

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

FERNANDA ALVES BORATTO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS pH-
SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA
EM MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte - MG

2016

FERNANDA ALVES BORATTO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS pH-
SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO DOXORRUBICINA
EM MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL**

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 - UFMG
Coorientador Dr. Diêgo dos Santos Ferreira – Harvard Medical School
Colaboradores Prof. Dr. André Luís Branco de Barros – UFMG
Profa. Dra. Elaine Amaral Leite - UFMG
Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali - UFMG
Dra. Sávila Caldeira de Araújo Lopes – UFMG

Belo Horizonte – MG

2016

B726i Boratto, Fernanda Alves.
Investigação da atividade antitumoral de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorrubicina em modelo animal experimental / Fernanda Alves Boratto. – 2016.
96 f. : il.

Orientadora: Mônica Cristina de Oliveira.
Coorientador: Diego dos Santos Ferreira.
Colaboradores: André Luís Branco de Barros.
Elaine Amaral Leite.
Geovanni Dantas Cassali.
Sávia Caldeira de Araújo Lopes.

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

1. Mama – Câncer – Teses. 2. Câncer de mama – Teses. 3. Agentes antineoplásicos – Teses. 4. Atividade antitumoral – Teses. 5. Doxorrubicina – Teses. 6. Lipossomas – Teses. I. Oliveira, Mônica Cristina de. II. Ferreira, Diego dos Santos. III. Barros, André Luís Branco de. IV. Leite, Elaine Amaral. V. Cassali, Geovanni Dantas. VI. Lopes, Sávia Caldeira de Araújo. VII. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VIII. Título.

CDD: 616.994



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA FERNANDA ALVES BORATTO

Realizou-se, no dia 19 de fevereiro de 2016, às 14:00 horas, Sala 3061 - Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Investigação da atividade antitumoral de lipossomas ph-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina em modelo animal experimental*, apresentada por FERNANDA ALVES BORATTO, número de registro 2014664522, graduada no curso de FARMACIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Elton Luiz Silva (Universidade Federal de Ouro Preto), Profa. Gisele Assis Castro Goulart (UFMG), Diego dos Santos Ferreira (Massachusetts General Hospital), Profa. Mônica Cristina de Oliveira - Orientador (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, 19 de fevereiro de 2016.

Elton Luiz Silva
Prof. Elton Luiz Silva (Doutor)

Gisele Assis Castro Goulart
Profa. Gisele Assis Castro Goulart (Doutora)

Diego dos Santos Ferreira
Diego dos Santos Ferreira (Doutor)

Mônica Cristina de Oliveira
Profa. Mônica Cristina de Oliveira (Doutora)

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre sonharam junto comigo e me deram toda a força e suporte que precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar em todos os momentos, naqueles em que houve dificuldade assim como naqueles em que houve sucesso e principalmente por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida.

Aos meus pais, Beto e Nilma, por todo incentivo e esforço, sempre colocando meus sonhos à frente dos deles. Sou muito grata por tudo o que fizeram e fazem por mim. À minha mãe e melhor amiga, pela cumplicidade, por dividir comigo as aflições e os maiores sorrisos, por todo carinho e todas as orações para que eu tivesse condições de chegar ainda mais longe. Ao meu pai, meu herói, por me ensinar os valores mais nobres que existem, por todo o suporte e proteção e por acreditar que eu seria capaz de atingir esse tão sonhado objetivo.

Ao meu irmão, Igor, pela disponibilidade e desprendimento, por me ajudar sempre que precisei, por me inspirar como pesquisador e no amor à sua profissão.

À minha querida Família Alves, por me proporcionar os momentos mais alegres, pela torcida pelo meu sucesso e pela presença constante. Em especial aos meus padrinhos Antonio e Marlene por todo o incentivo e carinho.

Ao Gabriel, meu anjo, pelo companheirismo, carinho e compreensão em todos os momentos. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me dando apoio, conforto, e por me fazer feliz.

Aos meus sogros, Maciel e Paula, por me acolherem sempre com tanto carinho e zelo.

À Professora Monica, minha orientadora desde a iniciação científica, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional. Sou extremamente grata por tudo o que me ensinou, desde conhecimentos técnicos até valores inestimáveis como generosidade, justiça, gentileza e humildade.

Ao Diego, meu co-orientador, por todo o empenho, pela presença constante e pelas grandes contribuições que enriqueceram grandemente esse trabalho.

Aos Professores Geovanni e André pela colaboração, disponibilidade e agradável convivência.

À Sávia não somente pela colaboração nos Estudos de viabilidade celular, mas também pelos conselhos, pela disponibilidade, pelas inúmeras conversas e por me tranquilizar nos momentos de desespero, sempre com uma palavra amiga para me confortar.

À Professora Elaine, pela colaboração nos testes estatísticos e pela doçura, sempre me auxiliando com paciência e ternura.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Ana Luiza, Aina, Carol, Délia, Gabriel, Liziane, Lívia, Marcela, Mariana, Marina, Marjorie, Mayara, pela prazerosa convivência.

Aos amigos que a Faculdade de Farmácia me presenteou, Samira, Rummenigge, Nayara, Vinicius, Mário, Leandro, Luana e Isabela, pela amizade e pelos momentos inesquecíveis compartilhados.

Às minhas grandes amigas, Letícia, Júlia, Rapha, Thayná e Angela pelo apoio de sempre, por acreditarem no meu potencial e por dividirem comigo inúmeros momentos maravilhosos há tantos anos.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, sendo responsável por 20% dos casos novos de câncer a cada ano. As antraciclinas, particularmente a doxorrubicina, desempenham um papel importante no tratamento do câncer de mama. Entretanto, a elevada toxicidade, principalmente a cardiotoxicidade, e a baixa penetração em tumores sólidos são as principais causas de sua limitação como agente terapêutico. A encapsulação da doxorrubicina em lipossomas de circulação prolongada demonstrou benefícios, como a redução na incidência de efeitos adversos, dentre eles a toxicidade cardíaca, culminando no desenvolvimento da primeira formulação lipossomal para o tratamento do câncer, o Doxil[®], aprovado pelo FDA desde 1995. Apesar das vantagens, os lipossomas de circulação prolongada apresentam uma baixa taxa de liberação do fármaco encapsulado e/ou dificuldade para fundir com a membrana endossomal após a internalização celular. Esses fatores reduzem a concentração intracitoplasmática do fármaco, o que pode comprometer a eficácia terapêutica. Diante disso, formulações lipossomais pH-sensíveis contendo agentes antitumorais têm sido desenvolvidas para explorar a acidificação endossomal, que leva à desestabilização das membranas lipossomais seguida da liberação de seu conteúdo no meio intracitoplasmático. No presente trabalho, foram desenvolvidos e caracterizados lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorrubicina (SpHL-DXR) para avaliação da atividade citotóxica contra a linhagem de câncer de mama murino 4T1, assim como a atividade antitumoral em um modelo de tumor xenográfico mamário em camundongos. A formulação foi caracterizada físico-quimicamente por análises de diâmetro médio, índice de polidispersão (IP), potencial zeta e teor de encapsulação. Foram obtidos valores de diâmetro médio inferior a 200 nm, IP menor que 0,2 e potencial zeta próximo a neutralidade, permitindo a aplicação dessa formulação para os estudos *in vivo*. Estudo de estabilidade de armazenamento dos lipossomas brancos (isentos de doxorrubicina) a 4°C comprovou a manutenção das características físico-químicas da formulação por até seis meses, sugerindo a possibilidade da produção de um kit contendo, separadamente, a formulação branca e a doxorrubicina liofilizada, para aplicação em uso clínico. Os estudos de pH-sensibilidade demonstraram responsividade dos

lipossomas a alterações de pH. A citotoxicidade dos SpHL-DXR contra células da linhagem 4T1 foi avaliada por meio do ensaio de metabolização do MTT. O valor de IC_{50} obtido após o tratamento com SpHL-DXR foi igual a 1563 nM. Esse valor corresponde a uma redução de 35% em relação ao tratamento com a DXR livre (IC_{50} igual a 2413 nM), indicando melhora da citotoxicidade da DXR quando encapsulada nessa formulação. Para o estudo de atividade antitumoral, camundongos portadores de tumor xenográfico mamário foram tratados com tampão HEPES-salina pH 7,4 (grupo controle), lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada isentos de doxorubicina (SpHL brancos), solução de doxorubicina, formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] ou SpHL-DXR (dose igual a 4 mg de doxorubicina.Kg⁻¹) por via endovenosa a cada dois dias, totalizando quatro administrações. Os seguintes parâmetros foram avaliados durante o período de tratamento: volume tumoral e suas características histológicas, peso corporal, peso do tumor e avaliação histológica de órgãos de interesse (fígado, baço, rim, pulmão, osso e coração). Em termos do volume tumoral, o tratamento com SpHL-DXR foi capaz de estabilizar o crescimento tumoral, ao contrário do tratamento com solução de doxorubicina. Quanto a avaliação histológica, foram observadas maiores áreas de necrose, com células em cariólise e cariorrexe, nos tumores tratados com SpHL-DXR, enquanto os demais grupos apresentaram áreas de necrose menos extensas e maiores áreas compostas por células viáveis. Os órgãos analisados histologicamente (fígado, baço, pulmão, rim, osso e coração) do grupo tratado com SpHL-DXR não apresentaram alterações na arquitetura celular, indicando ausência de toxicidade.

Palavras chave: Doxorubicina. Lipossomas pH-sensíveis. Câncer de mama. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide, with 20% of all new cases of cancer each year, both in developing or developed countries. Anthracyclines, especially doxorubicin, play an important role in the treatment of breast cancer, however, the high toxicity, especially cardiotoxicity, and low penetration in solid tumors are the main limitations for its use. The encapsulation of doxorubicin in long-circulating liposomes helped to reduce the incidence of adverse effects, including cardiac toxicity, which led to the approval by FDA in 1995 of the first liposomal formulation for cancer treatment, Doxil[®]. Despite its advantages, generally long-circulating liposomes exhibit a low drug release rate and tend not to be able to merge with the endosomal membrane upon cell internalization. These factors reduce the intracytoplasmic concentration of the drug, which can compromise the therapeutic efficacy. Therefore, pH-sensitive liposomal formulations containing anticancer drugs have been developed to take advantage of the endosomal acidification, which leads to destabilization of the liposomal membranes followed by intracytoplasmic release of its internal content. In this work, it was developed a long-circulating and pH-sensitive liposomal formulation containing doxorubicin (SpHL-DXR) for evaluation of cytotoxicity against the murine breast tumor cell line 4T1 and the antitumor activity in a breast cancer animal model. SpHL-DXR were characterized by average diameter, polydispersity index (IP), zeta potential and encapsulation efficacy analyses. The average diameter was below 200 nm with IP no higher than 0.2 and zeta potential close to neutrality, allowing the application of this formulation for *in vivo* studies. Storage stability evaluation of blank liposomes (without doxorubicin) at 4°C confirmed the maintenance of the physico-chemical characteristics for up to six months, suggesting the possibility of production of a kit containing, separately, the blank formulation and the lyophilized doxorubicin for administration in patients. pH-sensitivity studies have shown responsiveness of liposomes to pH variations. Cytotoxicity of SpHL-DXR against 4T1 cell line was evaluated by MTT assay. IC₅₀ obtained for SpHL-DXR treatment was equal to 1563 nM. This value corresponds to 35% reduction when compared to free DXR (IC₅₀ equal to 2413 nM), indicating a strong improvement of cytotoxic activity upon liposomal encapsulation. For antitumor activity studies, breast tumor-bearing mice were intravenously treated with HEPES-buffered saline pH 7.4 (control group), blank

liposomes, free doxorubicin, liposomal formulation similar to Doxil[®] or SpHL-DXR (dose equal to 4 mg of doxorubicin.Kg⁻¹) every two days, in a total of four administrations. The following parameters were evaluated during the treatment period: tumor volume, tumor weight, and animal's body weight. Histological examination of tumor and organs of interest (liver, spleen, kidney, lung, bone and heart) were performed. Considering the tumor volume analyses, SpHL-DXR were able to stabilize tumor growth in contrast to free doxorubicin. For tumor histological analyses, it were observed large areas of necrosis with cell karyolysis and karyorrhexis in tumors treated with SpHL-DXR, while for the other groups less extensive areas of necrosis and larger areas of viable cells were observed. The histological analyses of organs (liver, spleen, lung, kidney, bone and heart) of animals treated with SpHL-DXR showed no alterations in cell architecture, suggesting lack of toxicity.

Key words: Doxorubicin. pH-sensitive liposomes. Breast cancer. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da doxorubicina.....	28
2	Representação esquemática da estrutura dos lipossomas.....	34
3	Estruturas químicas de CHEMS, DOPE e DSPE-PEG ₂₀₀₀	37
4	Representação esquemática das modificações de fase causadas pelo pH em lipossomas contendo DOPE e CHEMS.....	38
5	Esquema representativo do protocolo experimental, indicativo dos dias (D) correspondentes aos tratamentos (T), medida de peso corporal (P) e medida de volume tumoral (VT).....	49
6	Determinação do diâmetro médio e IP de SpHL Brancos em diferentes tempos de armazenamento.....	56
7	Determinação do potencial zeta de SpHL Brancos em diferentes tempos de armazenamento.....	56
8	Determinação do diâmetro médio e IP dos SpHL-DXR em diferentes intervalos de tempo de armazenamento.....	58
9	Determinação do potencial zeta dos SpHL-DXR em diferentes intervalos de tempo de armazenamento.....	58
10	Determinação do teor de encapsulação dos SpHL-DXR em diferentes intervalos de tempo de armazenamento.....	59
11	Determinação da variação do potencial zeta de formulações de SpHL Brancos em função do pH.....	67
12	Determinação da variação do potencial zeta de formulações contendo DOPE:CHEMS em função do pH.....	68
13	Determinação da variação do potencial zeta de formulações de SpHL-DXR em função do pH.....	69
14	Determinação do volume tumoral após a administração de HBS, SpHL Brancos, solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil [®] e SpHL-DXR na dose de 4,0 mg.Kg ⁻¹ em camundongos Balb/c portadores de tumor de mama da linhagem 4T1.....	71

15	Determinação do peso do tumor após a administração de HBS, SpHL Brancos, solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil [®] e SpHL-DXR na dose de 4,0 mg.Kg ⁻¹ em camundongos Balb/c portadores de tumor de mama da linhagem 4T1.....	74
16	Tumores representativos retirados de animais tratados com HBS, SpHL Brancos, SpHL-DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil [®] e solução de DXR.....	75
17	Fotomicrografias representativas dos tumores de mama da linhagem 4T1 implantados em camundongos Balb/c fêmeas dos grupos tratados com HBS, com SpHL Brancos, com solução de DXR, formulação lipossomal semelhante ao Doxil [®] ou SpHL-DXR. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 2 ou x 40.....	76
18	Determinação da variação do peso corporal de camundongos Balb/c fêmeas portadores de tumor de mama 4T1 submetido a diferentes tratamentos.....	79
19	Fotomicrografias dos tecidos hepático, esplênico, renal, pulmonar e ósseo de camundongos Balb/c pertencentes ao grupo tratado com HBS (controle), grupo tratado com SpHL-DXR e grupo tratado com solução de DXR. Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 40.....	80
20	Fotomicrografias do tecido cardíaco de camundongos Balb/c pertencentes ao grupo tratado com HBS, grupo tratado com SpHL-DXR, grupo tratado com solução de DXR e grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil [®] . Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 40.....	82

LISTA DE TABELAS

1	Determinação do diâmetro médio, IP e potencial zeta das formulações SpHL Brancos e SpHL-DXR.....	51
2	Determinação do diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação das formulações semelhantes ao Doxil [®]	54
3	Distribuição percentual do diâmetro médio dos SpHL Brancos em diferentes valores de pH por intensidade, volume e número.....	62
4	Distribuição percentual do diâmetro médio das formulações compostas por DOPE:CHEMS em diferentes valores de pH por intensidade, volume e número.....	64
5	Distribuição percentual do diâmetro médio das formulações de SpHL-DXR em diferentes valores de pH por intensidade, volume e número.....	66
6	Valores de IC ₅₀ para a linhagem celular 4T1.....	69
7	Determinação do volume tumoral relativo e da taxa de inibição do crescimento tumoral após a administração de solução de HBS, de solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil [®] e SpHL-DXR..	73

LISTA DE SIGLAS

CHEMS	Hemissuccinato de coleslerila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMEM	<i>Dubelcco's modified Eagle's medium</i>
DOPE	Dióleilfosfatidiletanolamina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplada ao polietilenoglicol 2000
DXR	Doxorrubicina
EPR	Permeação e retenção aumentados
FDA	Food and Drug Administration
HBS	Tampão HEPES-salina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HSPC	Fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IP	Índice de Polidispersão
L α	Fase lamelar rígida
L β	Fase lamelar fluida
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
PEG	Polietilenoglicol
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SpHL Brancos	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada isentos de doxorrubicina
SpHL-DXR	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorrubicina

LISTA DE SIGLAS (CONTINUAÇÃO)

TE	Teor de encapsulação
Tm	Temperatura de transição de fase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer	18
1.1.1 Câncer de mama.....	24
1.2 Doxorubicina	27
1.3 Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos	31
1.3.1 Lipossomas	33
1.3.1.1 Lipossomas contendo DXR no tratamento do câncer.....	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Material	41
3.2 Métodos	41
3.2.1 Preparo dos SpHL-DXR	41
3.2.1.1 Preparo dos lipossomas.....	41
3.2.1.2 Calibração do diâmetro.....	42
3.2.1.3 Encapsulação da DXR.....	42
3.2.1.4 Purificação da dispersão lipossomal.....	43
3.2.2 Preparo da formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]	43
3.2.2.1 Encapsulação da DXR.....	43
3.2.3 Caracterização química e físico-química	44
3.2.3.1 Diâmetro médio e distribuição do tamanho das vesículas.....	44
3.2.3.2 Potencial zeta.....	44
3.2.3.3 Determinação do teor de encapsulação de DXR.....	44
3.2.4 Estudo de estabilidade de SpHL Brancos	45
3.2.5 Avaliação da pH-sensibilidade	46
3.2.6 Estudo de citotoxicidade	46
3.2.6.1 Cultivo celular.....	46
3.2.6.2 Estudo de viabilidade celular.....	46
3.2.7 Estudo de avaliação da atividade antitumoral	48
3.2.7.1 Desenvolvimento do tumor.....	48
3.2.7.2 Tratamento.....	48
3.2.7.3 Avaliação da atividade antitumoral.....	49
3.3 Análise Estatística	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Caracterização química e físico-química de SpHL Brancos e SpHL-DXR	50
4.2 Caracterização química e físico-química da formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]	52

SUMÁRIO (CONTINUAÇÃO)

4.3 Estudo de estabilidade de SpHL Brancos.....	54
4.4 Avaliação da pH-sensibilidade.....	60
4.4.1 Análise do diâmetro médio.....	60
4.4.2 Análise do potencial zeta.....	66
4.5 Avaliação da viabilidade celular.....	69
4.6 Avaliação da atividade antitumoral.....	70
4.7 Avaliação preliminar da toxicidade.....	78
5 CONCLUSÕES.....	82
6 PERSPECTIVAS.....	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo – uma em cada sete mortes são decorrentes dessa doença -, sendo que o número de mortes por câncer tende a aumentar consideravelmente devido ao envelhecimento da população global (VISVADER, 2011; WONG; CHEN, R.; CHEN, B., 2014). As estimativas para o ano de 2030 apontam 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes por câncer (INCA, 2014). Dentre os vários tipos, podemos destacar o de mama, como o mais frequentemente diagnosticado em mulheres, sendo responsável por cerca de 20 % da totalidade dos novos casos de câncer, todos os anos, no mundo todo.

O câncer engloba um grupo de cerca de cem doenças distintas que contêm fatores de risco variados e apresentam um processo de desenvolvimento constituído por várias etapas. Essas incluem a disfunção de genes que regulam a proliferação, divisão e morte celular e os que controlam o microambiente tecidual. Defeitos nesses genes ocasionam a formação de proteínas defeituosas, levando a capacidades funcionais adquiridas que permitem o crescimento anormal e invasão de outros tecidos (WONG; CHEN, R.; CHEN, B., 2014).

A crescente incidência do câncer demanda a elaboração de novas estratégias que permitam a detecção precoce, o melhoramento da classificação dos tumores a fim de guiar a escolha da terapia a ser adotada e o desenvolvimento de terapias preventivas eficazes. No que diz respeito ao tratamento, o direcionamento de fármacos antitumorais representa uma alternativa promissora já que permite contornar diversos desafios associados a essa doença, como por exemplo, proporcionar maior acúmulo do fármaco na região tumoral e reduzir a captação em órgãos sadios (VISVADER, 2011).

As antraciclinas, particularmente a doxorrubicina (DXR), desempenham um papel importante no tratamento do câncer de mama, tanto como adjuvante e em esquemas, assim como no tratamento de metástases provenientes desses tumores primários. Entretanto, apesar dos benefícios da DXR em termos de atividade

antitumoral, um fator limitante para a sua utilização é o baixo índice terapêutico (O'SHAUGHNESSY, 2003).

Os efeitos adversos cardíacos podem ser divididos em agudos ou crônicos. A toxicidade aguda engloba fenômenos usualmente reversíveis e não letais, como hipotensão, taquicardia e arritmias. Entretanto, os efeitos crônicos são os mais graves, podendo resultar em cardiomiopatia dilatada, levando a insuficiência cardíaca congestiva em alguns casos (LAO *et al.*, 2013).

Formulações lipossomais vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de aumentar o índice terapêutico da DXR, garantindo menor toxicidade, com adequada eficácia terapêutica. Os lipossomas de circulação prolongada contendo DXR são as formulações mais bem estudadas para o tratamento do câncer de mama, sendo que já foram realizados diversos ensaios clínicos. Essas formulações permitem um eficiente direcionamento para a região tumoral, com redução da toxicidade associada a DXR na sua forma livre, como mielossupressão, alopecia, náusea e vômito e especialmente, a toxicidade cardíaca (O'SHAUGHNESSY, 2003).

Dentre as formulações lipossomais contendo DXR, aprovadas para o tratamento antitumoral, destaca-se o Doxil[®] que foi aprovado pelo FDA em 1995, sendo utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer, como sarcoma de Kaposi associado a AIDS, câncer de ovário recorrente, câncer de mama metastático e mieloma múltiplo (BANDEKAR *et al.*, 2012). Essa formulação, composta por fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada (HSPC), colesterol e diestearilfosfatidilcolina acoplada ao polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀), apresenta vários benefícios em relação ao fármaco na sua forma livre como, por exemplo, o aumento da captação e retenção no tecido tumoral e a diminuição da toxicidade, principalmente a toxicidade cardíaca (BARENHOLZ, 2012).

Apesar dos avanços alcançados por formulações lipossomais, como o Doxil[®], não há ganho na eficácia do tratamento e a incidência de eventos adversos ainda é alta. Nesse contexto, se torna importante o aprimoramento dessas formulações, com o objetivo de garantir maior especificidade do fármaco para a região tumoral. Uma estratégia utilizada é o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis, a fim de

explorar o processo de acidificação endossomal para aumentar a entrega intracitoplasmática do fármaco. Essas formulações, após endocitose pelas células tumorais, sofrem desestabilização devido ao pH ácido dos endossomas, garantindo a liberação de seu conteúdo dentro do citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2013).

Ferreira e colaboradores (2014) desenvolveram uma formulação pH sensível contendo doxorubicina (SpHL-DXR), e obtiveram resultados promissores em um modelo de metástase óssea proveniente de tumor de mama primário em relação a doxorubicina livre. Diante desses resultados, tornou-se interessante a investigação da atividade antitumoral desta formulação na aplicação no tratamento de tumores mamários. Essa formulação foi avaliada em relação à estabilidade de armazenamento, pH-sensibilidade, atividade citotóxica e atividade antitumoral *in vivo* em modelo xenográfico de tumor mamário em camundongos.

