1-93, 2006.

FERREIRA, D.S. *et al.* pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. **Therapeutic Delivery**, v. 4, n° 9, p. 1-24, 2013.

FRESE, S. *et al.* Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. **Cancer Research**, v. 66, p. 5867-5874, 2006.

GAYED, B.A. *et al.* Digoxin inhibits blood vessel density and HIF-1a expression in castration-resistant C4-2 xenograft prostate tumors. **Clinical and Translational Science**, v. 5, n° 1, p. 39-42, 2012.

GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/today/home#>>. Acesso em 10 de janeiro de 2018.

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**. v.68, p.305-309, 1996.

GURE E. *et al.* An Overview of Cardenolides in *Digitalis* - More Than a Cardiotonic Compound. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, p. 1-11, 2017.

HAN, K.Q. *et al.* Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 3374-3379, 2007.

HANAMAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, p. 646-674, 2011.

HAUPTMAN, P.; KELLY, R.A. Digitalis. **Circulation**, v. 99, p.1265-1270, 1999.

HAUX, J. *et al.* Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. **BMC Cancer**, 2001. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/1/11>>. Acesso em 10 de dezembro de 2017.

HODGINS, D.S. CHANDRA U SINGH (San Antonio, Texas). **Novel formulations of digitalis glycosides for treating cell-proliferative and other diseases**. US 2004/0082521 A1, 31 de março de 2003, 29 de abril de 2004.

IMMORDINO, M.M.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n° 3, p. 297-315, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em 22 de novembro de 2017.

KAUSHIK, V. *et al.* Antitumor effects of naturally occurring cardiac glycosides convallatoxin and peruvoside on human ER⁺ and triple-negative breast cancers. **Nature**, v. 3, 2017.

KOMETIANI, P.; LIU, L.; ASKARI, A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 929–936, 2005.

KRAFT, J.C. *et al.* Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 29-52, 2014.

KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolides biosynthesis in foxglove. **Planta Medica**, New York, v. 64, p. 491-499, 1998.

KREIS, W. The Foxgloves (Digitalis) revisited. **Planta Medica**, v. 83, p. 962-976, 2017.

KULIKOV, A. *et al.* Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 1691-1702, 2007.

LAOUINI, A. *et al.* Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. **Journal of Colloid Science**, v. 1, p. 147-168, 2012.

LASIC, D. D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEITE, E. A. *et al.* Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5259-5269, 2012.

LI, Y. *et al.* Preparation, characterization and evaluation of bufalin liposomes coated with citrus pectin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.444, p. 54 – 62, 2014.

LIAM, C.K. *et al.* Lung cancer staging now and in the future. **Respirology**, 2015.

LOPES, S. **Estudo *in vitro* de atividades biológicas dos extratos carotenóidico e polifenólico derivados das folhas de *Zea mays* em linhagens celulares neoplásicas.** 2012. 153 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

LOPES, S.C.A. *et al.* Liposomes as carriers of anticancer drugs. In: LETÍCIA RANGEL. (Org.). **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches.** 1.ed. Rijeka, Croácia: InTech, v. 1, p. 85-124, 2013.

LOPES, S.C.A. **Lipossomas contendo ácido ursólico: desenvolvimento, caracterização química e físico-química e avaliação da citotoxicidade.** 2014. 150 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

LOPEZ-LAZARO, M. *et al.* Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1642–1645, 2005.

LOPEZ-LAZRA, M. *et al.* Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1642-1645, 2005.

MAROSTICA, L.L. *et al.* Feasibility study with ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesin₍₇₋₁₄₎ as an agent to early visualization of lung tumor cells in nude mice. **Nuclear Medicine**, v.37, p.372-376, 2016.

McCONKEY, D. J. *et al.* Cardiac glycosides stimulate Ca²⁺ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. **Cancer Research**, v. 60, p. 3807–3812, 2000.

MENGER, L. *et al.* Trial watch: Cardiac glycosides and cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 2, n° 2, 2013.

MIJATOVIC, T. *et al.* The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor κB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, p. 391-399, 2006.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Na⁺K⁺-ATPase and cancer. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 1, n° 1, p. 91-106, 2012.

MONTAÑO, J.M.C. *et al.* Evaluating the Cancer Therapeutic Potential of Cardiac Glycosides. **BioMed Research International**, 2014.

MONTEIRO, N. *et al.* Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the royal society Interface**, v. 11, 2014.

MUNKERT, J. *et al.* Production of the Cytotoxic Cardenolide Glucoevatromonoside by Semisynthesis and Biotransformation of Evatromonoside by a *Digitalis lanata* Cell Culture. **Planta Medica**, v. 83, p. 1035-1043, 2017.

NAGASAKA, M; GADGEEL, S.M. Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1409624>>. Acesso em 24 de novembro de 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, R. A. *et al.* Oleandrin-mediated oxidative stress in human melanoma cells. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 5, p. 167-181, 2006.