1.1 Câncer

De acordo com estimativas do projeto GLOBOCAN de 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, a nível mundial, uma em cada sete mortes ocorrem devido ao câncer. Além de causar mais mortes do que a AIDS, a tuberculose e a malária juntas em todo o mundo, o câncer é a segunda principal causa de morte nos países desenvolvidos (atrás das doenças cardiovasculares) e a terceira causa de morte em países em desenvolvimento e sub-desenvolvidos (atrás das doenças cardiovasculares e doenças infecciosas e parasitárias) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No ano de 2012, houve 14,1 milhões de casos novos de câncer em todo o mundo, dos quais 8 milhões ocorreram nos países em desenvolvimento, que contêm cerca de 82 % da população mundial. Esses dados não incluem o câncer de pele do tipo não-melanoma. As estimativas correspondentes para o total de mortes provocadas por câncer em 2012 indicaram um total de 8,2 milhões de casos (aproximadamente 22.000 mortes por câncer por dia), sendo que 2,9 milhões ocorreram em países desenvolvidos e 5,3 milhões em países em desenvolvimento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Para o ano de 2030, são previstos 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população. Além disso, a estimativa de novos casos de câncer tende a aumentar no futuro devido a adoção de estilos de vida que aumentam o risco de ser acometido por essa doença, tais como tabagismo, má alimentação, sedentarismo (INCA, 2014).

Nos países desenvolvidos, os tipos de câncer mais comumente diagnosticados na população masculina são os de próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três tipos de câncer mais frequentes em homens são pulmão, fígado e estômago; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No Brasil, estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2016 apontam a ocorrência de aproximadamente 420 mil casos novos de câncer, sendo 214 mil para o sexo masculino e 206 mil para o sexo feminino. Os tipos de câncer mais incidentes na população brasileira serão tumores de próstata (61 mil), mama feminina (58 mil), cólon e reto (34 mil), pulmão (28 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (16 mil) (INCA, 2015). Como pode ser observado na **Figura 1**, em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres (**Figura 2**), os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e estômago. Esses dados não incluem o câncer de pele do tipo não-melanoma.

Tabela 1 - Estimativa do número de casos novos de câncer em homens no Brasil para o ano de 2016

Localização primária	Casos novos	Porcentagem (%)
Próstata	61.200	28,6
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1
Cólon e Reto	16.660	7,8
Estômago	12.920	6,0
Cavidade Oral	11.140	5,2
Esôfago	7.950	3,7
Bexiga	7.200	3,4
Laringe	6.360	3,0
Leucemias	5.540	2,6
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5
Linfoma não Hodgkin	5.210	2,4
Pele Melanoma	3.000	1,4
Linfoma de Hodgkin	1.460	0,7
Glândula Tireóide	1.090	0,5
Todas as neoplasias, exceto as de pele do tipo não-melanoma	214.350	
Todas as neoplasias	295.200	

Fonte: INCA, Estimativa 2016.

Tabela 2 - Estimativa do número de casos novos de câncer em mulheres no Brasil para o ano de 2016

Localização primária	Casos novos	Porcentagem (%)
Mama feminina	57.960	28,1
Cólon e Reto	17.620	8,6
Colo do útero	16.340	7,9
Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3
Estômago	7.600	3,7
Corpo do útero	6.950	3,4
Ovário	6.150	3,0
Glândula Tireóide	5.870	2,9
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3
Leucemias	4.530	2,2
Cavidade Oral	4.350	2,1
Esôfago	2.860	1,4
Pele Melanoma	2.670	1,3
Bexiga	2.470	1,2
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5
Laringe	990	0,5
Todas as neoplasias, exceto as de pele do tipo não-melanoma	205.960	
Todas as neoplasias	300.870	

Fonte: INCA, Estimativa 2016.

Conceitualmente, câncer é um termo genérico que caracteriza um grupo de doenças causadas por um processo de várias etapas que envolvem o mau funcionamento de genes que regulam a proliferação, morte celular e o microambiente tecidual. Falhas das proteínas codificadas por genes defeituosos levam a uma série de características adquiridas que permitem crescimento descontrolado e a invasão de células anormais em outros órgãos. Dessa forma, evidências sugerem que a maior parte dos cânceres não são causados por um único fator ou evento, em vez disso, uma célula normal desenvolve uma sequência de estágios pré-malignos até o câncer invasivo (WONG; CHEN, R.; CHEN, B., 2014; NEAL & YU, 2010).

Para que um tumor se desenvolva, precisa adquirir as seguintes características: sinalização proliferativa autossustentada; capacidade de evadir a apoptose assim como os agentes supressores de crescimento; autossuficiência para os sinais de crescimento; capacidade de invasão, metástase e replicação ilimitada; indução de angiogênese; resistência à morte, entre outras (NEAL & YU, 2010; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Apesar de a carcinogênese incluir múltiplos eventos celulares e moleculares que levam a transformação de células normais em células malignas, evidências definem três passos principais: iniciação, promoção e progressão.

A iniciação representa a fase em que uma célula normal sofre danos não reparados em seu DNA, ocorrendo síntese de DNA defeituoso, originando uma célula mutante inicial. A formação de uma célula mutante inicial pode ocorrer por meio de interações com carcinógenos físicos, como radiação ultravioleta, assim como agentes químicos que apresentam propriedades mutagênicas ou danosas ao DNA. Além disso, durante a proliferação celular, podem ocorrer mutações no DNA que não são corrigidas devido a alguma falha no sistema de reparo, resultando na formação de células iniciais espontaneamente mutantes (TANAKA *et al.*, 2013). Nessa etapa, as células iniciais podem ficar latentes por semanas, meses ou anos, ou então podem crescer de forma autônoma e clonal. A divisão celular permanece simétrica criando duas células iniciais, ocorrendo posteriormente a expansão clonal decorrente de um processo mitogênico, provocando um aumento no número de novas células, além de ocorrer a inibição da apoptose (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Seguindo a formação de células iniciais, substâncias químicas e/ou endógenas podem causar crescimento clonal seletivo dessas células por um processo chamado “promoção”. A promoção tumoral envolve a expansão das células iniciais até uma lesão focal. O processo de promoção não está relacionado com a formação de um DNA reativo ou danificado, mas envolve a modulação da expressão gênica, resultando no aumento do número de células por meio da divisão celular e/ou diminuição da morte celular por apoptose (KLAUNIG *et al.*, 2011).

A principal atividade dos agentes promotores de tumor é o estímulo mitogênico. Para exercer os efeitos promotores de tumor que dependem da concentração, o estímulo promotor deve continuar por um longo período (semanas, meses ou anos) no tecido alvo. Efeitos promotores são reversíveis. Quando o efeito promotor de tumor desaparece, ocorre regressão do tumor – possivelmente através de mecanismos apoptóticos (TANAKA *et al.*, 2013).

A terceira etapa, a progressão, envolve um dano adicional ao genoma e, ao contrário do estágio de promoção, é irreversível. Essa etapa pode ser acelerada pelas exposições repetidas aos estímulos carcinogênicos ou por pressões de seleção que favoreçam o desenvolvimento clonal autônomo. Na primeira fase da progressão, por vezes referida como conversão neoplásica, as células pré-neoplásicas sofrem mutações adicionais resultando no desenvolvimento de um fenótipo maligno (DEVI, 2004). A progressão é caracterizada pela irreversibilidade, instabilidade genética, produção de fatores de crescimento, invasão, metástase, e alterações na bioquímica, metabolismo e morfologia das células afetadas (TANAKA *et al.*, 2013).

Após a etapa de progressão, as células podem perder a adesão, separando-se da massa tumoral e invadindo os tecidos vizinhos. Essas células também podem penetrar na corrente sanguínea ou na linfa e serem transportadas para outros órgãos/tecidos distantes do foco do crescimento primário, desenvolvendo dessa forma, tumores secundários em novos locais. Esse processo é denominado metástase (DEVI, 2004).

Os tumores malignos podem ser classificados como tumores sólidos ou hematológicos. É sabido que os tumores sólidos apresentam características fisiopatológicas peculiares tais como hipervascularização, arquitetura vascular incompleta, secreção de fatores de permeabilidade vascular e ausência de um sistema linfático efetivo (MAEDA *et al.*, 2000). Quando um tumor sólido atinge um determinado tamanho (normalmente entre 1 e 2 mm), a vasculatura normal presente em sua vizinhança não é suficiente para fornecer toda a demanda de oxigênio necessária para a sua proliferação, formando regiões hipóxicas. A hipóxia estimula a secreção de fatores de crescimento pró-angiogênicos e enzimas proteolíticas que

provocam o surgimento de novos vasos sanguíneos a partir dos capilares adjacentes ou de células tronco endoteliais circulantes (VERBRIDGE *et al.*, 2010). Esse processo, conhecido como angiogênese, promove o rápido desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos neoformados apresentam arquitetura irregular, com epitélio descontínuo e normalmente desprovidos da membrana basal (BERTRAND *et al.*, 2014).

Atualmente já é bem estabelecido o fenômeno que ocorre sob certas circunstâncias (inflamação/hipóxia – comum em tumores, infartos e infecções) do revestimento endotelial dos vasos sanguíneos se tornar mais permeável do que em tecidos saudáveis (TORCHILIN, 2011). A permeabilidade vascular aumentada além de ocorrer devido a formação de vasos irregulares, também é resultado de uma resposta inflamatória provocada inicialmente pelo tumor, ocorrendo a liberação de citocinas que promovem um aumento da permeabilidade com a finalidade de facilitar a diapedese das células de defesa. Além disso, devido à alta taxa de proliferação celular, há um aumento da pressão intratumoral, que leva ao colapso dos vasos linfáticos (MAEDA, 2010). Como resultado disto, nessas áreas, partículas de tamanho variando de 10 a 500 nm, conseguem deixar o leito vascular e se acumular dentro do espaço intersticial, permanecendo nesse local, devido a ineficiente drenagem linfática. Caso essas grandes moléculas ou partículas estejam carregadas com um agente terapêutico, esse pode se acumular e ser liberado na região afetada. Esse acúmulo espontâneo ou direcionamento “passivo” é denominado efeito de permeabilidade e retenção aumentados (EPR) (TORCHILIN, 2011).

Sabe-se que tecidos tumorais apresentam um pH mais baixo (aproximadamente pH 6,5) do que tecidos normais (pH 7,4) e essa diferença pode ser utilizada como base para o desenvolvimento de nanocarreadores responsivos ao pH (GUAN *et al.*, 2013). A redução do pH tumoral pode ser explicada pela má organização das estruturas vasculares dentro dos tecidos tumorais, que resulta em um fluxo sanguíneo heterogêneo e uma entrega de nutrientes de forma não uniforme. Isso força as células presentes em regiões pobremente perfundidas a produzirem energia por meio de um aumento na taxa de glicólise anaeróbica, que por sua vez leva a um aumento na produção de ácido lático. Uma vez que o sistema linfático é ineficiente nessas regiões, o ácido lático não é removido adequadamente, resultando em uma

redução do pH no interstício tumoral (FERREIRA *et al.*, 2013). Além disso, algumas organelas celulares também apresentam pH reduzido, como é o caso dos endossomas (pH entre 5 e 6), que podem também serem explorados para a entrega de fármacos. Assim, estratégias terapêuticas de direcionamento e que sejam responsivas às variações de pH são promissoras para contornar os grandes desafios associados ao tratamento do câncer (VISVADER, 2011).

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado em mulheres no mundo, sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres em países em desenvolvimento e a segunda causa de morte em países desenvolvidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). No Brasil, a estimativa para o ano de 2016 é de 57.960 novos casos (INCA, 2015).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, resultado de interação entre fatores genéticos com hábitos de vida, comportamento reprodutivo e meio ambiente. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos, como: envelhecimento, fatores relacionados à vida reprodutiva da mulher, história familiar de câncer de mama, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (INCA, 2014).

Parte do risco de uma mulher desenvolver câncer de mama está relacionado à sua exposição a hormônios que são produzidos nos ovários – estrogênio e progesterona. O estradiol tem efeito mitogênico e antiapoptótico sobre as células epiteliais da mama e a progesterona parece agir em sinergia. Fatores reprodutivos que aumentam a duração e/ou os níveis de exposição aos hormônios ovarianos, que estimulam o crescimento celular, estão sendo associados com um maior risco de câncer de mama (NCI, 2015). Mulheres que usaram terapia de reposição hormonal combinada contendo estrogênio e progesterona por mais de cinco anos têm uma chance maior de desenvolver câncer de mama (NCI, 2015).

Sabe-se que o risco de um indivíduo desenvolver câncer de mama aumenta proporcionalmente com o número de parentes afetados. Cerca de 5-10% da carga total de câncer de mama segue um padrão de herança mendeliana (autossômica dominante) e é caracterizado como hereditária. Um adicional de 15-20% dos casos de câncer de mama são familiares, que se refere às mulheres que têm dois ou mais parentes de primeiro ou de segundo grau com a doença. Entre os casos de câncer de mama hereditário, pelo menos, 30% são atribuídos a mutações germinativas nos genes BRCA-1 e BRCA-2 (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015). Mulheres que apresentam as mutações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 podem optar por fazer a mastectomia preventiva. A remoção da mama em casos como esse pode reduzir o risco de câncer de mama em 90% ou mais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Outros genes têm surgido como alvos susceptíveis para o câncer de mama, tais como TP53 e PTEN, CHEK2, ATM e PALB2. A identificação das síndromes hereditárias de câncer de mama é de grande importância, para que as estratégias de aconselhamento genético, testes de rastreio e prevenção possam ser oferecidos aos indivíduos afetados (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015).

Apesar do câncer de mama ser altamente curável quando se tem um diagnóstico precoce, essa doença se torna incurável e às vezes até fatal caso ocorra metástase em órgãos distantes. Mais de 90% das mortes decorrentes do câncer de mama não são causadas pelo tumor primário, mas ocorrem como um resultado da metástase (CAO *et al.*, 2015).

A metástase é um processo complexo que compreende várias etapas, incluindo a invasão tecidual pelas células tumorais do tumor primário e passagem para a circulação sanguínea, sobrevivência no sangue e nos vasos linfáticos, extravasamento para tecidos distantes e proliferação nesses órgãos. A capacidade de células tumorais se desenvolverem em órgãos distantes ao tumor primário depende de complexas interações entre as células disseminadas e o microambiente tecidual dos órgãos invadidos e pode estar relacionado com a produção e liberação de fatores de crescimento, quimiocinas, moléculas guias pelo órgão-alvo ou tumor

(FOKAS *et al.*, 2007). Os sítios de metástases provenientes de tumor de mama primário mais comuns são pulmões, ossos, fígado e cérebro (CAO *et al.*, 2015).

O câncer de mama compreende tumores heterogêneos com diferentes características clínicas, cursos de doenças e respostas a tratamentos específicos. A Patologia clássica organiza os tumores de mama em várias categorias, com base na sua morfologia geral e organização estrutural. Os tipos mais comuns são o carcinoma ductal invasivo (cerca de 75% dos casos) e o carcinoma lobular invasivo (cerca de 10% dos casos). Juntas, essas duas categorias e suas combinações formam a grande maioria (cerca de 90%) dos cânceres de mama, enquanto outros tipos menos comuns como medular, neuroendócrino, tubular, apócrino, metaplásico, mucinoso, inflamatório, e tipos micropapilares, representam os 10% restantes (BERTOS & PARK, 2011).

O carcinoma ductal invasivo surge inicialmente nos ductos mamários. Pode ocorrer de algumas células conseguirem atravessar os ductos e posteriormente proliferarem no tecido adiposo adjacente. Ao atingir esse ponto, essas células podem se espalhar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da circulação sanguínea, formando metástases. Cerca de 8 em 10 cânceres de mama invasivos são do tipo carcinoma ductal. Já o carcinoma lobular invasivo, tem origem nas glândulas mamárias e assim como o ductal invasivo, também pode provocar metástases (ARPINO *et al.*, 2004; CRISTOFANILLI *et al.*, 2005; VLUG *et al.*, 2014).

Do ponto de vista clínico, o câncer de mama pode ser subdividido em três grupos principais: tumores que expressam receptores de estrogênio e/ou receptores de progesterona, tumores com expressão amplificada do receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER-2), e o grupo restante comumente referido como o câncer de mama triplo-negativo, devido à falta de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e uma expressão de HER-2 normal ou negativa (HIGGINS & BASELGA, 2011).

Dentre os tipos de câncer de mama citados acima, o triplo-negativo é o que apresenta o pior prognóstico (BERTOS & PARK, 2011). Esses tumores correspondem à cerca de 15% de todos os cânceres de mama invasivos e

geralmente apresentam histologicamente menor proporção de arranjos tubulares, alto grau de pleomorfismo nuclear e elevado índice mitótico (FOULKES *et al.*, 2010).

Atualmente o câncer de mama é considerado uma doença tratável, sendo que diversas classes de fármacos antitumorais têm sido empregadas. Dentre elas destacam-se as antraciclinas (como a DXR e a epirrubicina) e os taxanos (como o paclitaxel e o docetaxel) para o tratamento de câncer de mama em estágios iniciais. Esses fármacos podem ser utilizados isoladamente ou em terapias combinadas com outros quimioterápicos como o fluoracil, ciclofosfamida e a carboplatina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Para o tratamento do câncer de mama HER-2 positivo, pode ser utilizado o trastuzumab geralmente associado com um taxano. Alguns fármacos são comumente utilizados no tratamento do câncer de mama em estágio avançado, como: docetaxel, paclitaxel, derivados da platina (cisplatina, carboplatina), vinorelbina, capecitabina, DXR lipossomal (Doxil[®]), gencitabina, mitoxantrona, ixabepilona, nanopartículas de paclitaxel (Abraxane[®]), e eribulina (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

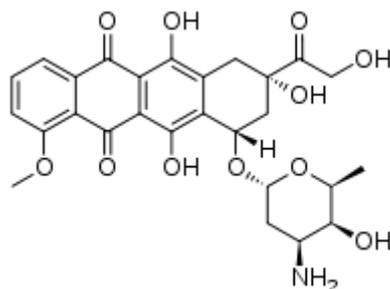
Plataformas de entrega de fármacos por meio de nanocarreadores estão emergindo como poderosas ferramentas para o tratamento do câncer de mama. Formulações nanoestruturadas contendo DXR e paclitaxel são atualmente utilizados clinicamente, apresentando parâmetros farmacocinéticos distintos que prolongam o tempo de circulação sanguínea, aumentam o acúmulo dos fármacos nos tumores, e limitam os efeitos adversos nos pacientes (BLANCO & FERRARI, 2014).

1.2 Doxorubicina

A DXR é um fármaco citotóxico pertencente à classe das antraciclinas, contendo o grupo cromofórico tetraidrotetracenquinônico planar associado a um açúcar. Assim como a daunorubicina, a primeira antraciclina a ser descrita, a DXR foi isolada a partir de uma espécie de bactéria - *Streptomyces peucetius* - retirada de uma amostra de solo (YANG *et al.*, 2014). A estrutura da DXR (Figura 1) apresenta uma porção aglicídica que consiste de quatro anéis planares com grupos adjacentes aos anéis quinona-hidroquinona, um substituinte metoxila no primeiro anel e um grupo α -

hidroxicetona no quarto anel. O componente glicídico (conhecido como daunosamina) está ligado a um dos anéis por uma ligação glicosídica (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Figura 1 - Estrutura química da doxorubicina



A daunorrubicina e DXR permanecem, ainda hoje, como as antraciclinas que possuem maior atividade antitumoral da classe. Embora a atividade citotóxica seja pronunciada, a baixa especificidade, a alta toxicidade e o desenvolvimento de resistência são alguns fatores que limitam o uso na quimioterapia do câncer (MINOTTI *et al.*, 2004).

A consideração clínica mais importante para a seleção da DXR como um agente quimioterápico é o fato de ser considerado um dos agentes antitumorais mais eficazes já desenvolvidos e, portanto, tornou-se um dos principais fármacos de primeira escolha para o tratamento do câncer desde a sua descoberta até a atualidade. É mais eficaz contra vários tipos de câncer (incluindo leucemias, linfomas, mama, útero, ovário e pulmão) do que qualquer outra classe de agentes quimioterápicos. No entanto, como a maioria dos outros antitumorais, a DXR tem toxicidade e efeitos secundários associados à sua utilização. Sua toxicidade mais nociva é a cardiotoxicidade, que é cumulativa e dose-dependente, podendo provocar insuficiência cardíaca congestiva irreversível, o que limita consideravelmente a sua utilização (dose acumulativa máxima permitida é de 550 mg.m⁻²). Seus outros efeitos colaterais incluem grave mielossupressão, náuseas e vômitos, efeitos mucocutâneos (estomatite, alopecia, graves danos no tecido local) (BARENHOLZ, 2012).

Vários mecanismos vêm sendo atribuídos a sua atividade citotóxica, como: (i) intercalação com o DNA nuclear e com o DNA mitocondrial, resultando na inibição da biossíntese de DNA; (ii) ligação e estabilização do complexo DNA- topoisomerase

II, impedindo a passagem dessa enzima através da fita de DNA, e conseqüentemente, levando a quebra nas cadeias do DNA; (iii) liberação direta do citocromo c mitocondrial, e subseqüente, sinalização de apoptose; (iv) formação de radicais livres resultantes de stress oxidativo, que pode causar peroxidação lipídica e dano ao DNA (SEMPKOWSKI, *et al.* 2014).

A translocação da DXR do citoplasma para o núcleo das células proliferativas tem sido atribuída à presença dos proteassomas, que são complexos de proteinases intracelulares que vêm sendo identificados em várias células eucarióticas. A DXR exibe uma alta afinidade de ligação aos proteassomas citoplasmáticos, formando um complexo que por sua vez é transportado para o núcleo através de um poro nuclear dependente de ATP. Uma vez dentro do núcleo, ocorre a dissociação do complexo já que a DXR possui maior afinidade pelo DNA do que pelo proteassoma, permitindo que ocorra as interações desse fármaco com o DNA (SEMPKOWSKI *et al.*, 2014).

Juntamente com a intercalação com o DNA, a interferência na ação da topoisomerase II permanece como o mecanismo mais convincente da citotoxicidade da DXR. Essa enzima regula o empacotamento do DNA. Primeiramente ocorre a sua ligação ao DNA, a clivagem das duas fitas, a passagem de uma das fitas de DNA através do sítio clivado de maneira dependente de ATP, e então a junção das fitas no sítio original de clivagem (SEMPKOWSKI *et al.*, 2014). Dessa forma, a topoisomerase II pode causar uma quebra transitória da dupla fita de DNA, que posteriormente é selada depois de alterar o estado de torção da cadeia (MINOTTI *et al.*, 2004). A DXR age estabilizando o intermediário da reação na qual as cadeias de DNA são cortadas, e posteriormente, ligadas covalentemente a resíduos de tirosina da topoisomerase II, eventualmente impedindo a selagem do DNA. A formação e a estabilidade do complexo ternário formado pela DXR-DNA-topoisomerase II depende de determinantes estruturais definidos. O sistema de anéis planares é importante para a intercalação com o DNA, uma vez que os anéis que contém os grupos quinona e hidroquinona fazem ligações com determinadas pares de bases enquanto que o anel que contém o substituinte metoxila passa através do sítio de intercalação. A parte externa da molécula, que não participa da intercalação (o resíduo glicídico e o anel ligado ao mesmo) parece desempenhar um papel importante na formação e estabilização do complexo ternário (MINOTTI *et al.*, 2004). Ao estabilizar esse complexo, a DXR impede que a dupla hélice seja liberada e,

conseqüentemente, ocorre a interrupção do processo de replicação. Esse complexo estável prejudica a habilidade das células de reparar lesões no DNA e podem eventualmente promover uma sinalização para desencadeamento de apoptose (SEMPKOWSKI *et al.*, 2014).

Sendo um agente intercalador de DNA, a DXR tem preferência de efetuar a intercalação em sítios que contém pares de bases de guanina e citosina, provavelmente devido a formação de uma ligação de hidrogênio específica entre a DXR e a guanina. A formação de adutos de DNA-DXR parece ativar respostas ao dano no DNA e induz a morte celular de forma independente da topoisomerase II (YANG *et al.*, 2014).

A atividade da DXR também pode estar associada com a formação de radicais livres. A adição de um elétron na porção quinona da DXR resulta na formação de um radical de semiquinona, mediado por enzimas NADPH-redutases. Esse radical formado reage com oxigênio rapidamente gerando superóxido e peróxido de hidrogênio, causando posteriormente dano ao DNA. Além disso, a DXR é um quelante de ferro e o complexo DXR-ferro é capaz de catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio em radicais hidroxilas altamente reativos. Radicais livres podem interagir com lípidos insaturados e induzir a peroxidação lipídica além de oxidar grupos tióis de proteínas funcionais. Assim, a DXR induz a liberação de radicais livres causando stress oxidativo, resultando em dano ao DNA e morte celular (YANG *et al.*, 2014; SEMPKOWSKI *et al.*, 2014; MINOTTI *et al.*, 2004).

Apesar da DXR ser uma das antraciclina mais largamente utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer, seu uso tem sido dificultado devido às suas propriedades cardiotoxícas que podem levar a insuficiência cardíaca congestiva e cardiomiopatias dilatáveis irreversíveis (MINOTTI *et al.*, 2004).

Os efeitos cardiotoxícos da DXR têm sido atribuídos a vários fatores, resultantes da sua habilidade em produzir espécies reativas de oxigênio, que levam a interrupção da homeostasia do cálcio resultando no *stress* oxidativo, provocando dano mitocondrial, necrose e induzindo vias apoptóticas. O tratamento utilizando DXR ainda pode causar disfunção contrátil, afetando as proteínas responsáveis pela contração de forma direta ou pela interrupção da homeostasia do cálcio celular.

Alguns fatores contribuem para a depressão da função contrátil como a subregulação da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático e da bomba de cálcio ATPase e a diminuição da entrada de cálcio no retículo (GHARANEI *et al.*, 2014).

Tem sido proposto que o aumento no *stress* oxidativo poderia levar a mudanças subcelulares no miocárdio, incluindo perda de miofibrilas e vacuolização das células miocárdicas. Outro mecanismo é o atraso na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa no coração, levando a uma deficiência no suprimento energético (SEMPKOWSKI *et al.*, 2014). Além disso, alguns estudos têm mostrado que a morte dos cardiomiócitos induzida pela DXR está associada com o aumento da expressão e da ativação da proteína pró-apoptótica p53 (GHARANEI *et al.*, 2014).

O uso clínico da DXR na sua forma livre é significativamente prejudicado devido a sua toxicidade cardíaca e por um número de efeitos adversos agudos e subagudos. Os sistemas nanoestruturados constituem uma alternativa interessante para contornar estes problemas e melhorar o índice terapêutico da DXR por meio da encapsulação do fármaco e, simultaneamente, reduzir os volumes de distribuição, reduzindo assim a toxicidade, e aumentando o acúmulo em células tumorais (SEMPKOWSKI *et al.*, 2014).

1.3 Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos

De acordo com a Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization* - ISO), nanopartículas são objetos que apresentam todas as suas dimensões externas na faixa de 1 a 100 nm (ISO, 2015). Os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos são partículas nanométricas compostas usualmente por substâncias atóxicas e biodegradáveis e apresentam uma capacidade de encapsulação de substâncias variadas, dependendo do tipo do sistema (PATEL *et al.*, 2013).

A encapsulação de fármacos em sistemas nanoestruturados apresenta diversas vantagens, como: proteção contra degradação; prevenção da interação precoce

entre fármaco e meio biológico; controle da farmacocinética do fármaco assim como do perfil de distribuição e melhoramento da penetração intracelular, dentre outras (PEER *et al.*, 2007). A obtenção dos carreadores nanoestruturados de fármacos pode contribuir significativamente para a melhora da estabilidade e da absorção do fármaco, facilitando a sua passagem através de diversas barreiras existentes no organismo. Além disso, podem fornecer maior eficácia terapêutica e diminuição da toxicidade (SAWANT & TORCHILIN, 2012). O uso desses sistemas pode superar vários entraves relacionados aos fármacos tradicionais como a baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade e distribuição inespecífica pelo organismo (TORCHILIN, 2014).

É desejável que o nanocarreador de aplicação parenteral apresente o seguinte conjunto de propriedades: a) circulação prolongada no sangue; b) habilidade de acumular de forma específica na região patológica de interesse; c) responsividade ao estímulo local, como mudanças de temperatura e/ou pH, resultando, por exemplo, em uma liberação acelerada do fármaco; d) capacidade de entregar o fármaco efetivamente dentro da célula ou em uma organela específica (TORCHILIN, 2012).

A oncologia representa o campo da medicina no qual a nanotecnologia tem feito as maiores contribuições. Nos últimos 15 anos, nanossistemas ocuparam um importante nicho no tratamento do câncer (SAKAMOTO *et al.*, 2010). Essas formulações podem preferencialmente realizar a entrega de fármacos quimioterápicos no sítio tumoral devido ao seu tamanho reduzido e a circulação sistêmica prolongada. As nanopartículas tiram proveito das fenestrações presentes nos vasos sanguíneos tumorais associados aos espaçamentos entre as células endoteliais que variam de 100 a 400 nm, o que permite um aumento no extravasamento dos nanocarreadores para a região tumoral (BISWAS *et al.*, 2013). Sabe-se que em tumores sólidos, a permeabilidade vascular, assim como o fluxo sanguíneo encontram-se aumentados, facilitando a captura desses nanossistemas (MOGHIMI & SZE BENI, 2003). O efeito EPR permite que essas partículas se acumulem na região tumoral, devido ao diâmetro médio dessas partículas, que as tornam capazes de atravessar a barreira endotelial de vasos sanguíneos presentes

em regiões tumorais. Além disso, a diminuição da drenagem linfática permite a manutenção dos sistemas nessa região (WANG *et al.*, 2010).

Existem diversos tipos de nanossistemas, como lipossomas, nanopartículas poliméricas, micelas, nanopartículas de sílica ou de ouro, nanotubos de carbono, nanopartículas lipídicas sólidas, niossomos e dendrímeros. Dentre eles, destacam-se as formulações lipossomais, com os lipossomas contendo DXR sendo o primeiro sistema nanoestruturado disponível comercialmente para tratamento do câncer (SAKAMOTO *et al.*, 2010)

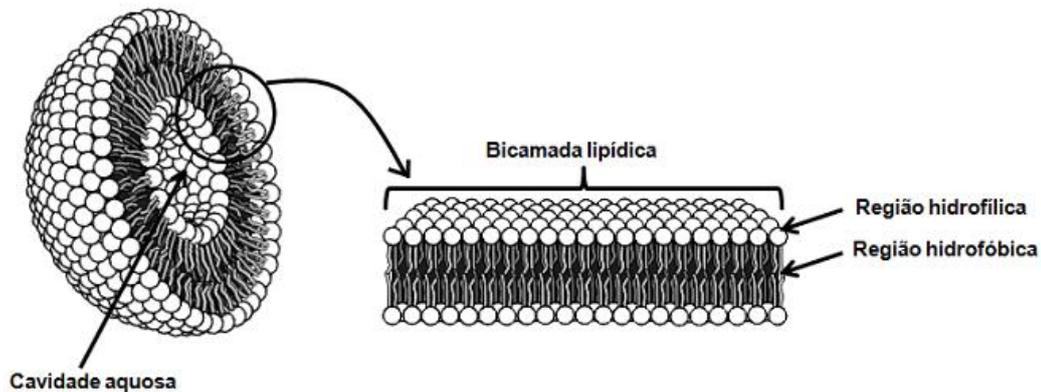
1.3.1 Lipossomas

Lipossomas foram primeiramente descritos em 1965 por Bangham e colaboradores, como modelos de membranas biológicas. São definidos como vesículas esféricas compostas por uma ou várias bicamadas lipídicas, envolvendo um compartimento aquoso (Figura 2) (NEW, 1990). A característica típica da organização dos lípides em bicamadas é decorrente da natureza anfifílica dos mesmos – presença de um grupo polar ligado covalentemente a duas cadeias hidrofóbicas. Quando esses lípides (tais como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina ou fosfatidilglicerol) são expostos a um meio aquoso, interações entre eles (interações hidrofílicas entre os grupos polares e interações de Van der Wals entre as cadeias hidrocarbonadas) levam a formação espontânea de bicamadas fechadas denominadas lamelas (BHAL *et al.*; 2012).

A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70. Entretanto, as primeiras formulações lipossomais estudadas não produziram os resultados esperados, devido principalmente à instabilidade das vesículas, ao baixo teor de encapsulação dos fármacos e à escolha inadequada da via de administração. Sua utilização foi viabilizada após o entendimento das características de estabilidade e de interações dessa forma farmacêutica (LASIC, 1998).

Dentre as vantagens do uso de lipossomas como veículos de entrega de fármacos, podemos destacar a biocompatibilidade, biodegradabilidade, monodispersão, não imunogenicidade e elevada capacidade de encapsular fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (BISWAS *et al.*, 2013). Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade interna aquosa, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípides. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada. Substâncias anfifílicas também podem ser encapsuladas, alojando-se ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar (NEW, 1990).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura dos lipossomas



Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas: vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas multilamelares (MLV). As vesículas unilamelares, formadas por uma única bicamada, são denominadas SUV quando possuem diâmetro compreendido entre 25-50 nm e LUV, quando são maiores que 100 nm. Os lipossomas multilamelares são formados por bicamadas sucessivas, separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro compreendido entre 100-1000 nm (NEW, 1990; LASIC, 1998). De forma geral, quanto à composição e ao mecanismo de liberação intracelular, as vesículas podem ser classificadas como convencionais, de circulação prolongada, de superfície modificada e polimórficas, incluindo nessa classe, os lipossomas pH-sensíveis, termossensíveis e catiônicos (BATISTA *et al.*, 2007).

Os lipossomas convencionais são considerados estruturalmente mais simples, pois são compostos apenas por fosfolípides e colesterol (VEMURI & RHODES, 1995). Entretanto, esses lipossomas podem apresentar instabilidade físico-química além de uma baixa eficiência de encapsulação. Em meio biológico, os lipossomas convencionais são reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM), sendo, então, rapidamente removidos da circulação sanguínea (VEMURI & RHODES, 1995). Ocorre rápida adsorção de proteínas séricas, as opsoninas, ocasionando na captura das vesículas e culminando no acúmulo em órgãos ricos em macrófagos como fígado, baço e medula óssea (ALLEN & HANSEN, 1991).

No ano de 1990, Klibanov e colaboradores demonstraram que a incorporação de um polímero hidrofílico, o polietilenoglicol (PEG), na bicamada lipídica aumentou significativamente o tempo de circulação sanguínea de lipossomas. O PEG é capaz de alterar a interação da vesícula com o ambiente, sendo o efeito mais importante a diminuição da captura pelos macrófagos e o prolongamento de sua presença na circulação. A presença de grupos hidrofílicos (PEG) na superfície dos lipossomas levam à formação de uma camada aquosa fixa no entorno dos lipossomas, com conseqüente aumento da hidrofilicidade da formulação, aumento das interações repulsivas entre lipossomas e componentes do sangue e formação de uma barreira estérica para a penetração de opsoninas, impedindo o reconhecimento e a destruição pelas células do SFM (KLIBANOV *et al.*, 1990; MARUYAMA, 2011). Esses lipossomas, denominados lipossomas de circulação prolongada, permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daqueles do SFM (FONTES *et al.*, 2005; TORCHILIN, 2007). Um exemplo de lípido utilizado em formulações lipossomais com a finalidade de se obter a circulação prolongada é o distearoilfosfatidiletanolamina acoplado a PEG₂₀₀₀ (DSPE-PEG₂₀₀₀), que nas concentrações de 5-10% confere uma excelente estabilidade às formulações (ULRICH, 2002).

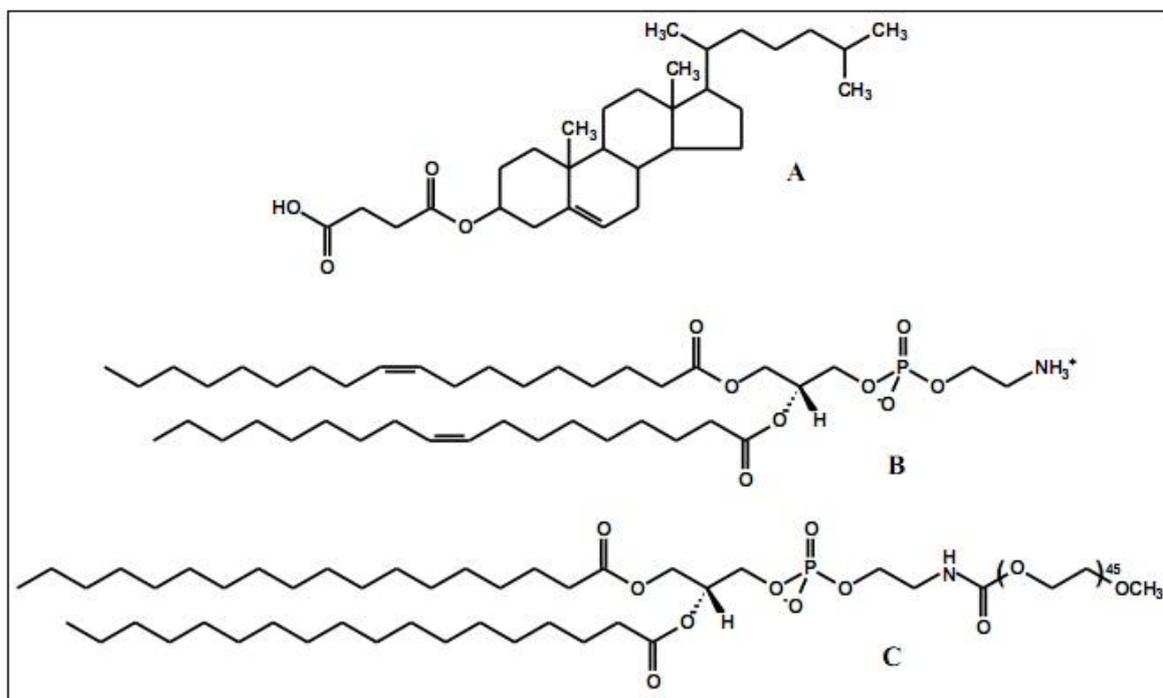
Apesar das vantagens obtidas por meio da adição de polímeros hidrofílicos na superfície das vesículas, os lipossomas convencionais e os de circulação prolongada apresentam uma lenta liberação do fármaco encapsulado ou podem não ser capazes de fundir com a membrana endossomal após a internalização celular.

Diante disso, lipossomas polimórficos vêm sendo desenvolvidos a fim de superar esses entraves. Esses lipossomas sofrem alterações na membrana quando submetidos a variações de pH, variações na temperatura ou na carga superficial (LOPES *et al.*, 2013).

Os lipossomas pH-sensíveis são estáveis em pH fisiológico, porém após entrarem em contato com o meio ácido existente na região extracelular de tecidos tumorais e dentro do compartimento endossomal, se desestabilizam, permitindo a liberação do material encapsulado no citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2013). O mecanismo molecular pelo qual os lipossomas ultrapassam a membrana endossomal para liberar o conteúdo dentro do espaço intracelular ainda não está bem esclarecido. A hipótese mais aceita é de que os lipossomas pH-sensíveis após terem sido endocitados, fundem com a membrana endossomal, sob a ação do baixo pH (menor que 6,0), e desestabilizam o endossoma, que por sua vez, libera o seu conteúdo diretamente dentro do citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2013).

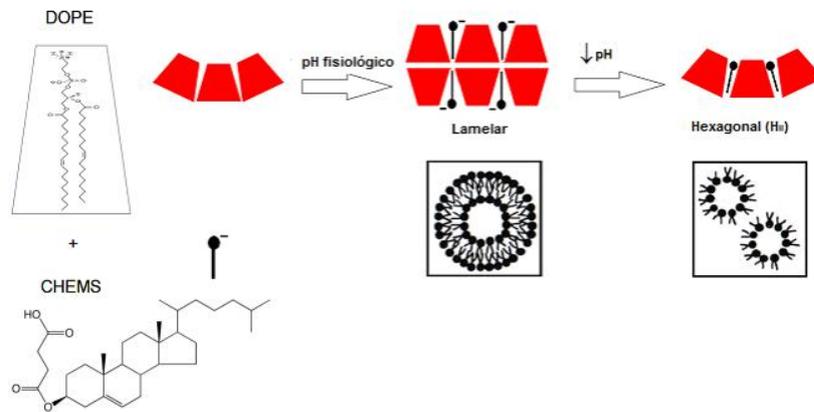
Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) (Figura 5). Esses derivados organizam-se em meio aquoso, à temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas (SIEGEL, 1986). Diferentemente da maioria dos fosfolípides, a DOPE possui uma cabeça polar pequena e pouco hidratada que ocupa um pequeno volume, quando comparado com o das respectivas cadeias de hidrocarbonetos, resultando em uma geometria molecular cônica. Esse formato favorece o estabelecimento de fortes interações intermoleculares entre os grupos amino e fosfato da sua cabeça polar, o que explica a tendência dessas moléculas a adquirirem a forma hexagonal invertida. A formação de lipossomas com esses fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico encontram-se sob a forma ionizada (Figura 3).

Figura 3 - Estruturas químicas de CHEMS (A), DOPE (B) e DSPE-PEG₂₀₀₀ (C).



Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, e os grupos fosfato dos fosfolípides, favorecem a organização lamelar possibilitando a formação dos lipossomas (Figura 4). A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido, como no interior dos endossomas, resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com conseqüente perda da repulsão eletrostática, desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2004 SUDIMACK *et al.*, 2002).

Figura 4 - Representação esquemática das modificações de fase causadas pelo pH em lipossomas contendo DOPE e CHEMS



Diante disso, o emprego de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo DXR pode ser uma alternativa promissora para o aumento de sua eficácia antitumoral bem como a redução de sua toxicidade. Essas estratégias farmacotécnicas permitem uma liberação preferencial na região tumoral devido ao ambiente de menor pH em relação às regiões normais, liberação no citoplasma decorrente da desestabilização lipossomal após endocitose assim como o direcionamento passivo alcançado pelo efeito EPR.

1.3.1.1 Lipossomas contendo DXR no tratamento do câncer

Sendo uma das doenças mais devastadoras mundialmente, o câncer sempre foi uma das principais aplicações da nanomedicina. Cerca de 20% dos sistemas terapêuticos nanoparticulados que já estão em uso clínico foram desenvolvidos para aplicação no tratamento do câncer. Esses incluem predominantemente sistemas lipossomais e micelares contendo antitumorais amplamente utilizados, embora pobremente biodisponíveis, tais como o paclitaxel, ou fármacos antitumorais indutores de efeitos adversos graves, como a DXR e a daunorrubicina. Essas formulações foram capazes de aprimorar a farmacocinética e a biodisponibilidade desses fármacos, e simultaneamente reduziram sua toxicidade (SCHUTZ *et al.*, 2013).

As primeiras formulações lipossomais contendo antraciclinas a serem testadas em humanos foram compostas por lipídes carregados negativamente (fosfatidilglicerol e cardiolipina) com diâmetros relativamente grandes - 300 a 500 nm. Essas formulações eram utilizadas com a finalidade de evitar a captação da DXR pelo coração, para reduzir sua toxicidade. Outros lipossomas contendo antraciclinas foram desenvolvidos para uso clínico, como o DaunoXome[®], que é uma formulação contendo daunorrubicina em lipossomas convencionais unilamelares, que apresentam diâmetro entre 35 – 65 nm e são compostos por diestearoilfosfatidilcolina e colesterol. Evacet[®] é outro exemplo de formulação de lipossomas convencionais de DXR, apresentando diâmetro de 150 nm e composta por fosfatidilcolina de ovo e colesterol (RANSON, 2001).

Com o desenvolvimento de lipossomas de circulação prolongada foi possível empregar essas formulações para entrega de fármacos citotóxicos. No caso de lipossomas de circulação prolongada contendo DXR (Caelyx[®] na Europa e Doxil[®] nos Estados Unidos), as vesículas são pequenas (aproximadamente 100 nm de diâmetro) e possuem 5% (mol/mol) de DSPE-PEG₂₀₀₀ (RANSON, 2001). O Doxil[®] (Janssen Biotech, Inc; Johnson & Johnson, EUA) foi a primeira formulação lipossomal a ser aprovada para uso clínico no tratamento do câncer pelo FDA, em 1995 (BARENHOLZ, 2012; SCHUTZ *et al.*, 2013). Atualmente, esse medicamento tem aprovação do FDA e do EMA (*European Medicines Evaluation Agency*) para as seguintes indicações de tratamento: sarcoma de Kaposi relacionado a AIDS, câncer de ovário recorrente, câncer de mama metastático e mieloma múltiplo (BARENHOLZ, 2012).

Grandes benefícios clínicos foram observados com o uso deste medicamento, como a redução significativa da cardiotoxicidade, mielossupressão, náuseas, vômitos e alopecia ao se comparar com a DXR administrada na forma livre (O'BRIEN *et al.*, 2004). Além disso, o acúmulo de Doxil[®] na região tumoral apresentou valores 60 vezes maiores quando comparado com a doxorubicina livre (VAAGE *et al.*, 1993a; VAAGE *et al.*, 1993b; VAAGE *et al.*, 1999). Além disso, o tempo de meia-vida plasmático do Doxil[®] observado foi de aproximadamente 73,9 h enquanto que para o fármaco livre esse valor é inferior a 10 minutos (O'BRIEN *et al.*, 2004).

Os lipossomas de circulação prolongada contendo DXR como o Doxil[®], são formulações quimioterápicas de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas únicas. A habilidade dessas formulações em minimizar os efeitos adversos da DXR livre já está bem estabelecida, sendo uma vantagem que exerce impacto na qualidade de vida do paciente (GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GRENADER, T., 2012). Apesar desses benefícios, esses lipossomas não possuem propriedades fusogênicas e podem apresentar dificuldades para liberar a DXR encapsulada no meio intracelular. Diante disso, torna-se interessante o desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de uma formulação pH-sensível de circulação prolongada contendo DXR, com o objetivo de aumentar a captação intratumoral, aumentando a eficácia e reduzindo a incidência de efeitos adversos em relação ao fármaco livre ou Doxil[®].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar do ponto de vista físico-químico uma formulação de lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada contendo DXR assim como investigar a sua citotoxicidade e atividade antitumoral em modelo de tumor de mama murino.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar os lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada contendo DXR (SpHL-DXR) quanto ao diâmetro e potencial zeta;
- Realizar estudos de estabilidade de armazenamento de SpHL brancos (isentos de DXR) e avaliar a manutenção da capacidade de encapsulação da DXR;
- Avaliar a pH-sensibilidade de SpHL brancos e SpHL-DXR mediante a avaliação da variação do diâmetro médio e do potencial zeta em função do pH;
- Avaliar a citotoxicidade dos SpHL-DXR frente às células tumorais da linhagem celular 4T1 (tumor de mama murino);

- Avaliar a atividade antitumoral dos SpHL-DXR em camundongos acometidos pelo tumor de mama 4T1, por meio de análises histológicas, avaliação de peso e volume tumoral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina etanosulfônico (HEPES), DXR, CHEMS, colesterol, sulfato de amônio e a tripsina foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada), DOPE e DSPE-mPEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O metanol de grau analítico para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi obtido da Tedia (Fairfield, EUA). O clorofórmio P.A., o fosfato de potássio monobásico anidro P.A. e o dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O hidróxido de sódio foi adquirido da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Células da linhagem tumoral 4T1 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, EUA). O meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina foram comprados da Invitrogen (São Paulo, Brasil). 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). As demais substâncias utilizadas foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo dos SpHL-DXR

3.2.1.1 Preparo dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico (BANGHAM, 1965), seguido de calibração de tamanho por extrusão. Inicialmente,

foram preparadas soluções clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀, em seguida, alíquotas dessas soluções foram transferidas para um balão de fundo redondo (razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente, e concentração lipídica total igual a 20 mM). O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo da marca Buchi Labortechnik AG, modelo R-215, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). Após obtenção do filme lipídico, foi adicionada quantidade suficiente de solução de NaOH (0,1 M) para promover a completa ionização do CHEMS, e então, o filme foi hidratado com solução de sulfato de amônio (300 mM, pH 7,4) à temperatura ambiente, com auxílio de um mini-shaker Ika, modelo MS1 (Staufen, Alemanha). Para a utilização em testes de pH-sensibilidade, foram preparados também lotes de lipossomas contendo apenas os lípidos DOPE e CHEMS (razão molar igual a 6:4, respectivamente, e concentração lipídica total igual a 20 mM) pelo método descrito acima.

3.2.1.2 Calibração do diâmetro

A dispersão de vesículas multilamelares resultante foi calibrada mediante sua passagem em membranas de policarbonato da marca Millipore (Billerica, EUA) de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm (5 ciclos em cada membrana), utilizando o extrusor Lipex Biomembranes, modelo T 001 (Vancouver, Canadá).