NEWMAN, R. A. *et al.* Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, p. 354-364, 2007.

NEWMAN, R.A *et al.* Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. **Molecular Interventions**, v. 8, n° 1, p.36-49, 2008.

NOVAES, F.T. *et al.* Câncer de pulmão: histologia, estágio, tratamento e sobrevida. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, n° 8, p. 595-600, 2008.

NÚÑEZ, C. *et al.* An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. **Biomaterials**, v. 97, p. 34 – 50, 2016.

PÁDUA, Rodrigo Maia de. **Transformação de cardenolídeos digitálicos e solasodina por culturas de fungos**. 2003. 268 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature**, v. 7, p. 926-935, 2008.

RAGHAVENDRA, P. B. *et al.* Cardiac glycoside induces cell death via FasL by activating calcineurin and NF-AT, but apoptosis initially proceeds through activation of caspases. **Apoptosis**, v. 12, 307-318, 2007.

RAHIMTOOLA, S. H.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 21, p. 781-853, 1996.

RAMADASS, S. K. *et al.* Paclitaxel/Epigallocatechin gallate coloaded liposome: a synergistic delivery to control the invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 65-72, 2015.

RANG, H.P. *et al.* **Rang & Dale: Farmacologia**. 7ª edição. Trad. Sob a direção de Tatiana Ferreira Robaina. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p.

RATES, S. M. K.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS / Ed. da UFSC, 2010. p. 685-710.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, p.364-369, 2001.

ROLLAND, C. L. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, p. 1761-1771, 2009.

ROQUE, Marjorie Coimbra. **Avaliação da atividade antitumoral de lipossomas fusogênicos de circulação prolongada co-encapsulando paclitaxel e doxorrubicina para o tratamento do câncer de mama.** 114 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.

SÁ, V.K. *et al.* Lung cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Lung Cancer: Targets and Therapy**, v. 7, p. 141-148, 2016.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D.Y.; KABANOV, A.V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v.145, p.182-195, 2010.

SCHNEIDER, N.F.Z. *et al.* Anticancer and Immunogenic Properties of Cardiac Glycosides. **Molecules**, v. 22, 2017a.

SCHNEIDER, N.F.Z. *et al.* Cytotoxic effects of the cardenolide convallatoxin and its Na,KATPase regulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2017b.

SCHNEIDER, N.F.Z. *et al.* Cytotoxic and cytostatic effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) in human lung cancer cells and its link to Na,K-ATPase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 684-696, 2018.

SCHOTTELIUS, M.; WESTER, H.J. Molecular imaging targeting peptide receptors. **Methods**, v.48, p.161-177, 2009.

SHIRATORI, O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *In vitro* and *in vivo* studies. **Gann Japanese Journal of Cancer Research**, v. 58, n° 6, p. 521–528, 1967.

SIAFAKA, P. I. *et al.* Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: current status and uses. **International Journal of Molecular Science**, v. 17, 2016.

SILVA, A.O. *et al.* A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology**, 2016.

SILVA, Izabella Thaís da. **Avaliação da ação citotóxica e antitumoral de cucurbitacinas naturais e derivados semissintéticos.** 2013. 229 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SLINGERLAND M. *et al.* Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. **Investigational New Drugs**, v. 4, p. 1087-1094, 2013.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, 2007.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

STENKVIST, B. *et al.* Cardiac glycosides and breast cancer. **The Lancet**, v.10, p. 563, 1979.

TAKASHIMA, A. Establishment of fibroblast cultures. In: BONIFACINO, J.S. *et al.*, editors. **Current Protocols in Cell Biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1998, p. 1-12.

TANG, Y. *et al.* Classification, treatment, strategy and associated drug resistance in breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v.16, n° 5, p.335-343, 2016.

TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature**, v. 4, p. 145-160, 2005.

ULRICH, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Bioscience Reports**, v. 22, n° 2, 2002.

VAN QUAQUEBEKE, E. *et al.* Identification of a novel cardenolide (2''-oxovoroscharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent in vitro antitumor activities and high in vivo tolerance: structure-activity relationship analyses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p. 849-856, 2005.

VANIC, Z. *et al.* Fusogenic activity of PEGylated pH-sensitive liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 22, n° 2, p. 148-157, 2012.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v.1, n° 3, p. 1112-1116, 2006.

WATABE, M. *et al.* Bcl-2 protein inhibits bufalin-induced apoptosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation in human leukemia U937 cells. **Cancer Research**, v. 57, p. 3097-3100, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 22 de novembro de 2017.

XUE, R. *et al.* The cytotoxic activities of cardiac glycosides from *Streptocaulon juventas* and the structure–activity relationships. **Fitoterapia**, v. 98, 0. 228-233, 2014.

YEH, J. Y. *et al.* Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, p.112–124, 2003.