3.2.1.3 Encapsulação da DXR

A incorporação da DXR na formulação lipossomal pH-sensível foi realizada pelo método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio, como descrito por Ferreira (2015).

Primeiramente, lipossomas brancos de diâmetros calibrados pela extrusão, foram submetidos à ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima[®] L-80XP, Beckman Coulter; Brea, EUA) a 350.000 x g, 4°C, durante 120 minutos, com a finalidade de remover o sulfato de amônio presente no meio externo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi reconstituído com tampão HEPES-salina (HBS) pH 7,4. Posteriormente, 1,0 mL da formulação foi alíquotada e foi adicionada sobre 2,0 mg de cloridrato de DXR liofilizado. Agitou-se a mistura até a completa dissolução da

DXR e então, a mistura foi mantida em repouso por 2 h ou 24h sob refrigeração a 4°C.

3.2.1.4 Purificação da dispersão lipossomal

Após a encapsulação da DXR, os SpHL-DXR foram purificados por meio de ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima[®] L-80XP, Beckman Coulter; Brea, EUA), a 350.000 x g, 4°C, durante 120 minutos. Após o ciclo de ultracentrifugação, foram obtidos o *pellet* (fração purificada) e o sobrenadante (fração contendo DXR não encapsulada). O pellet foi reconstituído com HBS pH 7,4.

3.2.2 Preparo da formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]

Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico, seguido de calibração de tamanho por extrusão. Inicialmente, foram preparadas soluções clorofórmicas de HSPC, CHOL e DSPE-mPEG₂₀₀₀ e, em seguida, foram tomadas alíquotas dessas soluções que foram transferidas para um balão de fundo redondo (razão molar igual a 5,7:3,8:0,5, respectivamente, e concentração total igual a 20 mM). O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo da marca Buchi LabortechnikAG, modelo R-215, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). Após ter obtido o filme lipídico, esse foi hidratado com solução de sulfato de amônio (300 mM pH 7,4) à temperatura ambiente, com auxílio de um mini-shaker Ika, modelo MS1 (Staufen, Alemanha). A etapa de calibração do diâmetro foi feita conforme descrito no Item 3.2.1.2.

3.2.2.1 Encapsulação da DXR

Após a etapa de extrusão, foi realizada a ultracentrifugação dos lipossomas brancos (ultracentrífuga Optima[®] L-80XP, Beckman Coulter; Brea, EUA) a 350.000 x g, 4°C, durante 120 minutos, com a finalidade de remover o sulfato de amônio presente no meio externo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi reconstituído com HBS pH 7,4. A dispersão de lipossomas brancos (1 mL) resultante foi adicionada sobre 2 mg de cloridrato de DXR liofilizado, fazendo-se a devida agitação para a completa dissolução da DXR. Essa mistura foi mantida sob incubação

overnight a 4°C ou por 1h a 60°C. A etapa de purificação foi feita conforme descrito no Item 3.2.1.4.

3.2.3 Caracterização físico-química

Os SpHL-DXR bem como os lipossomas semelhantes ao Doxil[®] foram caracterizados quanto aos parâmetros descritos a seguir:

3.2.3.1 *Diâmetro médio e distribuição do tamanho das vesículas*

O diâmetro médio, a distribuição do tamanho das vesículas e o índice de polidispersão (IP) dos lipossomas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, a 25°C e a um ângulo de 90°, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra). As amostras foram diluídas em HBS pH 7,4.

3.2.3.2 *Potencial zeta*

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz associado à análise da mobilidade eletroforética das vesículas das formulações a um ângulo de 90° e a temperatura de 25°C. As amostras foram também diluídas em HBS pH 7,4 e as medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra).

3.2.3.3 *Determinação do teor de encapsulação de DXR*

A quantificação de DXR foi realizada por meio de CLAE e detecção fluorimétrica, com a colaboração do professor Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira (Laboratório de Pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG). O equipamento de CLAE consiste de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector de fluorescência modelo 2475 (Waters Instruments, Milford, EUA) monitorados por um computador utilizando o software Empower Pro[®] versão 6.00.00.00. Foi utilizada uma coluna ACE[®] C8 4,6 mm x 250

mm, 5 µm (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída pela mistura metanol:tampão fosfato 0,01 M, pH 3,0, na proporção volumétrica de 65:35, respectivamente. O volume de injeção das soluções foi de 20 µL, com tempo de corrida de 8,0 minutos, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,0 mL.min⁻¹. O material eluído foi detectado em comprimento de onda de excitação igual a 470 nm e emissão igual a 555 nm.

Para a análise da DXR encapsulada nos lipossomas, é necessário que ocorra e desestruturação da membrana lipídica para a liberação do fármaco. Os lipossomas foram solubilizados em álcool isopropílico na proporção 1:2 (v/v) e, em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente até atingir uma concentração teórica de DXR igual a 400 ng.mL⁻¹, e então, foi injetada no cromatógrafo. A quantidade de DXR foi determinada nos lipossomas antes (lipossomas não purificados) e após a ultracentrifugação (lipossomas purificados). O teor de encapsulação (TE) da DXR foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TE = \frac{[\text{Doxorrubicina}]_{\text{Lip Purificado}} \times 100}{[\text{Doxorrubicina}]_{\text{Lip Total}}}$$

3.2.4 Estudo de estabilidade de SpHL Brancos

Três lotes de SpHL Brancos foram fracionados em frascos de penicilina e armazenados a 4°C para todo o período do estudo de estabilidade. A cada tempo de investigação (0, 7, 14, 22, 32, 69, 120 e 180 dias) foi realizada a incubação da formulação com a DXR liofilizada, por 2h a 4°C. Posteriormente as formulações foram purificadas por ultracentrifugação, conforme descrito no Item 3.2.1.4. Em cada tempo investigado, as formulações lipossomais brancas e após incubação com DXR foram caracterizadas por análises de diâmetro médio, IP e potencial zeta e teor de encapsulação.

3.2.5 Avaliação da pH-sensibilidade

A avaliação da pH-sensibilidade foi realizada por análise das variações no diâmetro médio e potencial zeta das formulações SpHL brancos, SpHL-DXR e lipossomas contendo apenas DOPE:CHEMS em função do pH. Para tal, realizou-se uma titulação por adição de solução de HCl (1M) sobre a dispersão lipossomal (concentração lipídica igual a 0,4 mM) em HBS inicialmente em pH 7,4. Foram realizadas doze análises de diâmetro e potencial zeta na faixa de pH entre 7,4 e 3,0. Esses estudos foram realizados em um autotitulado MPT-2 (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra) acoplado a um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Inglaterra).

3.2.6 Estudo de citotoxicidade

3.2.6.1 Cultivo celular

As células da linhagem 4T1 foram mantidas em garrafas de cultura celular T-75 (Techno Plastic Products TPP, Transandingen, Suíça) contendo meio de cultura composto por uma mistura de DMEM e RPMI na proporção 1:1 (v/v) suplementado com SFB (10% v/v), penicilina (1% p/v) e estreptomicina (1% v/v). As culturas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Ao atingir o estágio de confluência, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e uma alíquota foi transferida para um novo frasco contendo meio de cultura completo.

3.2.6.2 Estudo de viabilidade celular

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, com a colaboração da Dra. Sávila Caldeira de Araújo Lopes. Para a determinação da atividade citotóxica dos SpHL-DXR, foi avaliado *in vitro* o efeito desses sobre a proliferação de células da linhagem 4T1. As células foram mantidas sob as condições descritas no item 3.2.6.1. A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de metabolização do MTT.

O ensaio de metabolização de MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que é indicativo da viabilidade e proliferação celular. Esse método baseia-se na capacidade das enzimas succinato desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, promoverem a redução do reagente MTT a cristais de formazan, os quais são quantificados por método espectrofotométrico (MOSMANN, 1983).

Após a contagem no hemocítômetro, 3×10^3 células/poço da linhagem 4T1 foram inoculadas em placas de 96 poços e mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C por 24 horas. Após esse tempo de incubação, as soluções de DXR livre, SpHL Brancos ou SpHL-DXR foram adicionadas aos poços (intervalo de concentração de DXR de 0,125 a 5 µM). Após 48 horas de incubação a 37° C e 5% de CO₂, o meio de tratamento foi removido e descartado e, em seguida, adicionou-se 100 µL de meio de cultura contendo 10% de SFB (v/v) e 0,5 mg de MTT/mL em cada poço da placa de cultura. Após duas horas de incubação, os meios foram removidos e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. A viabilidade celular foi estimada pela medida da taxa de redução de MTT mediante a avaliação da absorbância dos cristais de formazan formados, no comprimento de onda de leitura de 570 nm (Leitora de ELISA, Spectra Max L, Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os valores de absorbância do grupo controle (isento de tratamento) foram considerados como 100% para cálculo da porcentagem de alteração da viabilidade celular induzida pelos tratamentos.

Após a execução do ensaio descrito acima, foi possível a determinação das concentrações de DXR (na forma livre e incorporado aos lipossomas) necessárias para promover 50% de inibição da proliferação celular (IC₅₀), na linhagem celular estudada. Os dados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em comparação com o controle (média ± desvio padrão). Pelo menos dois experimentos independentes foram realizados.

3.2.7 Estudo de avaliação da atividade antitumoral

Quarenta e dois camundongos Balb/c fêmeas com 6-7 semanas de vida (aproximadamente 20 g) foram adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação e tiveram livre acesso à ração e água. Os estudos *in vivo* foram realizados sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG – Protocolo 41/2015. Esse estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André Luís Branco de Barros, da Faculdade de Farmácia da UFMG, e com o Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2.7.1 Desenvolvimento do tumor

No momento em que as células 4T1 atingiram a fase logarítmica de crescimento, as mesmas foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura incompleto com uma densidade de $2,5 \times 10^6$ células/100 μ L. Cem microlitros dessa suspensão foram inoculados no flanco esquerdo de cada animal. Os animais foram acompanhados quanto ao peso e medidas quantitativas do volume tumoral.

3.2.7.2 Tratamento

No sétimo dia após o inóculo, os animais foram divididos em cinco grupos com cinco a oito animais cada:

Grupo 1 – sete animais tratados com HBS pH 7,4 (Controle);

Grupo 2 – cinco animais tratados com SpHL brancos;

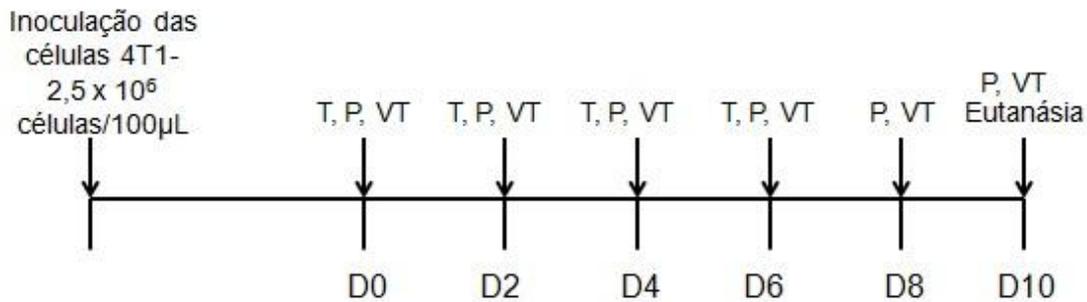
Grupo 3 – seis animais tratados com solução de DXR;

Grupo 4 – cinco animais tratados com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®];

Grupo 5 – oito animais tratados com SpHL-DXR.

O tratamento foi administrado por via endovenosa, com doses de $4,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$, a cada dois dias, em um total de quatro administrações. As formulações lipossomais e soluções foram administradas pela veia caudal utilizando seringas de insulina de 1 mL (Figura 5).

Figura 5 - Esquema representativo do protocolo experimental, indicativo dos dias (D) correspondentes aos tratamentos (T), medida de peso corporal (P) e medida de volume tumoral (VT).



3.2.7.3 Avaliação da atividade antitumoral

Foi realizado o acompanhamento do volume tumoral a cada dois dias, desde o primeiro dia do tratamento até quatro 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, 2009). No décimo sétimo dia após a inoculação dos tumores, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos alvo (coração, fígado, baço, osso, pulmões, e rins) e os tumores foram removidos para avaliação histopatológica. Os tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina. As imagens foram obtidas usando câmera digital Spot Insign Color adaptado a um microscópio Olympus BX-41 (Hamburgo, Alemanha) e o software de captura SPOT[®] versão 3.4.5. Foram também utilizados como parâmetros preliminares para avaliação da toxicidade *in vivo*: acompanhamento do peso corporal, mortalidade e avaliação histopatológica. Para os dados de peso corporal, a variação do peso ao longo do período experimental foi calculada em relação ao peso inicial.

Outra maneira utilizada para avaliar a atividade antitumoral é por meio do cálculo do volume tumoral relativo (VTR) e da taxa de inibição do crescimento (TIC) (LEITE *et al.*, 2012), conforme indicado abaixo:

$$\text{VTR} = \frac{\text{Volume tumoral em D10}}{\text{Volume tumoral em D0}}$$

$$\text{TIC (\%)} = 1 - \left(\frac{\text{VTR médio do grupo tratado}}{\text{VTR médio do grupo controle}} \right) \times 100$$

3.3 Análise Estatística

Os dados de peso corporal, volume e peso tumoral foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para a verificação da normalidade e homocedasticidade da variância utilizou-se os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pelas equações: $y = \log(\text{variável})$ ou $y = \text{seno}(\text{variável}) + 10$. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância seguida do teste de Tukey ou por teste T de Student não pareado. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor a 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização química e físico-química de SpHL Brancos e SpHL-DXR

Na Tabela 3 estão representados os valores de diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação das formulações SpHL Brancos e SpHL-DXR incubados por 2 e 24 horas. Foram obtidos valores de diâmetro médio iguais a 130 nm para a formulação SpHL Brancos, e 161 nm para SpHL-DXR incubados por 2 horas e 279 nm para SpHL-DXR incubados por 24 horas. Deshpande e colaboradores (2013) relataram que para que o efeito EPR ocorra, usualmente, os lipossomas devem

possuir diâmetros menores que 400 nm, entretanto, um extravasamento para a região tumoral mais eficaz tem sido demonstrado quando as vesículas apresentam diâmetro inferior a 200 nm. Dessa forma, nota-se que a formulação SpHL-DXR incubada por 2 horas apresentou características adequadas para sua aplicação endovenosa. A formulação incubada por 24 horas apresentou um valor de diâmetro médio maior do que o desejado. Entretanto, não houve diferença estatística entre os valores de diâmetro médio de SpHL-DXR obtidos após 2 e 24 horas de incubação da DXR.

O IP obtido para todas as formulações lipossomais indica homogeneidade ($IP < 0,3$) nas populações de vesículas, demonstrando uma distribuição monodispersa (SOARES *et al.*, 2011; DE ASSIS *et al.*, 2007).

Tabela 3 - Determinação do diâmetro médio, IP e potencial zeta das formulações SpHL Brancos e SpHL-DXR*

Amostra	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Teor de Encapsulação (%)
SpHL Brancos	130 ± 20	0,10 ± 0,08	- 4 ± 1	-
SpHL-DXR 2h**	161 ± 27	0,14 ± 0,07	- 3 ± 1	100,00 ± 0,02
SpHL-DXR 24h**	279 ± 74***	0,24 ± 0,04	- 8 ± 3****	100,00 ± 0,07

*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). **SpHL-DXR 2h e SpHL-DXR 24 h significa lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada contendo DXR após incubação dos SpHL brancos com solução de DXR durante o tempo de 2 e 24 horas, respectivamente. *** Representa diferença estatística em relação ao SpHL Brancos. **** Representa diferença estatística em relação ao SpHL-DXR 2h.

O potencial zeta pode ser definido como o potencial existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados, no plano de cisalhamento. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas de mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). Para as formulações de SpHL Brancos, SpHL-DXR 2 h e SpHL-DXR 24 h, pode-se notar valores próximos à neutralidade, o que é esperado em preparações contendo PEG na superfície. A presença do PEG move o plano de cisalhamento para longe da superfície dos lipossomas e, conseqüentemente, ocorre

a redução do potencial zeta. Além disso, a presença das cadeias de PEG na superfície dos lipossomas provoca uma dificuldade de deslocamento das vesículas, reduzindo a mobilidade, e, portanto, o potencial zeta (AZONANOTECHNOLOGY ARTICLE, 2013; HEURTAULT *et al.*, 2003).

As formulações SpHL-DXR 2 h e SpHL-DXR 24 h apresentaram valores iguais de teor de encapsulação (100 %), indicando que o método remoto de sulfato de amônio é apropriado para a encapsulação da DXR em lipossomas. A primeira etapa desse método consiste na preparação de lipossomas contendo sulfato de amônio em seu interior. Posteriormente, o sulfato de amônio no meio externo é substituído por um tampão em que a DXR seja solúvel. O próximo passo é a adição de DXR na formulação lipossomal. O pH do meio externo deve ser próximo ao pKa da DXR, para garantir que parte das moléculas estejam em sua forma não ionizada, e portanto, consigam atravessar a membrana lipossomal. Uma vez no interior do lipossoma, a DXR reage com o sulfato de amônio formando sulfato de DXR, que é um sal pouco solúvel em água e, portanto, precipita. Com isso há formação de um gradiente entre o interior dos lipossomas e o meio externo (GABIZON; SHMEEDA; GREINER, 2012). O alto teor de encapsulação é de grande importância para o processo de preparo das formulações, pois elimina a necessidade do processo de purificação final da formulação após incubação dos lipossomas com DXR. O teor de encapsulação de 100 % e o tempo de incubação por apenas duas horas são fatores que reforçam a ideia da proposição do kit composto pela formulação branca e pela DXR liofilizada. Esse kit garantiria uma baixa taxa de liberação da DXR dos lipossomas antes do uso, diminuiria o risco de degradação química do fármaco em solução e seria prática para o uso, uma vez que deveria apenas ser incubada a temperatura baixa 2h antes de aplicação no paciente, fornecendo a praticidade de um tempo curto de preparo e garantindo a qualidade do produto final, o que afeta a sua eficácia terapêutica.

4.2 Caracterização físico-química da formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]

O diâmetro médio encontrado para os lipossomas semelhantes ao Doxil[®] brancos (isentos de DXR) foi de 134 ± 6 nm, indicando a adequação para a aplicação endovenosa (Tabela 4). O IP retratou a homogeneidade da população de vesículas, uma vez que o valor obtido foi menor que 0,3. O potencial zeta encontrado foi próximo à neutralidade, conforme esperado para formulações contendo PEG.

O lípide estrutural da formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] é o HSPC, que possui duas cadeias hidrocarbônicas completamente saturadas. Dessa forma, durante a formação dos lipossomas, moléculas adjacentes interagem fortemente por interações de Van der Waals, o que aumenta o empacotamento das moléculas na bicamada lipídica, aumentando assim sua rigidez. Devido a isso, a transição de fase $L\alpha$ (rígida) \rightarrow $L\beta$ (fluida) ocorre em uma temperatura elevada ($T_m = 53^\circ\text{C}$, correspondente ao lípide isolado) (COHEN *et al.*, 2013). A rigidez da membrana pode influenciar negativamente na encapsulação da DXR, pois pode dificultar a difusão do fármaco para o meio interno.

Dessa forma, foi realizado um estudo comparando diferentes condições de encapsulação da DXR: incubação *overnight* a 4°C ou por 1 hora a 60°C . Como pode ser observado na Tabela 2, não houve alteração significativa dos valores de diâmetro médio, IP e potencial zeta para as formulações submetidas a ambas as condições de incubação. Entretanto, em relação ao teor de encapsulação foi observada diferença estatística entre as formulações obtidas após incubação da DXR por 1 hora a 60°C e *overnight* a 4°C . Conforme sugerido anteriormente, o emprego da temperatura de 60°C poderia contribuir para uma maior fluidez da bicamada lipídica, por estar possivelmente acima da temperatura de transição de fase dos lípidos formadores da bicamada lipídica, facilitando a entrada da DXR.

Tabela 4: Determinação do diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação das formulações semelhantes ao Doxil[®]*

Amostra	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	Teor de Encapsulação (%)
Lip Brancos	134 ± 6	0,04 ± 0,04	- 3 ± 1	-
Lip-DXR ON, 4°C**	141 ± 1	0,10 ± 0,09	5 ± 5	80,00 ± 0,10
Lip-DXR 1 h, 60 °C**	136 ± 3	0,05 ± 0,05	- 2 ± 1	97,00 ± 0,03***

*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=3). **Lip-DXR ON, 4°C e Lip-DXR 1 h, 60°C significam lipossomas semelhantes ao Doxil[®] obtidos após incubação dos lipossomas brancos com solução de DXR *overnight* a 4°C e 1 hora a 60°C, respectivamente. ***Representa diferença estatística entre as formulações Lip-DXR ON, 4°C e Lip-DXR 1 h, 60°C.

4.3 Estudo de Estabilidade de SpHL Brancos

O comportamento dos lipossomas em relação à estabilidade de armazenamento, assim como em meios biológicos, é determinado por fatores tais como diâmetro, carga de superfície das vesículas e a quantidade de soluto incorporado. Assim, a determinação e controle de tais parâmetros são fundamentais para assegurar a eficácia terapêutica e a estabilidade das formulações lipossomais (NEW, 1990; LASIC, 1998). Em algumas situações, as formulações lipossomais podem apresentar características de instabilidade decorrentes de alterações na sua estrutura física, como, agregação, fusão, perda do material encapsulado, dentre outras (CASALS, 2003; SANTOS-MAGALHÃES *et al.*, 2000). Portanto, o desenvolvimento de um estudo de estabilidade é de extrema importância para avaliar a manutenção das características físico-químicas adequadas ao longo do tempo de armazenamento, assegurando a qualidade da formulação.

Tendo em vista a baixa estabilidade da DXR em solução aquosa mesmo a baixas temperaturas (NEGREIRA *et al.*, 2013), o desenvolvimento de uma formulação que mantenha esse fármaco protegido do contato com água é de grande interesse. O protocolo adotado para o preparo dos SpHL-DXR garantiu um teor de encapsulação próximo a 100% com um tempo curto de incubação (2 h, sob refrigeração a 4°C).

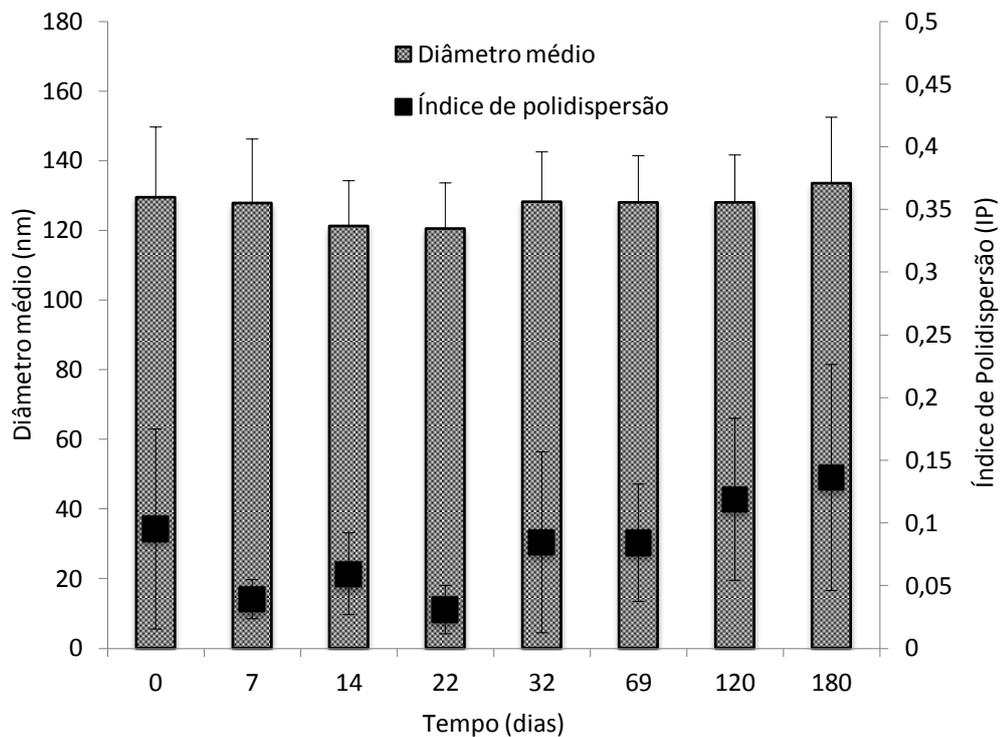
Assim sendo, como proposta para o produto final, imaginou-se um kit contendo dois frascos, sendo (1) os SpHL Brancos dispersos em HBS pH 7,4 e (2) um pellet liofilizado de cloridrato de DXR. Os lipossomas brancos poderiam, portanto, ser incubados com o fármaco apenas 2 horas antes da administração no paciente, sem necessidade de purificação adicional. Com o objetivo de avaliar a viabilidade dessa proposta, foi realizado o estudo de estabilidade de armazenamento dos SpHL Brancos, no qual se avaliou a manutenção do diâmetro médio das vesículas, IP, potencial zeta e capacidade de encapsulação da DXR por seis meses.

Em cada tempo de investigação, inicialmente foram verificadas as características físico-químicas dos lipossomas brancos. Pode-se observar que ao longo de 180 dias não houve alteração do diâmetro médio e nem dos valores de IP dos SpHL Brancos (Figura 6). Os valores dos diâmetros médios e IP foram iguais a 129 ± 20 nm e $0,09 \pm 0,08$ e 134 ± 19 nm e $0,14 \pm 0,09$ no tempo inicial e após 180 dias de armazenamento. Como foi obtido um diâmetro médio próximo de 100 nm e um desvio padrão pequeno, pode-se constatar que o método de preparo bem como as condições de armazenamento da formulação de SpHL Brancos foram adequadas, não ocorrendo, portanto, fenômenos físico-químicos que acarretassem no aumento do diâmetro. O valor do IP, por ser abaixo de 0,3, indica a homogeneidade da população das vesículas. Esses resultados indicam a estabilidade dessa formulação, o que é importante para a reprodutibilidade da encapsulação da DXR.

Em relação ao potencial zeta, o valor médio obtido foi de -7 ± 3 mV. Esse dado representa um potencial zeta próximo a neutralidade, conforme esperado para esse tipo de formulação. De forma semelhante ao ocorrido para a análise de diâmetro médio, os valores de potencial zeta foram mantidos com o tempo (com a exceção do tempo de 14 dias), demonstrando que não ocorreram fenômenos físico-químicos que acarretassem na alteração da carga superficial das vesículas, confirmando a estabilidade dessas formulações (Figura 7). A manutenção da carga superficial dos lipossomas é um importante indicativo de que não há perda de lípides da bicamada durante o armazenamento, assim como indica ausência de agregação das partículas. Foi identificada apenas uma diferença estatística pontual entre os tempos 0 e 14 dias. A estabilidade da formulação lipossomal durante esse longo período (seis meses) pode estar relacionada principalmente à presença de cadeias de PEG

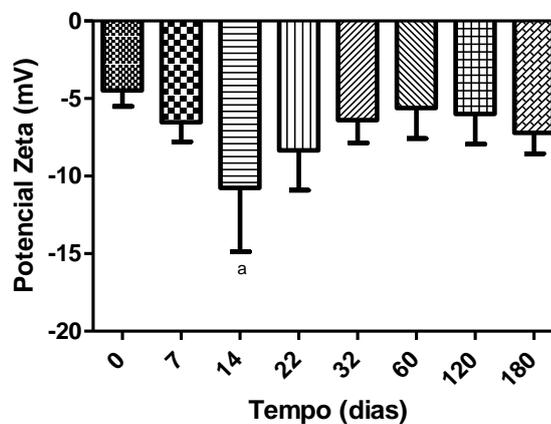
que gera uma barreira estérica que impede a aproximação e agregação de vesículas (IMMORDINO *et al.*, 2008).

Figura 6 - Determinação do diâmetro médio e IP de SpHL Brancos em diferentes tempos de armazenamento*



*Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

Figura 7 - Determinação do potencial zeta de SpHL Brancos em diferentes tempos de armazenamento*

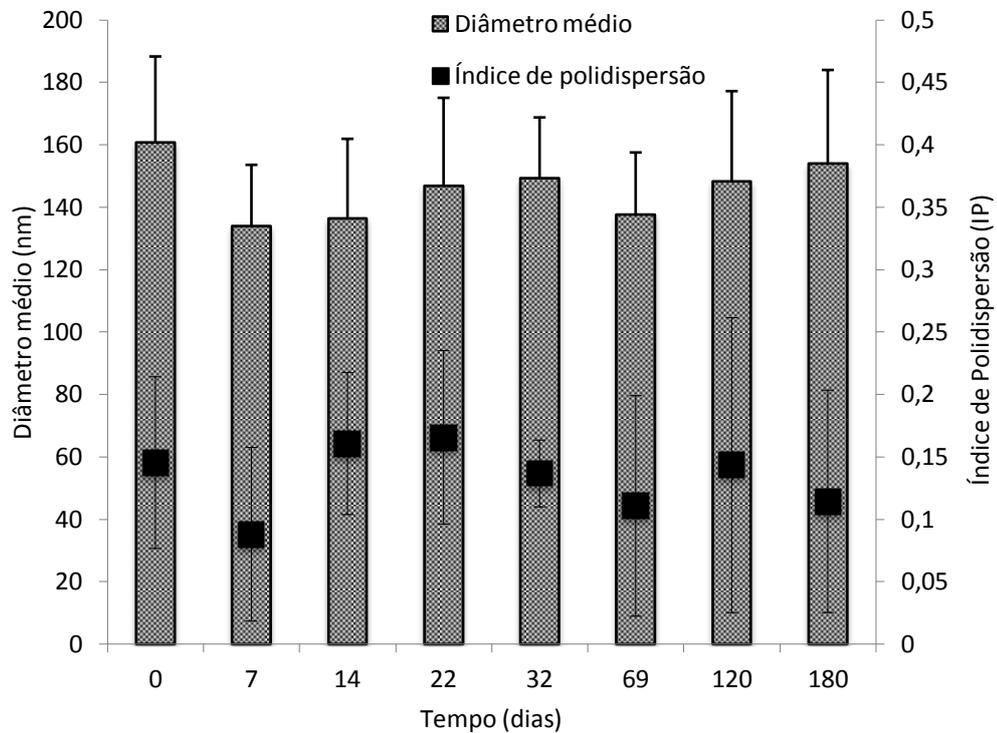


*Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3). ^aRepresenta diferença estatística em relação ao tempo 0.

Os valores de diâmetro médio para as formulações de SpHL-DXR permaneceram semelhantes ao longo do intervalo de tempo investigado, conforme indicado na Figura 8. Os valores do diâmetro médio e do IP no tempo inicial e após 180 dias foram iguais a 161 ± 27 nm e $0,15 \pm 0,07$ e 154 ± 30 nm e $0,11 \pm 0,09$, respectivamente. Ao comparar esses resultados com aqueles obtidos para SpHL Brancos, pode-se notar que praticamente não houve alteração no diâmetro das vesículas, indicando que o processo de encapsulação da DXR bem como a etapa de purificação da formulação não influenciaram neste parâmetro. O valor do IP, por ser abaixo de 0,3, indica a homogeneidade da população das vesículas.

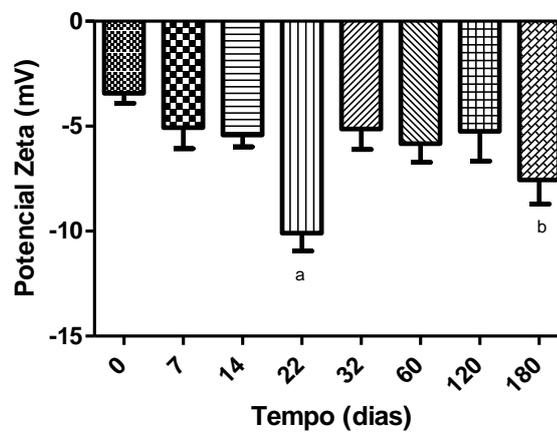
O valor médio obtido para o potencial zeta foi de -6 ± 2 mV, próximo a neutralidade, conforme esperado. De forma geral, os valores de potencial zeta foram mantidos com o tempo (com a exceção do tempo de 22 dias que foi diferente dos demais e do tempo de 180 que foi diferente do tempo 0), demonstrando que não ocorreram fenômenos físico-químicos que acarretassem na alteração da carga superficial das vesículas, confirmando a estabilidade dessas formulações (Figura 9). As diferenças estatísticas identificadas não representam desvios relevantes para as formulações estudadas, uma vez que os valores obtidos estão dentro do esperado para esse tipo de formulação lipossomal.

Figura 8 - Determinação do diâmetro médio e IP dos SpHL-DXR em diferentes intervalos de tempo de armazenamento*



*Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

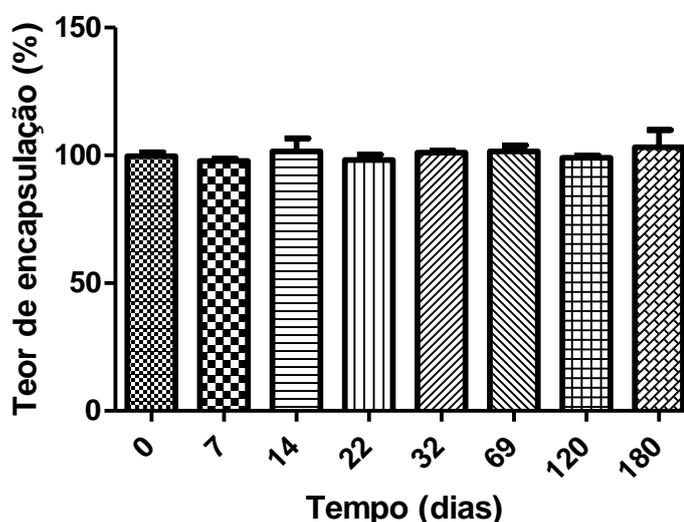
Figura 9 - Determinação do potencial zeta dos SpHL-DXR em diferentes intervalos de tempo de armazenamento*



*Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3). ^a Representa diferença estatística em relação aos demais tempos. ^b Representa diferença estatística em relação ao tempo 0.

Os valores de teor de encapsulação da DXR nos SpHL foram em torno de 100% para todos os intervalos de tempo investigado (Figura 10). Uma vez que a capacidade de encapsular a DXR foi mantida ao longo de todo o período estudado, conclui-se que o gradiente de sulfato é mantido, não havendo troca significativa de íons sulfato entre o meio interno e externo dos lipossomas, o que reforça a possibilidade do desenvolvimento do kit sugerido anteriormente. Tal kit poderia fornecer grandes benefícios, tais como: praticidade na incubação da DXR com os SpHL brancos por 2 horas antes da administração no paciente; dispensaria a etapa de purificação dos SpHL-DXR devido ao teor de encapsulação em torno de 100 % e contornaria a baixa estabilidade da DXR em solução aquosa (NEGREIRA *et al.*, 2013). Os parâmetros obtidos nesse estudo, como diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação viabilizam a utilização de SpHL Brancos para aplicação em testes *in vivo*.

Figura 10 - Determinação do teor de encapsulação dos SpHL-DXR em diferentes intervalos de tempo de armazenamento*



*Resultados expressos em média \pm desvio padrão (n=3).

4.4 Avaliação da pH-sensibilidade

4.4.1 Análise do diâmetro médio

Distribuições dos diâmetros dos lipossomas foram obtidos utilizando-se como parâmetros de análise a intensidade, volume e número por meio da técnica de espectroscopia de correlação de fótons, de acordo com a alteração do pH. A análise por meio do parâmetro de intensidade leva em conta o espalhamento da luz da população de vesículas como um todo, de forma que partículas grandes são capazes de espalhar muito mais a luz do que as partículas menores e a intensidade de espalhamento de luz de uma vesícula é proporcional à sexta potência do seu diâmetro. Em situações nas quais seja necessário um maior detalhamento da amostra, é interessante realizar a análise também nos parâmetros de volume e número. Em uma amostra contendo apenas dois tamanhos de partícula - por exemplo, 5 e 50 nm - em quantidades iguais, o resultado em termos do número seria dois picos de tamanhos idênticos, pois ambas populações apresentam as mesmas quantidades de partícula. Em relação ao volume, seriam dois picos sendo um mil vezes maior do que o outro, pois o volume ocupado por partículas de 50 nm é mil vezes maior do que o volume ocupado pelo mesmo número de partículas de 5 nm (considerando partículas esféricas) (MALVERN INSTRUMENTS, 2013).

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de distribuição do diâmetro correspondentes aos SpHL Brancos. Para a Formulação 1, avaliando-se o parâmetro intensidade, pode-se observar uma diminuição do percentual de vesículas compreendidas nas faixas menor que 100 nm e entre 100 e 200 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparado com o percentual correspondente ao pH 7,4. Em seguida, percebe-se um aumento do percentual de vesículas compreendidas nas faixas entre 200 e 500 nm, 500 e 1000 nm e maior que 1000 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0, quando comparados com o percentual correspondente ao pH 7,4. Em relação ao volume, a Formulação 1 apresentou diminuição do percentual de vesículas compreendidas nas faixas menor que 100 nm e entre 100 e 200 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparado com o percentual correspondente ao pH 7,4. Na faixa entre 200 e 500 nm, houve diminuição do percentual de vesículas no

pH 5,5 e aumento no pH 3,0 ao comparar com a distribuição obtida para o pH 7,4. Nas faixas de 500 a 1000 nm e maior que 1000 nm, houve aumento do percentual de vesículas no pH 5,5 e pH 3,0. Ao analisarmos por número, a Formulação 1 apresentou redução do percentual de vesículas compreendidas na faixa menor que 100 nm para os valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparados com o pH 7,4. Enquanto que nas faixas entre 100 e 200 nm e entre 200 e 500 nm, houve aumento do percentual de vesículas.

De forma similar, avaliando-se por intensidade as Formulações 2 e 3, houve diminuição do percentual de vesículas compreendidas nas faixas menor que 100 nm e entre 100 e 200 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparado com o percentual correspondente ao pH 7,4. Para as faixas entre 200 e 500 nm e 500 e 1000 nm, percebe-se um aumento do percentual de vesículas nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparado com o percentual correspondente ao pH 7,4. Para a Formulação 2, ocorreu uma diminuição inesperada do percentual de vesículas na faixa maior que 1000 nm, isso pode ser explicado pelo dinamismo da dispersão lipossomal, que nas condições de menores valores de pH encontra-se heterogênea, culminando em uma possível amostragem não representativa da população. Para a Formulação 3, ocorreu aumento do percentual de vesículas na faixa maior que 1000 nm. Em termos do volume, a Formulação 2 apresentou aumento do percentual de vesículas no pH 5,5 e redução no pH 3,0 na faixa de diâmetro menor que 100 nm. Para as faixas de 100 a 200 nm, 200 a 500 nm e 500 a 1000 nm, houve aumento no percentual das vesículas nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparado com o pH 7,4. A Formulação 3 apresentou diminuição da porcentagem de vesículas apenas no pH 5,5 quando comparado com o pH 7,4 na faixa de diâmetro menor que 100 nm. Houve diminuição do percentual de vesículas na faixa entre 100 e 200 nm e aumento nas faixas de 200 a 500 nm e de 500 a 1000 nm. Na faixa de diâmetro maior que 1000 nm, houve aumento do percentual de vesículas no pH 5,5. Ao analisarmos por número, a Formulação 2 apresentou diminuição do percentual de vesículas no pH 3,0 na faixa de diâmetro menor que 100 nm. Houve aumento no percentual de vesículas na faixa de 100 a 200 nm no pH 3,0. Para a faixa de 500 a 1000 nm, houve aumento do percentual para os valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparados com o pH 7,4. Para a Formulação 3, houve redução do percentual de vesículas na faixa de diâmetro menor que 100 nm para o pH 5,5. Nas faixas de 200

a 500 nm e 500 a 1000 nm, houve aumento do percentual de vesículas nos valores de pH 5,5 e 3,0 em relação ao pH 7,4.

Todas essas mudanças na distribuição do diâmetro indicam que a formulação SpHL Brancos é responsiva às alterações de pH. Na medida em que o pH diminui, a porcentagem de vesículas de diâmetros menores reduz ao mesmo tempo que a porcentagem de vesículas de diâmetros maiores aumenta. Não foram observados agregados nos SpHL Brancos mesmo quando submetidos ao pH 3,0. A presença do PEG na superfície das vesículas pode, de certa forma, ter reduzido a pH-sensibilidade da formulação (SIMÕES *et al.*, 2004; PROVODA; STIER; LEE, 2003).

Tabela 5 - Distribuição percentual do diâmetro médio dos SpHL Brancos em diferentes valores de pH por intensidade, volume e número

Distribuição do diâmetro	Formulação 1 – SpHL Brancos			Formulação 2 – SpHL Brancos			Formulação 3 – SpHL Brancos		
	INTENSIDADE			INTENSIDADE			INTENSIDADE		
	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	3,2	1,6	1,3	4,8	4,9	1,7	2,4	1,6	1,8
100 - 200 nm	51,2	44,6	38,1	51,5	31,3	37,3	46,9	38,0	35,6
200 - 500 nm	45,2	51,1	56,5	38,8	59,1	56,8	47,9	54,2	55,2
500 - 1000 nm	0,3	1,6	2,4	0,9	4,5	2,9	1,3	4,5	5,4
> 1000 nm	0	1,1	1,6	3,9	0	1,4	1,5	1,9	2,0
	VOLUME			VOLUME			VOLUME		
	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	12,9	5,0	4,3	9,0	21,8	6,7	6,4	4,6	7,2
100 - 200 nm	56,0	36,6	33,3	27,7	33,0	30,5	33,3	26,3	25,5
200 - 500 nm	30,4	27,0	39,2	12,2	39,3	36,6	21,4	24,8	28,2
500 - 1000 nm	0,7	1,8	3,6	0,6	5,7	3,8	1,3	3,9	5,5
> 1000 nm	0	28,6	19,7	50,2	0	22,4	37,6	40,5	33,6
	NÚMERO			NÚMERO			NÚMERO		
	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	40,1	27,9	19,7	48,5	73,4	26,8	35,0	33,1	35,3
100 - 200 nm	59,8	66,0	64,6	49,0	23,8	61,1	60,4	60,4	57,7
200 - 500 nm	0	6,1	15,3	2,6	2,7	11,9	4,7	6,2	6,9
500 - 1000 nm	0	0	0,2	0	0	0,1	0	0,1	0,1
> 1000 nm	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Na Tabela 6 estão representados os valores de distribuição do diâmetro para as formulações compostas por DOPE:CHEMS.

Ao analisar por intensidade, a Formulação 1 apresentou uma redução no percentual de vesículas na faixa compreendida entre 100 e 200 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0

quando comparados com o percentual correspondente ao pH 7,4. Nas faixas de 200 a 500 nm e 500 a 1000 nm, houve aumento do percentual de vesículas nos valores de pH 5,5 e 3,0 em relação ao pH 7,4. Para a faixa maior que 1000 nm, não houve aumento do percentual de vesículas com a diminuição do pH. Essa situação não retrata a realidade, uma vez que nesse caso, foi possível observar a formação de agregados no tubo de análise. Esses agregados podem depositar no fundo da cubeta de análise, o que compromete a leitura da amostra. Quanto ao volume, percebe-se um aumento no percentual das vesículas nas faixas de 100 a 200 nm, 200 a 500 nm e de 500 a 1000 nm. Em relação ao número, houve diminuição no percentual de vesículas nas faixas de 100 a 200 nm para os valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparados com o pH 7,4. Para as faixas de 200 a 500 nm e de 500 a 1000 nm, observou-se aumento no percentual de vesículas. Para as Formulações 2 e 3, ao analisarmos por intensidade, pode-se notar uma diminuição no percentual de vesículas na faixa de 100 a 200 nm e um aumento na faixa de 200 a 500 nm. Na faixa de 500 a 1000 nm, houve aumento no percentual de vesículas apenas para a Formulação 3 no pH 5,5. Na faixa de diâmetro maior que 1000 nm, houve aumento no percentual de vesículas no pH 3,0 para a Formulação 2 e nos valores de pH 5,5 e 3,0 para a Formulação 3. Ao analisarmos por volume, a Formulação 2 apresentou redução no percentual de vesículas nas faixas de diâmetro menor que 100 nm e entre 100 e 200 nm. Já nas demais faixas (200 a 500 nm, 500 a 1000 nm e maior que 1000 nm) ocorreu aumento no percentual de vesículas com a redução do pH. A Formulação 3 apresentou redução no percentual de vesículas nas faixas de 100 a 200 nm, 200 e 500 nm e entre 500 e 1000 nm. Houve aumento no percentual das vesículas na faixa de diâmetro maior que 1000 nm. Em relação ao número, a Formulação 2 apresentou redução no percentual de vesículas na faixa menor que 100 nm para os valores de pH 5,5 e 3,0 e para a faixa de 100 a 200 nm para o pH 5,5. Houve aumento no percentual de vesículas nos valores de pH 5,5 e 3,0 nas demais faixas de diâmetro. Para a Formulação 3, pode-se notar redução no percentual de vesículas na faixa de 100 a 200 nm e aumento nas demais faixas nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparados com os valores de percentual correspondentes ao pH 7,4.

Como dito anteriormente, para essa formulação composta por DOPE:CHEMS foi possível observar a formação de agregados, indicando que houve completa

desestabilização da bicamada lipídica, com perda da integridade das vesículas lipossomais.

Tabela 6 - Distribuição percentual do diâmetro médio das formulações compostas por DOPE:CHEMS em diferentes valores de pH por intensidade, volume e número

	Formulação 1 – DOPE:CHEMS			Formulação 2 – DOPE:CHEMS			Formulação 3 – DOPE:CHEMS		
	INTENSIDADE			INTENSIDADE			INTENSIDADE		
Distribuição do diâmetro	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	0	0	0,7	3,9	0	0,7	0,1	0	0,3
100 - 200 nm	12,2	10,8	6,4	9,8	2,5	6,2	16,0	3,2	6,0
200 - 500 nm	55,7	64,8	55,6	24,4	60,6	43,5	24,3	26,1	30,2
500 - 1000 nm	22,0	23,9	32,7	50,8	33,9	36,6	40,0	46,6	38,6
> 1000 nm	10,2	0,4	4,6	11,1	2,8	13,2	19,6	24,4	24,9
	VOLUME			VOLUME			VOLUME		
Distribuição do diâmetro	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	0	0	2,7	11,3	0	2,1	0,5	0	0,7
100 - 200 nm	3,6	9,9	5,2	10,0	1,3	3,9	8,4	0,8	3,3
200 - 500 nm	14,5	53,8	34,2	14,2	28,8	18,5	9,9	4,8	9,5
500 - 1000 nm	10,2	35,0	34,5	46,3	27,5	27,9	29,4	13,6	23,1
> 1000 nm	71,7	1,5	23,3	18,2	42,2	47,8	51,6	80,7	63,3
	NÚMERO			NÚMERO			NÚMERO		
Distribuição do diâmetro	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	0	0	11,4	75,0	0	23,1	11,6	7,1	12,7
100 - 200 nm	60,9	49,9	30,3	23,4	16,5	29,1	77,4	67,3	39,0
200 - 500 nm	36,1	46,1	50,7	0,9	73,1	38,0	8,6	16,7	37,1
500 - 1000 nm	2,9	3,8	7,3	0,5	10,5	8,8	2,0	8,1	9,2
> 1000 nm	0	0	0,1	0	0,1	0,7	0,1	0,6	1,9

Na Tabela 7 estão representados os valores de distribuição do diâmetro para a formulação SpHL-DXR.

Em termos da intensidade, a Formulação 1 apresentou redução no percentual de vesículas nas faixas de diâmetro menor que 100 nm e entre 100 e 200 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparados com os percentuais correspondentes ao pH 7,4. Houve aumento no percentual de vesículas na faixa de 200 a 500 nm, enquanto que nas demais faixas não foram observados aumentos nos percentuais de vesículas. Ao analisarmos por volume, pode-se notar redução no percentual de vesículas nas faixas de diâmetro menor que 100 nm e entre 100 e 200 nm. Houve aumento no percentual de vesículas nas faixas de 200 a 500 nm e maior que 100

nm. Em relação ao número, percebe-se uma diminuição no percentual de vesículas na faixa de diâmetro menor que 100 nm para o pH 3,0 e um aumento no percentual de vesículas nas demais faixas para os valores de pH 5,5 e 3,0, ao comparar com o pH 7,4. Para a Formulação 2, em termos de intensidade, na faixa de diâmetro menor que 100 nm, houve diminuição do percentual de vesículas tanto no pH 5,5 quanto no pH 3,0. Houve aumento no percentual de vesículas nas faixas de 100 a 200 nm, 500 a 1000 nm e maior que 1000 nm. Em relação ao volume, observou-se redução no percentual de vesículas na faixa de diâmetro menor que 100 nm. Houve aumento no percentual de vesículas na faixa de 100 a 200 nm, 500 a 1000 nm e maior que 1000 nm, de forma semelhante ao ocorrido pela análise por intensidade. A análise por número indicou redução no percentual de vesículas para a faixa menor que 100 nm e aumento nas demais faixas para os valores de pH 5,5 e 3,0 quando comparados com o pH 7,4. Para a Formulação 3, pode-se notar por intensidade, um aumento no percentual de vesículas na faixa de diâmetro entre 100 e 200 nm no pH 5,5, assim como nas faixas entre 200 e 500 nm no pH 3,0 e 500 a 1000 nm nos valores de pH 5,5 e 3,0. Não houve aumento do percentual de vesículas na faixa maior que 1000 nm. Quanto ao volume, houve redução no percentual de vesículas na faixa de diâmetro menor que 100 nm apenas no pH 3,0. Enquanto que na faixa de 100 a 200 nm observou-se aumento no percentual de vesículas apenas no pH 5,5. Nas faixas de diâmetro compreendidas entre 200 e 500 nm e 500 a 1000 nm, houve aumento no percentual de vesículas nos valores de pH 5,5 e 3,0. Para a análise por número, houve diminuição do percentual de vesículas na faixa de diâmetro menor que 100 nm apenas no pH 3,0. Houve aumento no percentual de vesículas nas demais faixas apenas quando comparados os valores no pH 3,0 com os valores correspondentes ao pH 7,4.

De forma geral, pode-se concluir que a formulação de SpHL-DXR também é responsiva às alterações de pH, comprovando que a presença da DXR não interfere na pH-sensibilidade da formulação.

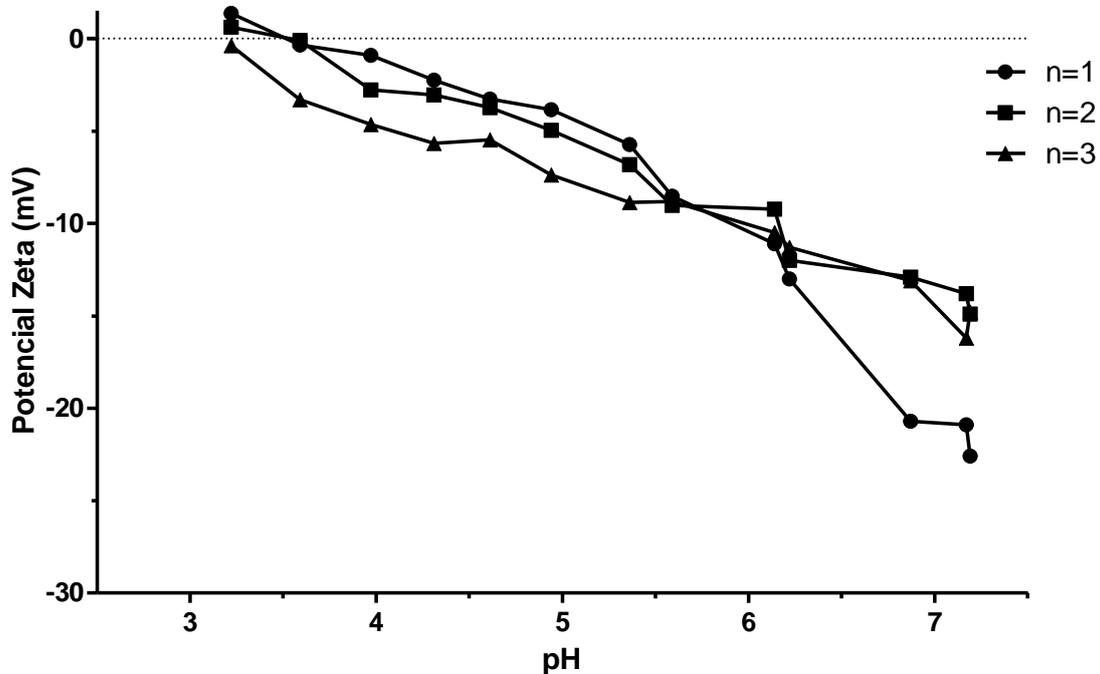
Tabela 7 - Distribuição percentual do diâmetro médio das formulações de SpHL-DXR em diferentes valores de pH por intensidade, volume e número

	Formulação 1 – SpHL-DXR			Formulação 2 – SpHL-DXR			Formulação 3 – SpHL-DXR		
	INTENSIDADE			INTENSIDADE			INTENSIDADE		
Distribuição do diâmetro	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	5,5	2,6	1,4	11,2	5,2	8,9	0,4	0,9	0
100 - 200 nm	23,7	17,1	17,2	42,9	62,8	49,7	25,9	30,8	24,9
200 - 500 nm	42,7	66,1	66,4	45,2	26,8	37,5	47,1	43,3	47,6
500 - 1000 nm	25,1	14,3	12,7	0,7	0	1,5	13,7	14,3	17,4
> 1000 nm	3,3	0	2,4	0	5,2	2,5	12,8	10,9	10,2
	VOLUME			VOLUME			VOLUME		
Distribuição do diâmetro	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	21,1	0,1	7,9	57,3	7,5	28,9	1,1	2,8	0,3
100 - 200 nm	21,9	11,9	12,2	25,7	26,3	33,3	15,7	23,7	14,6
200 - 500 nm	24,9	31,6	37,5	16,2	6,3	15,0	20,4	22,6	21,1
500 - 1000 nm	26,2	10,7	13,5	0,6	0	1,3	11,4	14,4	14,6
> 1000 nm	6,1	46,0	28,8	0	59,9	21,6	51,6	36,3	49,1
	NÚMERO			NÚMERO			NÚMERO		
Distribuição do diâmetro	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0	% pH 7,4	% pH 5,5	% pH 3,0
< 100 nm	80,5	74,1	31,3	96,8	44,3	73,9	15,6	22,3	4,5
100 - 200 nm	18,1	20,6	40,2	3,1	53,8	25,0	72,9	70,1	79,7
200 - 500 nm	1,4	5,0	27,7	0,2	1,9	1,0	10,9	7,2	14,7
500 - 1000 nm	0,1	0,3	1,1	0	0	0	0,5	0,4	0,7
> 1000 nm	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4.4.2 Avaliação do potencial zeta

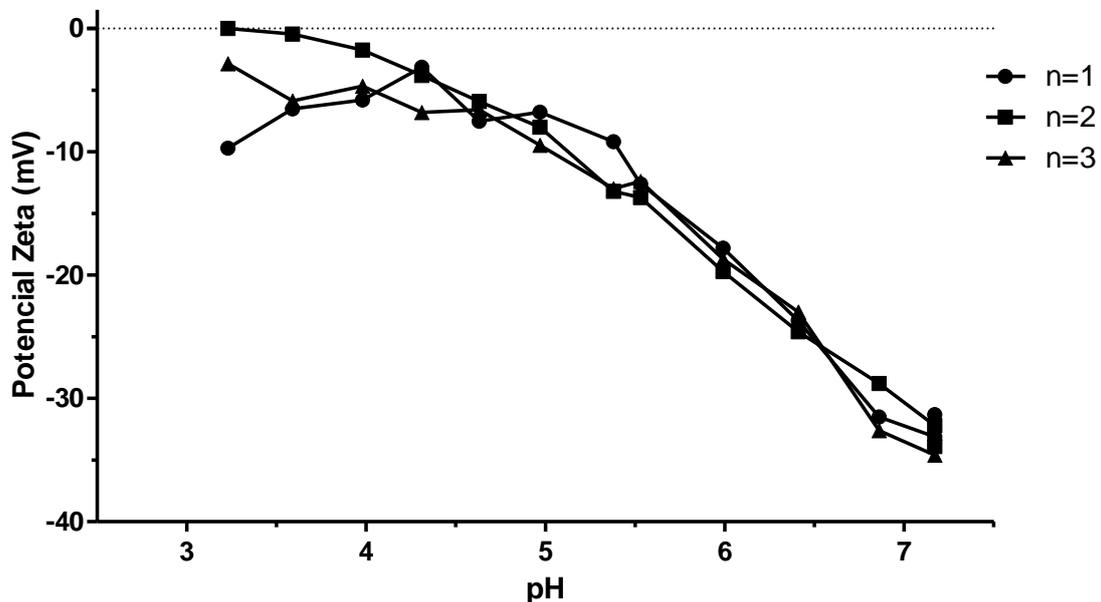
Na Figura 13 está representado o gráfico da variação do potencial zeta com o pH para formulações de SpHL Brancos. O valor de potencial zeta inicial, medido no pH 7,4, das formulações de SpHL Brancos foi de - 22,6; - 14,9 e - 14,8 mV para as amostras n=1, n=2 e n=3, respectivamente. Na medida em que foi realizada a titulação, com a acidificação progressiva do meio, os valores de potencial zeta das amostras foram aumentando. A carga negativa presente nessa formulação é atribuída à porção carboxilato presente nas moléculas de CHEMS. Com a diminuição do pH, ocorre a protonação das moléculas de CHEMS, de forma que os valores de potencial zeta vão se tornando cada vez mais próximos de zero, o que pode ser observado na Figura 11. Dessa forma, pode-se concluir que a formulação de SpHL Brancos é responsiva às variações de pH não somente quanto ao diâmetro médio das vesículas, mas também quanto ao potencial zeta.

Figura 11 - Determinação da variação do potencial zeta de formulações de SpHL Brancos em função do pH



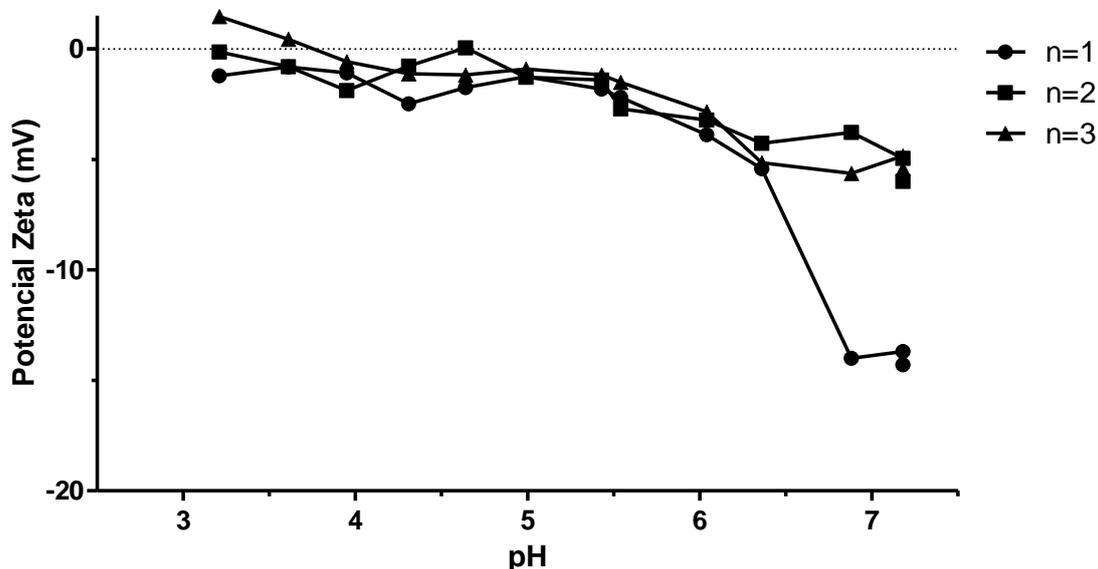
Formulações contendo apenas DOPE:CHEMS foram analisadas com a finalidade de observar se há influência do PEG na pH-sensibilidade das formulações (Figura 12). O valor de potencial zeta inicial, medido no pH 7,4, das formulações contendo apenas DOPE:CHEMS foi de - 31,3; - 33,9 e - 32,8 mV para as amostras n=1, n=2 e n=3 respectivamente. Primeiramente, pode-se notar valores menores de potencial zeta para esta formulação quando comparados com os valores obtidos para SpHL Brancos. Esses menores valores de potencial zeta ocorrem devido à ausência de PEG nessa formulação. O PEG forma uma camada que confere uma blindagem estérica, atenuando a detecção da carga negativa conferida pelas moléculas de CHEMS. De forma semelhante ao ocorrido para as formulações de SpHL Brancos, na medida em que o pH do meio diminuiu, os valores de potencial zeta das amostras foram aumentando, devido a protonação gradual das moléculas de CHEMS até a sua completa neutralização, culminando no valor de potencial zeta igual a zero.

Figura 12 - Determinação da variação do potencial zeta de formulações contendo DOPE:CHEMS em função do pH



O resultado da variação do potencial zeta de acordo com o pH para as formulações de SpHL-DXR está representado na Figura 13. Os valores de potencial zeta obtidos para as formulações de SpHL-DXR no pH inicial de 7,4 foram - 14,3; - 6,0 e - 5,43 mV, para n=1, n=2 e n=3, respectivamente. Para as três amostras, observou-se aumento nos valores de potencial zeta quando comparados com os respectivos valores obtidos para a formulação de SpHL Brancos, o que sugere uma possível influência da presença das moléculas de DXR nesse parâmetro. Uma explicação para esse fato é que pode ter ocorrido uma interação eletrostática entre o grupo amino presente nas moléculas de DXR com o grupo carboxilato das moléculas de CHEMS nessas formulações, resultando na diminuição da carga negativa atribuída ao CHEMS. Além disso, a presença do PEG contribui para um valor de potencial zeta próximo a neutralidade. De forma semelhante ao que foi observado para os SpHL Brancos e para as formulações compostas apenas por DOPE:CHEMS, ao decorrer da análise, com a diminuição do pH, vai ocorrendo o aumento gradual do potencial zeta até atingir a carga superficial nula. Dessa forma, pode-se concluir que a presença do PEG assim como da DXR nas formulações de SpHL-DXR não interferem na pH-sensibilidade dessas formulações, uma vez que pode-se perceber uma responsividade do diâmetro médio assim como do potencial zeta com as variações de pH.

Figura 13 - Determinação da variação do potencial zeta de formulações de SpHL-DXR em função do pH.



4.5 Avaliação da viabilidade celular

A citotoxicidade da DXR livre e de SpHL-DXR frente à linhagem tumoral de mama murino 4T1 foi determinada pelo ensaio MTT e os valores de IC_{50} obtidos estão descritos na Tabela 8. A formulação de SpHL Brancos foi testada utilizando-se diluições semelhantes às feitas para o teste com SpHL-DXR e não apresentou citotoxicidade na faixa de concentração estudada.

Tabela 8 - Determinação dos valores de IC_{50} para a linhagem celular 4T1 tratada com DXR ou SpHL-DXR

Replicata	IC_{50} DXR (nM)	IC_{50} SpHL-DXR (nM)
n = 1	2415	1629
n = 2	2410	1496
Valor médio	2413	1563

O valor de IC_{50} obtido após o tratamento com SpHL-DXR foi 1,5 vezes menor que o valor observado após o tratamento com DXR livre. Esse resultado indica que os

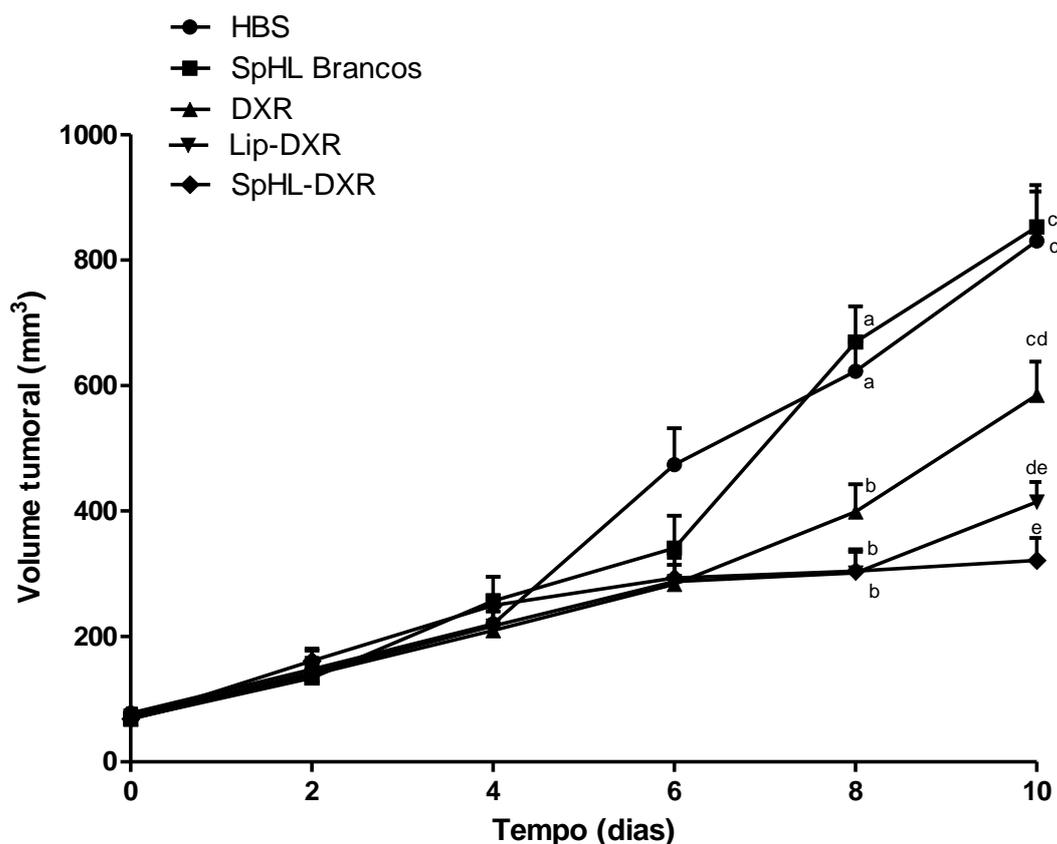
SpHL-DXR podem aprimorar a captação de DXR pelas células tumorais, facilitando a internalização celular, e então aumentar a citotoxicidade da DXR.

A encapsulação da DXR nos SpHL-DXR pode ter contribuído com o maior acúmulo do fármaco no meio intracelular em relação ao fármaco em sua forma livre devido às propriedades fusogênicas do lípide estrutural dessa formulação. Os SpHL-DXR podem ser capazes de fundirem com a membrana celular e liberar a DXR diretamente no citoplasma bem como serem endocitados e fundirem com a membrana endossomal (FERREIRA *et al.*, 2013). Além de permitir maior internalização celular, os SpHL-DXR podem ser capazes de driblar um importante mecanismo de resistência de células tumorais que ocorre devido a superexpressão de transportadores de efluxo, como a glicoproteína P. Esses transportadores de efluxo conseguem expulsar os agentes antitumorais de dentro das células, diminuindo dessa forma o acúmulo desses no meio intracelular (GAO; ZHANG; SUN, 2012). Para superar o mecanismo de efluxo é necessário desviar o reconhecimento do transportador, inibir sua expressão ou inibir sua função (PATEL *et al.*, 2013). A DXR ao estar encapsulada em SpHL-DXR pode não ser reconhecida por esse transportador, possibilitando que ocorra superação da resistência, acúmulo da DXR no meio intracelular e, conseqüentemente, aumento da sua atividade citotóxica.

4.6 Avaliação da atividade antitumoral

Os dados da avaliação da atividade antitumoral baseados no acompanhamento do volume tumoral de camundongos Balb/c fêmeas portadores de tumor de mama da linhagem 4T1 tratados com HBS, SpHL Brancos, solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil[®] e SpHL-DXR estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Determinação do volume tumoral após a administração de HBS, SpHL Brancos, solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil® e SpHL-DXR na dose de 4,0 mg.Kg⁻¹ em camundongos Balb/c portadores de tumor de mama da linhagem 4T1*



*Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=7 para o grupo tratado com HBS; n=5 para o grupo tratado com SpHL Brancos; n=6 para o grupo tratado com solução de DXR; n=5 para o grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil®, Lip-DXR; e n=8 para o grupo tratado com SpHL-DXR). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Abreviaturas: HBS, Tampão HEPES-salina; SpHL Brancos, Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada isentos de DXR; DXR, doxorubicina; Lip-DXR, Formulação lipossomal semelhante ao Doxil®; SpHL-DXR, Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina.

Nos tempos iniciais do estudo (D0 até D4) houve um crescimento do tumor de forma semelhante em todos os grupos de tratamento. Em D6, é possível detectar uma diferença entre os grupos HBS e solução de DXR. Em D8, observa-se que os grupos que não contêm DXR (HBS e SpHL Brancos) passam a ser diferentes dos grupos que contêm o fármaco no tratamento (solução de DXR, lipossomas semelhantes ao

Doxil[®] e SpHL-DXR). Esse dado indica a atividade antitumoral da DXR, uma vez que os grupos de tratamento que não a contêm, apresentaram um maior crescimento do volume tumoral. Outro fato importante a ser observado é o tempo-resposta ao tratamento, visto que a atividade terapêutica da DXR é dose dependente e cumulativa, pois as primeiras evidências de atividade antitumoral apareceram apenas após o término do tratamento.

No tempo D10, o grupo tratado com solução de DXR passa a não apresentar diferença estatística em relação aos controles (HBS e SpHL Brancos), que por sua vez, permanecem diferentes dos grupos tratados com as formulações lipossomais. Uma possível explicação para esse fato é que a DXR em sua forma livre é eliminada rapidamente do organismo, de forma que seu efeito não é sustentado, ocasionando o aumento do volume tumoral tal qual nos grupos controles (GABIZON; SHMEEDA; BARENHOLZ, 2003). Enquanto que nas formulações lipossomais, por serem de circulação prolongada, alteram a farmacocinética da DXR, permanecendo por um tempo maior no organismo e assim possibilita um efeito mais duradouro. Outro motivo que poderia ocasionar uma menor atividade antitumoral a partir da DXR sob sua forma livre seria o aparecimento de resistência. Algumas células tumorais podem adquirir resistência por meio da expulsão da DXR do citoplasma pela ação de transportadores de efluxo presentes na membrana celular (como a glicoproteína P, por exemplo). Tal situação é inexistente quando a DXR está encapsulada em SpHL-DXR uma vez que ao estar no interior do lipossoma, a DXR não é reconhecida pelo transportador (PATEL *et al.*, 2013)

Além disso, o grupo tratado com solução de DXR ainda permanece igual ao grupo tratado com lipossomas semelhantes ao Doxil[®], entretanto, passa a ser diferente do grupo tratado com SpHL-DXR. A diferença entre o grupo tratado com DXR livre e o grupo tratado com SpHL-DXR é de extrema relevância para este trabalho. Pode-se inferir que houve um ganho de atividade ao se encapsular a DXR em lipossomas pH-sensíveis, sugerindo que houve maior internalização celular da DXR na forma lipossomal pH-sensível e manutenção do efeito antitumoral por um período prolongado.

Embora não haja diferença estatística entre o grupo tratado com lipossomas semelhantes ao Doxil[®] e o grupo tratado com SpHL-DXR, pode-se observar que a curva representativa do grupo tratado com SpHL-DXR tende a estabilização enquanto para o grupo tratado com lipossomas semelhantes ao Doxil[®] é mantida uma tendência a aumento. Esses resultados abrem, portanto, a perspectiva para realização de novos estudos de atividade antitumoral, com protocolos de tratamento mais longos, a fim de avaliar a capacidade de estabilização ou redução do volume tumoral pelos SpHL-DXR.

Na Tabela 9 estão dispostos os dados referentes ao VTR e ao TIC obtidos para os tratamentos.

Tabela 9 - Determinação do volume tumoral relativo e da taxa de inibição do crescimento tumoral após a administração de solução de HBS, de solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil[®] e SpHL-DXR

Tratamento	VTR*	TIC (%)
HBS	11,3 ± 4,1	-
DXR	8,8 ± 2,2	21,5
SpHL Brancos	15,1 ± 8,8	-
Lip-DXR	6,3 ± 2,6 ^a	58,1
SpHL-DXR	4,7 ± 1,1 ^a	69,0

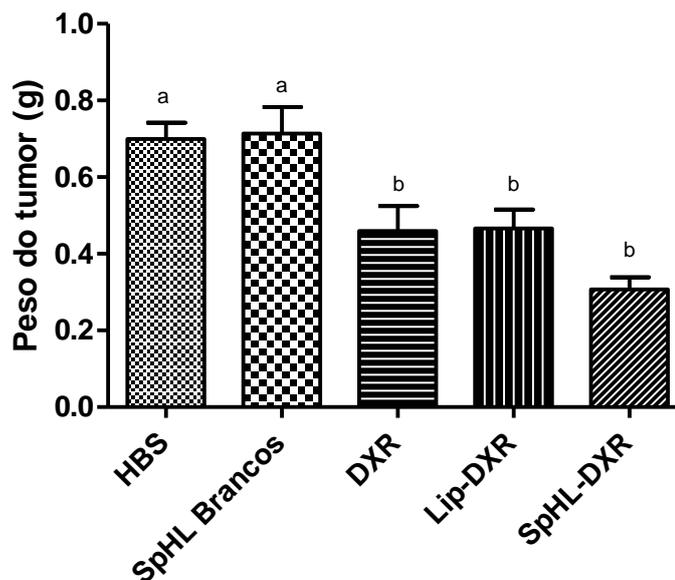
*Resultados expressos em média ± desvio padrão (n=7 para o grupo tratado com HBS; n=5 para o grupo tratado com SpHL Brancos; n=6 para o grupo tratado com solução de DXR; n=5 para o grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®], Lip-DXR; e n=8 para o grupo tratado com SpHL-DXR). ^aRepresenta diferença estatística em relação ao SpHL Brancos.

O tratamento utilizando SpHL-DXR resultou em uma maior taxa de inibição do crescimento tumoral (69,0%) em relação tanto ao grupo tratado com lipossomas semelhantes ao Doxil[®] (58,1%) e quanto ao grupo tratado com solução de DXR (21,5%).

No décimo dia após o início dos tratamentos, os animais foram eutanasiados e os tumores foram removidos, pesados e fixados em formaldeído para avaliação histopatológica. Os dados referentes aos pesos dos tumores estão representados na Figura 15. Como pode ser observado, os grupos controle apresentaram valores

maiores de peso de tumor do que os demais grupos, o que é esperado visto que nesses grupos não foram utilizados tratamentos antitumorais. Para os grupos tratados com solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil[®] e o grupo tratado com SpHL-DXR, os valores de peso de tumor foram menores do que nos grupos controle, embora estatisticamente semelhantes entre si. De forma análoga aos resultados observados para a avaliação do volume tumoral, nota-se uma tendência à maior controle do crescimento tumoral pelo tratamento com SpHL-DXR quando comparado com os demais tratamentos.

Figura 15 - Determinação do peso do tumor após a administração de HBS, SpHL Brancos, solução de DXR, lipossomas semelhantes ao Doxil[®] e SpHL-DXR na dose de 4,0 mg.Kg⁻¹ em camundongos Balb/c portadores de tumor de mama da linhagem 4T1*



*Resultados expressos em média \pm erro padrão da média (n=7 para o grupo tratado com HBS; n=5 para o grupo tratado com SpHL Brancos; n=6 para o grupo tratado com solução de DXR; n=5 para o grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®], Lip-DXR; e n=8 para o grupo tratado com SpHL-DXR). *Letras iguais indicam que não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Abreviaturas: HBS, Tampão HEPES-salina; SpHL Brancos, Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada isentos de DXR; DXR, doxorubicina; Lip-DXR, Formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]; SpHL-DXR, Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina.

Na Figura 16 estão demonstrados tumores representativos retirados dos animais tratados.

Figura 16 - Tumores representativos retirados de animais tratados com HBS (A), SpHL Brancos (B), SpHL-DXR (C), lipossomas semelhantes ao Doxil[®] (D) e solução de DXR (E)

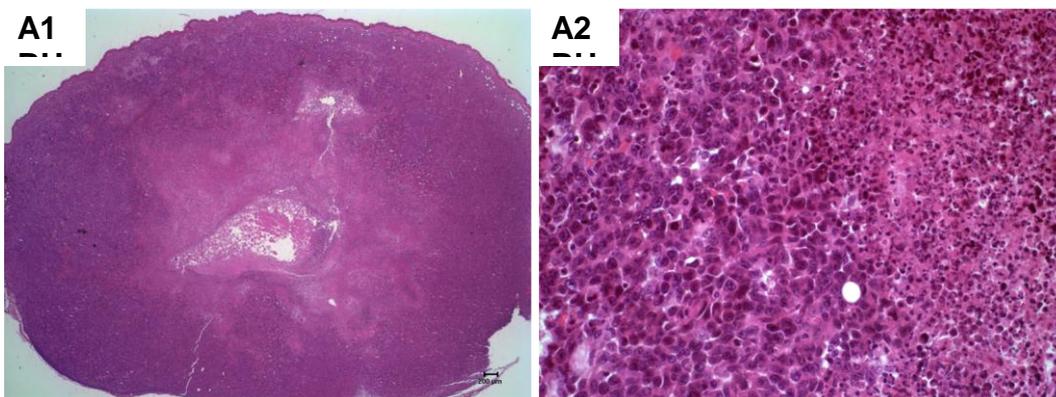


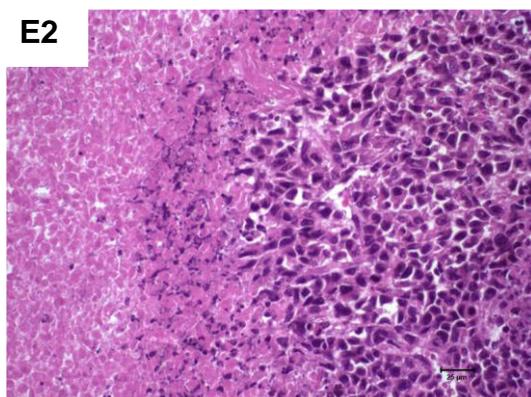
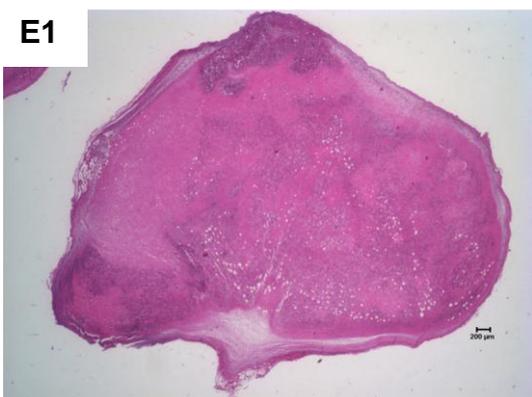
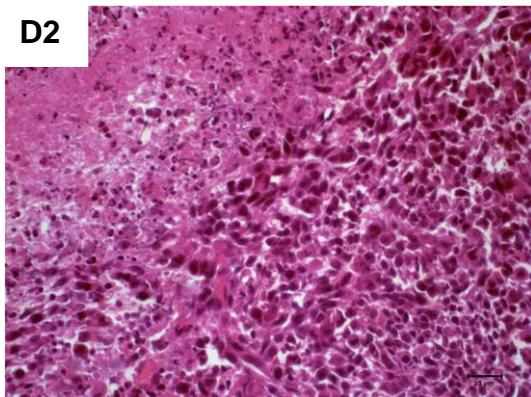
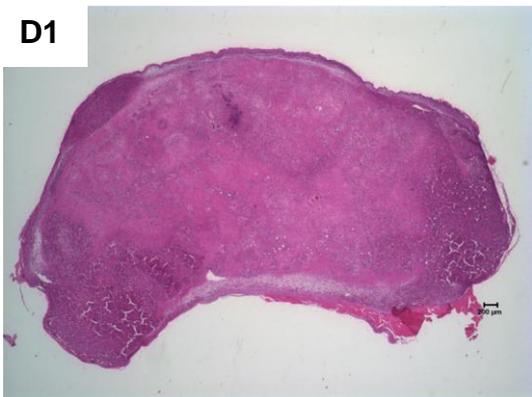
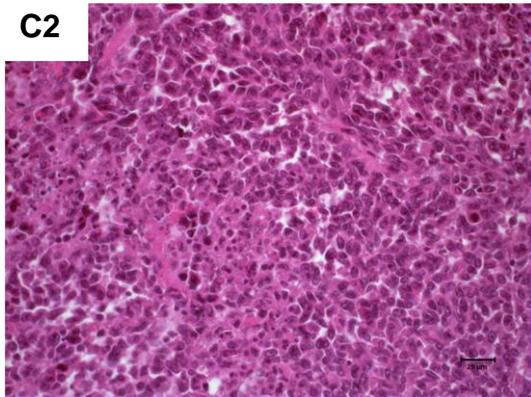
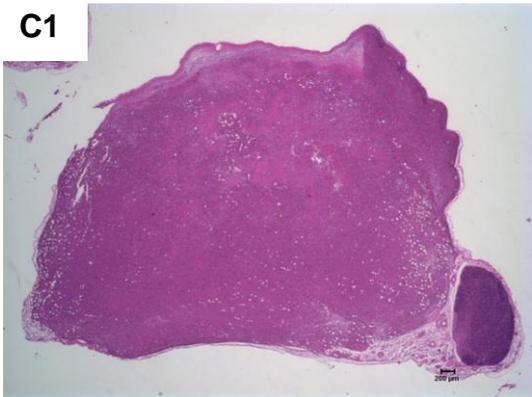
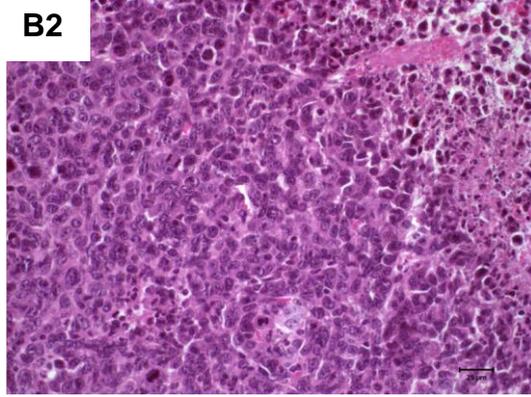
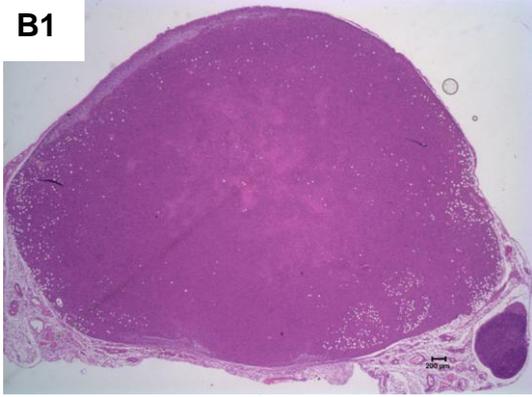
A avaliação histopatológica dos tumores ao final dos tratamentos está representada na Figura 17. Os tumores dos animais do grupo tratado com HBS (controle) apresentaram células neoplásicas volumosas, pleomórficas, contendo núcleos hipercromáticos. Foi também observada a presença de células contendo nucléolos múltiplos e proeminentes e grandes áreas de necrose. Para os animais tratados com SpHL Brancos, os tumores apresentaram perfis bastante similares, com células neoplásicas volumosas de citoplasma amplo, pleomórficas, contendo núcleos hipercromáticos, algumas vezes espaçadas umas das outras. Figuras de mitose foram observadas em moderada quantidade. Foi observada a presença de células contendo nucléolos múltiplos e proeminentes. Associado, observam-se áreas pontuais de necrose intratumoral. Para os animais tratados com solução de DXR, os tumores apresentaram células neoplásicas volumosas de citoplasma amplo, pleomórficas, contendo núcleos hipercromáticos. Foi observada a presença de células contendo nucléolos múltiplos e proeminentes. As áreas de necrose intratumoral estavam dispostas de forma difusa, em quantidade moderada. Para os animais tratados com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®], também pode ser observada a presença células neoplásicas volumosas, pleomórficas, contendo núcleos hipercromáticos, algumas vezes espaçadas umas das outras. Foi observada a presença de células contendo nucléolos múltiplos e proeminentes, além de células contendo núcleos picnóticos e células em processo de cariólise e cariorrexe. Associado, observam-se áreas relativamente extensas de necrose intratumoral. Para

os animais tratados com SpHL-DXR, também pode ser observada a presença de células neoplásicas volumosas, pleomórficas, contendo núcleos hipercromáticos, algumas vezes espaçadas umas das outras. Foi observada a presença de células contendo nucléolos múltiplos e proeminentes, além de células contendo núcleos picnóticos e células em processo de cariólise e cariorrexe. Associado, observam-se grandes áreas de necrose intratumoral, tomando quase toda a extensão do tumor.

Os grupos tratados com as formulações lipossomais apresentaram áreas de necrose mais extensas do que o grupo tratado com solução de DXR, o que pode ser um indicativo de melhor eficácia antitumoral. Ao se comparar ambas as formulações lipossomais, é possível notar que as áreas de necrose presentes no grupo tratado com SpHL-DXR aparentam ser maiores do que no grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®].

Figura 17 - Fotomicrografias representativas dos tumores de mama da linhagem 4T1 implantados em camundongos Balb/c fêmeas dos grupos tratados com HBS (A), com SpHL Brancos (B), com solução de DXR (C), formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] (D) ou SpHL-DXR (E). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 2 (A1,B1,C1,D1 e E1) ou x 40 (A2,B2,C2,D2 e E2).





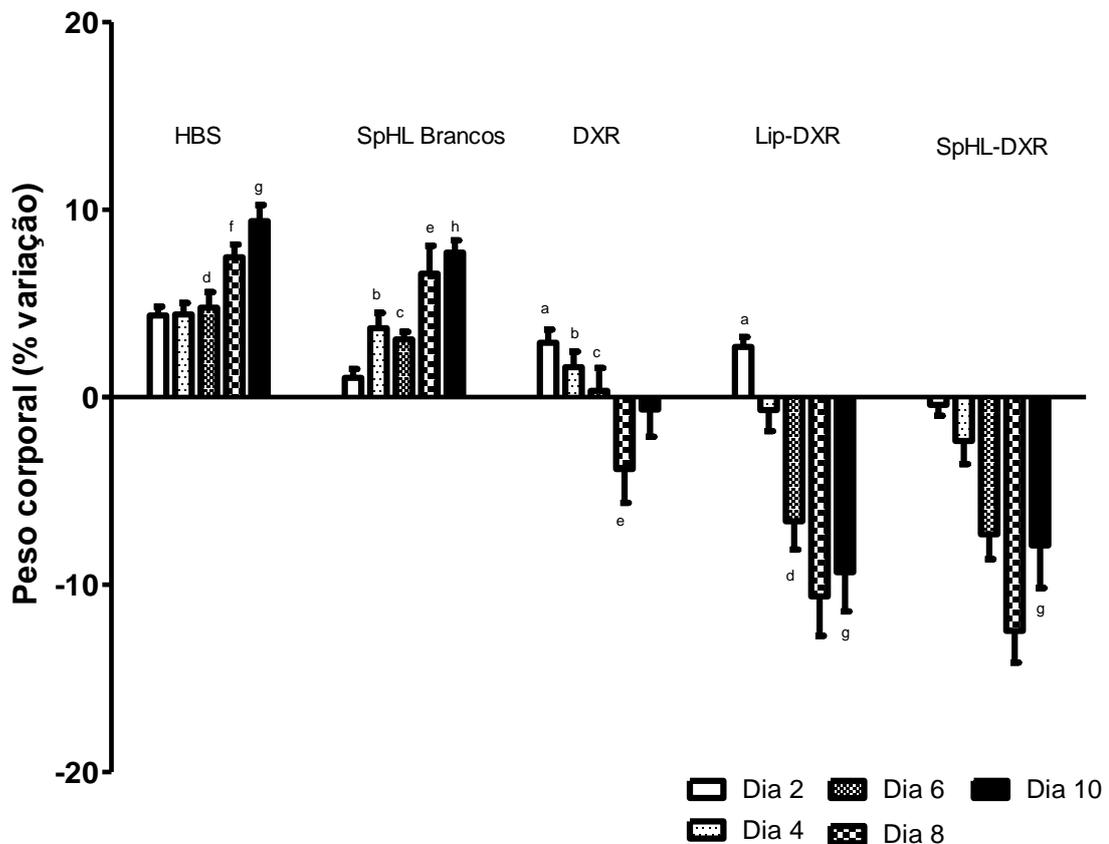
4.7 Avaliação preliminar da toxicidade

Na Figura 18 está representada a variação de peso corporal dos camundongos tratados com HBS, SpHL Brancos, solução de DXR, formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] e SpHL-DXR. Pode-se notar primeiramente, que nos grupos cujos tratamentos não continham DXR (HBS e SpHL Brancos) houve ganho de peso ao longo do tempo, não havendo diferença estatística entre ambos os tratamentos, com exceção do dia 2. O ganho de peso nesses grupos pode ser resultante do natural crescimento dos animais acrescido do notável aumento do volume tumoral, visto que nesses grupos, os tumores apresentavam diâmetros bem maiores em relação aos demais, como indicado na Figura 18. No grupo tratado com DXR, houve ganho de peso no segundo dia após a primeira administração, entretanto a partir da quarta administração pode-se observar que ocorre perda do peso corporal. A partir do sexto dia, a variação de peso corporal do grupo tratado com DXR torna-se estaticamente diferente do grupo tratado com HBS. A perda de peso mais pronunciada a partir desse intervalo de tempo pode ser resultante de uma possível toxicidade induzida pelo tratamento com DXR. Em relação às formulações lipossomais, pôde-se observar uma menor perda de peso corporal para os animais tratados com DXR. Isso pode ser explicado pelo fato de que a DXR apresenta um maior *clearance* plasmático e um maior volume de distribuição do que formulações lipossomais de circulação prolongada contendo DXR, com isso a taxa de eliminação de DXR na forma livre é maior, o que pode contribuir para uma eliminação mais rápida, acarretando em menores chances de provocar danos, inclusive perda de peso corporal (GABIZON; SHMEEDA; BARENHOLZ, 2003). Em relação aos animais tratados com a formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®], a partir do sexto dia de tratamento houve uma maior perda de peso corporal, enquanto que os animais tratados com SpHL-DXR apresentaram uma perda de peso corporal ao longo de todo o tempo de investigação.

Os grupos tratados com as formulações (lipossomas semelhantes ao Doxil[®] e SpHL-DXR) foram os que apresentaram maior perda de peso durante o estudo, sendo que não houve diferença estatística entre ambos (exceto para o dia 2). O grupo tratado com SpHL-DXR apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo tratado com SpHL Brancos em todos os tempos do estudo, exceto no

segundo dia. A maior perda de peso dos grupos tratados com as formulações lipossomais pode estar relacionado a um possível menor *clearance* plasmático, com conseqüente, menor eliminação do organismo, possibilitando assim ao surgimento de efeitos tóxicos, como a redução a redução do peso corporal.

Figura 18 - Determinação da variação do peso corporal de camundongos Balb/c fêmeas portadores de tumor de mama 4T1 submetido a diferentes tratamentos*



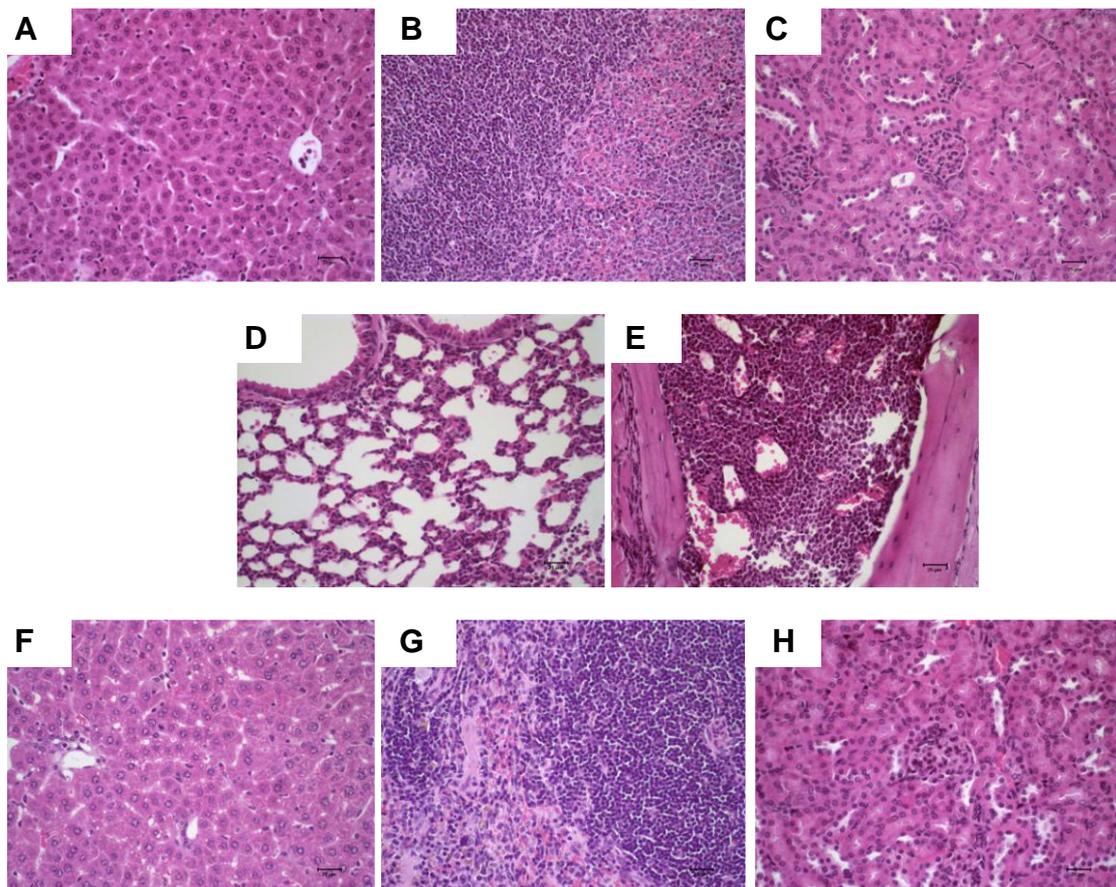
*Resultados expressos em média \pm erro padrão da média ($n=7$ para o grupo tratado com HBS; $n=5$ para o grupo tratado com SpHL Brancos; $n=6$ para o grupo tratado com solução de DXR; $n=5$ para o grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®], Lip-DXR; e $n=8$ para o grupo tratado com SpHL-DXR). ^{a,b,c,e,h} Representa diferença estatística em relação ao tratamento com SpHL-DXR. ^{d,f,g} Representa diferença estatística em relação ao tratamento com DXR. **Abreviaturas:** HBS, Tampão HEPES-salina; SpHL Brancos, Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada isentos de DXR; DXR, doxorubicina; Lip-DXR, Formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]; SpHL-DXR, Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo doxorubicina.

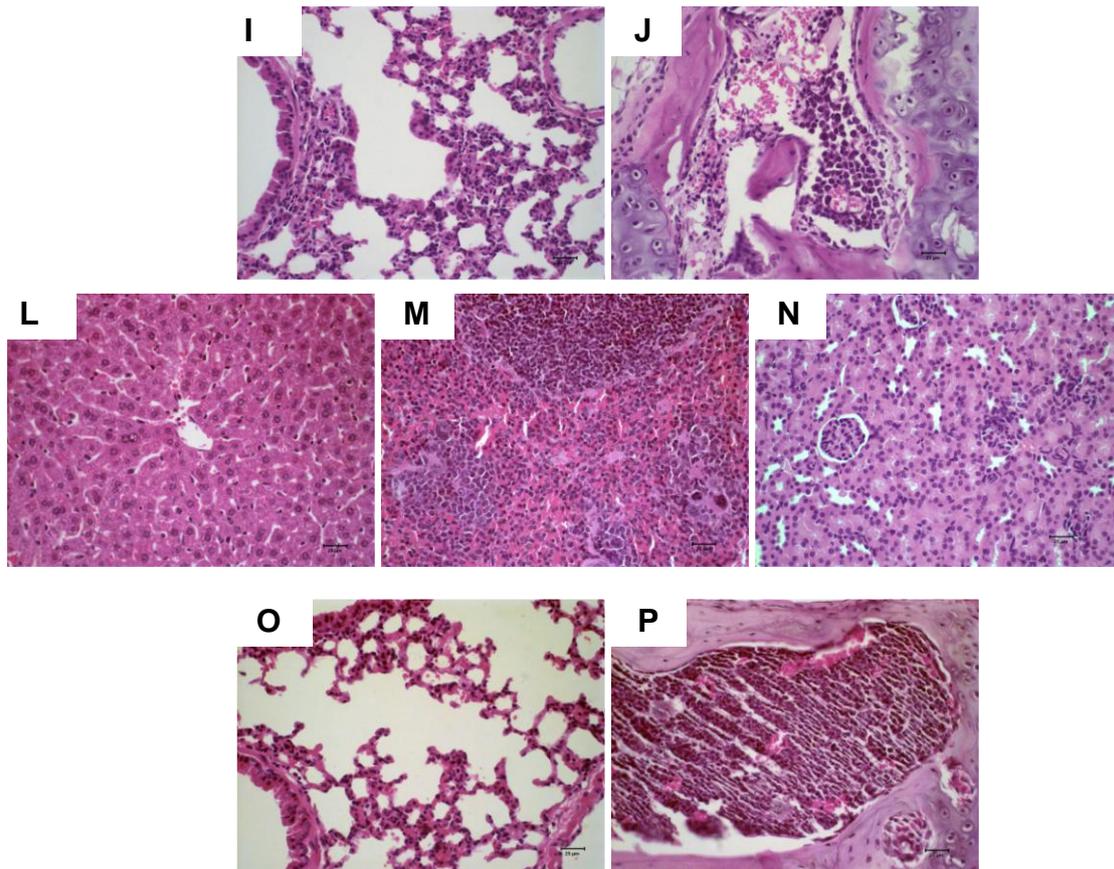
Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e os órgãos de interesse (fígado, baço, rim, pulmão, costelas e coração) foram removidos para avaliação histológica. Fotomicrografias representativas dos órgãos dos animais tratados com

HBS (controle), com SpHL-DXR e com solução de DXR foram adquiridas (Figura 19). Não foram observadas alterações histológicas indicativas de toxicidade nos órgãos dos animais tratados com SpHL Brancos, solução de DXR, formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] e SpHL-DXR quando comparados com o grupo controle tratado com HBS; houve preservação da arquitetura celular típica e ausência de infiltrado inflamatório. Isto sugere que a formulação de SpHL-DXR não oferece danos teciduais nas condições de tratamento investigadas, o que viabiliza a sua administração.

A busca por metástase nos órgãos alvo (pulmão e osso) foi realizada histologicamente, entretanto, não foram encontradas células metastáticas.

Figura 19 - Fotomicrografias dos tecidos hepático, esplênico, renal, pulmonar e ósseo de camundongos Balb/c pertencentes ao grupo tratado com HBS (controle) (A, B, C, D e E.), grupo tratado com SpHL-DXR (F,G, H, I e J) e grupo tratado com solução de DXR (L, M, N, O, e P). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 40.



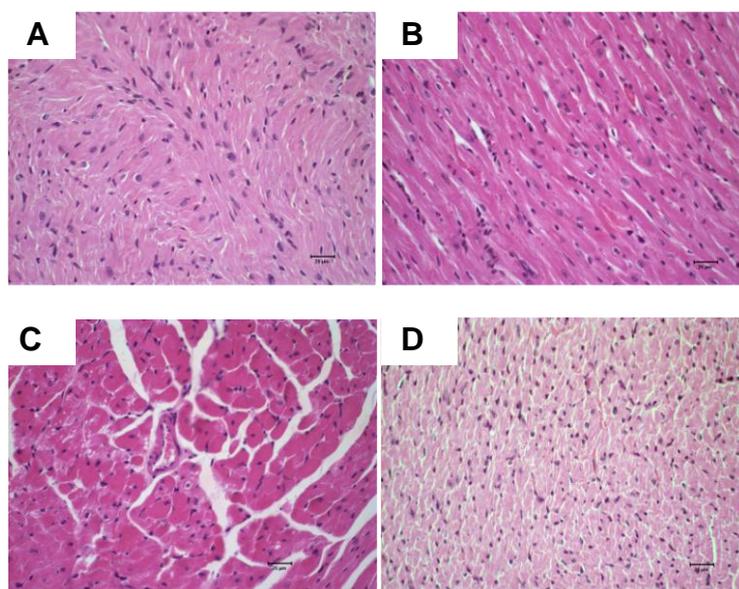


A análise histopatológica do tecido cardíaco do grupo tratado com solução de DXR (Figura 20) permitiu visualizar lesão cardíaca evidenciada pela perda de estriação, presença de fibras edemaciadas, células com núcleo picnótico ou ausência de núcleo, necrose e áreas com vacuolização e degeneração hialina. Todos esses fatores são indicativos da toxicidade cardíaca apresentada pela DXR, estando ausentes no grupo tratado com SpHL-DXR e no grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]. Uma das maiores limitações do uso da DXR é a cardiotoxicidade, podendo em algumas situações evoluir para insuficiência cardíaca congestiva. Os seus efeitos cardiotoxícos resultam da produção de espécies reativas de oxigênio, levando a interrupção da homeostasia do cálcio, ao *stress* oxidativo, dano mitocondrial, necrose e induzindo vias apoptóticas (GHARANEI *et al.*,2014).

Dessa forma, as formulações de SpHL-DXR e semelhante ao Doxil[®] proporcionaram uma proteção contra a toxicidade cardíaca induzida pela DXR na forma livre. Sempkowski e colaboradores (2014) relataram que o aumento no *stress* oxidativo poderia levar a mudanças subcelulares no miocárdio, incluindo perda de miofibrilas e

vacuolização das células miocárdicas – aspectos que foram observados na análise histopatológica do grupo tratado com solução de DXR.

Figura 20 - Fotomicrografias do tecido cardíaco de camundongos Balb/c pertencentes ao grupo tratado com HBS (A), grupo tratado com SpHL-DXR (B), grupo tratado com solução de DXR (C) e grupo tratado com formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] (D). Coloração hematoxilina-eosina, aumento original x 40.



Durante todo o período do estudo, não houve morte de nenhum animal, em nenhum dos grupos estudados.

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- A formulação lipossomal desenvolvida, SpHL-DXR, apresentou parâmetros físico-químicos desejáveis para a sua aplicação *in vivo*.
- Os estudos de estabilidade de armazenamento comprovaram que a formulação branca (SpHL Brancos) mantém suas características físico-químicas por até seis meses, permitindo a rápida e completa encapsulação da DXR em apenas 2 horas de incubação. Esses resultados indicam a possibilidade de desenvolvimento de um kit

contendo dois frascos: (1) dispersão de SpHL Brancos e (2) DXR liofilizada que seriam misturados momentos antes da administração no paciente. Com isso, seria possível garantir alta estabilidade da DXR, que estaria armazenada na forma sólida e menos susceptível à degradação, assim como reduzir o risco de liberação do fármaco da formulação antes da sua administração.

- Estudos de alterações do diâmetro médio e potencial zeta em função do pH demonstraram que SpHL-DXR mantém sua pH-sensibilidade mesmo após encapsulação da DXR.

- Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram melhora da citotoxicidade da DXR quando encapsulada em SpHL-DXR.

- A avaliação da atividade antitumoral, por análises de volume e peso tumoral, demonstrou que os SpHL-DXR tendem a estabilizar o tumor, apresentando maior capacidade de inibir o crescimento que os demais tratamentos. Essa tendência à estabilização não foi observada no tratamento com a formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]. Ainda, na análise de volume tumoral, no último tempo de estudo, foi possível observar diferença estatística do tratamento com SpHL-DXR em relação ao tratamento com DXR – tal diferença não foi evidenciada quando comparados os tratamentos com DXR e formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®]. Além disso, por avaliação histológica, observou-se maiores áreas de necrose, quando comparada com o fármaco livre. - Não foram observadas alterações teciduais nos órgãos do grupo tratado com SpHL-DXR quando comparados com o grupo tratado com HBS, indicando a ausência de toxicidade desta formulação.

- Foram observadas lesões no tecido cardíaco dos animais tratados com solução de DXR, enquanto que essas estavam ausentes no grupo tratado com SpHL-DXR.

Diante do exposto, SpHL-DXR apresenta-se como uma formulação promissora para o tratamento do câncer de mama, já que demonstrou ótima atividade antitumoral com tendência à estabilização do crescimento (diferentemente da formulação

lipossomal semelhante ao Doxil[®]) além da proteção contra a toxicidade cardíaca provocada pelo fármaco na forma livre.

6 PERSPECTIVAS

Com o objetivo de melhorar o conhecimento e dar prosseguimento ao desenvolvimento e avaliação do potencial da formulação desenvolvida nesse trabalho, diversos experimentos podem ser propostos, dentre eles:

- Realizar estudos de estabilidade de armazenamento da formulação contendo o fármaco encapsulado, a fim de avaliar possível instabilidade e liberação da DXR;
- Obter imagens de microscopia confocal a fim de visualizar a internalização celular da DXR a partir do tratamento com SpHL-DXR e comparar com os tratamentos com a formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] e com a DXR em sua forma livre;
- Realizar a histomorfometria dos cortes histológicos tumorais visando refinar a comparação entre os tratamentos já propostos;
- Avaliar por meio de técnicas imunohistoquímicas o índice proliferativo e apoptótico das células neoplásicas do tumor de mama da linhagem 4T1 tratado com SpHL-DXR, formulação lipossomal semelhante ao Doxil[®] e com a DXR em sua forma livre;
- Realizar estudos de atividade antitumoral com diferentes doses e períodos de tratamento, a fim de evidenciar os benefícios do tratamento com os SpHL-DXR;
- Desenvolver estudos de atividade antitumoral utilizando SpHL-DXR em outros modelos experimentais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Seminars in Oncology*, v.19, 529–542, 1992.
- ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes effect of dose. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1068, p.133-141, 1991.
- American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
- American Cancer Society, Chemotherapy for Breast Cancer. Disponível em <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>>, acesso em 24-11-2015;
- ARPINO, G.; BARDOU, V.J.; CLARK, G.M.; ELLEDGE, R.M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Research*, v. 6 p. 149-156, 2004.
- Azonanotechnology article. The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes using Malvern Instruments. Disponível em: <<http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1214>>. Acesso em: 10/01/2016
- BANDEKAR, A.; KARVE, S.; CHANG, M.; MU, Q.; ROTOLO, J.; SOFOU, S. Antitumor efficacy following the intracellular and interstitial release of liposomal doxorubicin. *Biomaterials*, v. 33, p. 4345-4352, 2012.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions the lamellae os swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.
- BARENHOLZ, Y.C. Doxil[®] – The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, v. 160, p. 117-134, 2012.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BERTOS, N.; PARK, M. Breast cancer – one term, many entities? *The Journal of Clinical Investigation*, v. 121, p. 3789-3796, 2011.

- BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O.C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.66, p. 2-25, 2014.
- BHAI, S.A.; YADAV, V.; MAMATHA, Y.; PRASANTH, V.V. Liposomes: an overview. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, v.1, p. 13-21, 2012.
- BINASCHI, M.; BIGIONI, M.; CIPOLLONE, A.; ROSSI, C.; GOSO, C.; MAGGI, C.A.; CAPRANICO, G.; ANIMATI, F. Anthracyclines: selected new developments. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, v. 1, p. 113 -130, 2001.
- BISWAS, S.; DODWADKAR, N. S.; DESHPANDE, P.P.; PARAB, S.; TORCHILIN, V.P. Surface functionalization of doxorubicin-loaded liposomes with octa-arginine for enhanced anticancer activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 84, p.517-525, 2013.
- BLANCO, E.; FERRARI, M. Emerging nanotherapeutic strategies in breast cancer. *The Breast*, v.23, p. 10-18, 2014.
- BOUCEK Jr, R.J.; DODD, D.A., ATKINSON, J.B., OQUIST, N., OLSON, R.D. Contractile failure in chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 29, p.2631–2640, 1997.
- CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 125, p. 139-146, 2003.
- CAO, H.; ZHANG, Z.; ZHAO, S.; HE, X.; YU, H.; YIN, Q.; ZHANG, Z.; GU, W.; CHEN, L.; LI, Y. Hydrophobic interaction mediating self-assembled nanoparticles of succinobucol suppress lung metastasis of breast cancer by inhibition of VCAM-1 expression. *Journal of Controlled Release*, v. 205, p. 162-171, 2015.
- CRISTOFANILLI, M.; GONZALES-ANGULO, A.; SNEIGE, N.; KAU, S.; BROGLIO, K.; THERIAULT, R.L.; VALERO, V.; BUDZAR, A.U.; KUERER, H.; BUCCHOLZ, T.A.; HORTOBAGYI, G. Invasive lobular carcinoma classic type: response to primary chemotherapy and survival outcomes. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, p.41-48, 2005.
- DEVI, P.U. Basics of carcinogenesis. *Health Administrator*, v. 18, p. 16-24, 2004.
- DRAGNEV, K.H.; RIGAS, J.R.; DMITROVSKY, E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. *Oncologist*, v. 5, p. 361-368, 2000.

- ECONOMOPOULOU,P.; DIMITRIADIS,G.; PSYRRI,A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treatment Reviews*, v.41, p.1-8, 2015.
- FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, p. 161–171, 2005.
- FERREIRA, D.S.; LOPES, S.C.A.; FRANCO, M.S.; OLIVEIRA, M.C. pH sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Therapeutic Delivery*, v. 4, p. 1099 – 1123, 2013.
- FERREIRA, D.D.S. Desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de superfície modificada com alendronato contendo doxorubicina para a aplicação no tratamento de metástases ósseas em modelo animal experimental, 239 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. Em: *Princípios Físico-químicos em Farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. Cap. 7, p. 345-411, 2003.
- FOKAS, E.; ENGENHART-CABILLIC, R.; DANILIDIS, K.; ROSE, F.; AN, H.X. Metastasis: the seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Reviews*, v. 26, n. 3, p. 705-715, 2007.
- FONTES, A. P. S.; CESAR, E. T.; BERALDO, H. A química Inorgânica na terapia do câncer. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 6, p. 13-18, 2005.
- FOULKES, W.D.; SMITH, I.E.; REIS-FILHO, J.S. Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 363, p. 1938-1948, 2010.
- GAO, Z.; ZHANG, L.; SUN, Y. Nanotechnology applied to overcome tumor drug resistance. *Journal of Controlled Release*, v. 162, p. 45-55, 2012.
- GABIZON, A.; SHMEEDA, H.; GRENADER, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 45, p. 338-398, 2012.
- GHARANEI, M.; HUSSAIN, A.; JAMES, R.S.; JANNEH, O.; MADDOCK, H. Investigation into the cardiotoxic effects of doxorubicin on contractile function and the protection afforded by cyclosporin A using the work-loop assay. *Toxicology in Vitro*, v. 28, p. 722-731, 2014.

- GUAN, X.; LI, Y.; JIAO, Z.; CHEN, J.; GUO, Z.; TIAN, H.; CHEN, X. A pH-sensitive charge-conversion system for doxorubicin delivery, *Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 7672-7678, 2013.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The next generation. *Cell*, v.144, p. 646-674, 2011.
- HIGGINS, M. J.; BASELGA, J. Targeted therapies for breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v.121, p. 3797-3803, 2011.
- INCA, Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil, *Instituto Nacional do Câncer*, 2014.
- INCA, Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil, *Instituto Nacional do Câncer*, 2015.
- ISO: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Nanotechnologies. ISO 80004-2:2015. Geneva: 2015.
- KLAUNIG, J.E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 254, p. 86-99, 2011.
- KLIBANOV, A. L.; MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V. P.; HUANG, L. Amphipathic polyethylene glycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Letters*, v.268, p. 235-237, 1990.
- LAO, J.; MADANI, J.; PUÉRTOLAS, T.; ÁLVAREZ, M.; HERNÁNDEZ, A.; PAZOCID, R.; ARTAL, A.; TORRES, A.A. Liposomal Doxorubicin in the Treatment of Breast Cancer Patients: A Review. *Journal of Drug Delivery*, v. 2013, p. 1-12, 2013.
- LASIC, D. D. Novel application of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 307-321, 1998.
- LEITE, E.A.; SOUZA, C.M.; CARVALHO-JÚNIOR, A.D.; COELHO, L.G.V.; LANA, A.M.Q.; CASSALI, G.D.; OLIVEIRA, M.C. 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.
- LOPES, S.C.A.; GIUBERTI, C.S.; ROCHA, T.G.R.; FERREIRA, D.S.; LEITE, E.A.; OLIVEIRA, M.C. Liposomes as carriers of anticancer drugs. In: Leticia Rangel. (Org.). *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. 1ed. Rijeka, Croácia: InTech, v. 1, p. 85-124, 2013.

- MAEDA, H., WU, J., SAWA, T., MATSUMURA, Y., HORI, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*, v. 65, p. 271-284, 2000.
- MAEDA, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate Chemistry*, v.21, p. 797-802, 2010.
- MALVERN INSTRUMENTS. Size theory. In: Malvern zetasizer nano series user manual, cap 11, p. 1-6, 2013
- MARUYAMA, K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effect. *Advanced Drug Delivery. Reviews*, v.63,p. 161–169, 2011.
- MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G., GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, v. 56,185–229, 2004.
- MOGHIMI, S.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research*, v. 42, p. 463-479, 2003.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, NCI, Breast Cancer, Disponível em <<http://www.cancer.gov/types/breast>>, acesso em 24-11-2015;
- NEAL,C.L.,YU,D.14-3-3 Zeta as a prognostic marker and therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets*, v.14, p. 1343–1354, 2010.
- NEW, R.R.C. Liposomes: a practical approach. New York: Oxford University Press; 1990.
- O'BRIEN, M.E.; WIGLER, N.; INBAR, M.; ROSSO, R.; GRISCHKE, E.; SANTORO, A.; CATANE, R.; KIEBACK, D.G.; TOMCZAK, P.; ACKLAND, S.P.; ORLANDI, F.; MELLARS, L.; ALLAND, L.; TENDLER, C.; CAELYX Breast Cancer Study Group. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/ Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, v. 15, p. 440-449, 2004.
- OLIVEIRA, M. C.; BOUTET, V.; FATTAL, E.; BOQUET, D.; GROGNET, J. M.; COUVREUR,P.; DEVERRE, C. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. *Life Science*, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

- OLIVEIRA, P.A.; COLAÇO,A.; CHAVES,R.; GUEDES-PINTO,H.; DE-LA-CRUZ, L.F.; LOPES, C. Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v.79, p.593-616, 2007.
- O'SHAUGHNESSY, J.A. Pegylated Liposomal Doxorubicin in the Treatment of Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, v. 4, p. 318-328, 2003.
- PATEL, N. R.; PATTNI, B. S.; ABOUZEID, A. H.; TORCHILIN, V. P. Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, p. 1748-1762, 2013.
- PEER, D.; KARP, J. M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O. C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, v.2, p. 751-760, 2007.
- PROVODA, C.J.; STIER, E.M.; LEE, K. Tumor cell killing enabled by listeriolysin O-liposome-mediated delivery of the protein toxin gelonin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 35102- 35108, 2003.
- RANSON, M.R.; CHEESEMAN, S.; WHITE, S.; MARGISON, J. Caelyx (stealth liposomal doxorubicin) in the treatment of advanced breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.37, p. 115-120, 2001.
- ROLLAND, C. L.; DINEEN, S.P.; LYNN, K.D.; SULLIVAN, L.A.; DELLINGER, M.T.; SADEGH, L.; SULLIVAN, J.P.; SHAMES, D.S.; BREKKEN, R.A. 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.
- SAKAMOTO, J.H.; VAN DE VEN, A.L.; GODIN, B.; BLANCO, E.; SERDA, R.E.; GRATTONI, A.; ZIEMYS, A.; BOUAMRANI, A.; HU, T.; RANGANATHAN, S.I.; DE ROSA, E.; MARTINEZ, J.O.; SMID, C.A.; BUCHANAN, R.M.; LEE, S.Y.; SRINIVASAN, S.; LANDRY, M.; MEYN, A.; TASCIOTTI, E.; LIU, X.; DECUZZI,P.; FERRARI, M. Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacological Research*, v. 62, p. 57-89, 2010.
- SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers and intracellular drug delivery. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 16, p. 269-275, 2012.
- SEMPKOWSKI, M.; LOCKE, T.; STRAS, S.; ZHU, C.; SOFOU, S. Liposome-based approaches for delivery of mainstream chemotherapeutics: preparation methods, liposome designs, therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncogenesis*, v. 19, p. 177-221, 2014.

- SCHUTZ, C.A.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; LYNCH, I.; RIEDIKER, M. Therapeutic nanoparticles in clinics and under clinical evaluation. *Nanomedicine*, v.8, p.449-467, 2013.
- SIEGEL, D. P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. *Biophysical Journal*, v. 49, p. 1171-1183, 1986.
- SIMÕES, S., MOREIRA, J.N., FONSECA, C., DÜZGÜNES, N., LIMA, M.C.P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 947-965, 2004.
- SINGAL, P.K. ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, p. 900-905, 1998.
- STUBBS, M., Mc SHEEHY, P.M.J., GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acid pH in tumors: a magnetic resonance study. *Advances in Enzyme Regulation*, v. 39, p. 13-30, 1999.
- SUDIMACK, J.J, GUO, W., TJARKS, W., LEE, R.J. A novel pH-sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1564, p. 31-37, 2002.
- SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. Liposome as pharmaceutical dosage forms. In: DEKKER, M. *Encyclopedia of pharmaceutical Technology*, v. 9, p. 1-39, 1994.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, p. 167-170, 2012.
- TANAKA, T.; SHIMIZU, M.; KOCHI,T.; MORIWAKI, H. Chemical-induced Carcinogenesis, *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, v. 5, p. 203-209, 2013.
- TORCHILIN, V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *The AAPS Journal*, v. 9, p. 128-147, 2007.
- TORCHILIN, V. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 302-315, 2012.

- TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p. 131-135, 2011.
 - TORCHILIN, V. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, p. 1-15, 2014.
 - ULRICH, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, v. 22, p. 129-150, 2002.
 - VAAGE, J.; DONOVAN, D.; MAYHEW, E.; ABRA, R.; HUANG, A. Therapy of human ovarian carcinoma xenografts using doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *International Journal of Cancer*, v.72, p.3671-3675, 1993a.
 - VAAGE, J.; DONOVAN, D.; MAYHEW, E.; USTER, P.; WOODLE, M. Therapy of mouse mammary carcinomas with vincristine and doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes. *International Journal of Cancer*, v.54, p. 959-964, 1993b.
 - VAAGE, J.; DONOVAN, D.; WIPFF, E.; ABRA, R.; COLBERN, G.; USTER, P.; WORKING, P. Therapy of a xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposomes. *International Journal of Cancer*, v.80, p.134-137, 1999.
 - VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, v. 70, p. 95-111, 1995.
- VERBRIDGE, S. S.; CHOI, N. W.; ZHENG, Y.; BROOKS, D.J.; STROOCK, A.D.; FISCHBACH, C. Oxygen-Controlled Three-Dimensional Cultures to Analyze Tumor Angiogenesis. *Tissue Engineering*. v.16, p.2133- 2141, 2010.
- VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer, *Nature*, v.469, p. 314-322, 2011.
 - VLUG, E.; ERCAN, C.; VAN DER WALL, E.; VAN DIEST, P.J.; DERKSEN, P.W.B. Lobular breast cancer: pathology, biology, and options for clinical intervention. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*, v.62, p. 7-21, 2014.
 - WANG, M.; THANOU, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, v. 62, p. 90-99, 2010.
 - WEIGELT, B.; PETERSE, J.L.; V'ANT VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models, *Nature Reviews Cancer*, v. 5, p. 591-602, 2005.

- WEISS, R. B. The Anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology*, v. 19, p. 670-686, 1992.
- WONG, Y.H.; CHEN, R.H.; CHEN, B.S. Core and specific network markers of carcinogenesis from multiple cancer samples. *Journal of Theoretical Biology*, v. 362, p. 17-34, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. World Cancer Report 2008. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
- YANG, F.; TEVES, S.S.; KEMP, C.J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1845, p. 84-89, 2014.
- YOULDEN, D.R.; CRAMB, S.M.; DUNN, N.A.; MULLER, J.M.; PYKE, C.M.; BAADE, P.D. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiology*, v. 36, p. 237-248, 2012.