

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

ISABELA PEREIRA GOMES

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE LIPOSSOMAS
TERMOSENSÍVEIS DE CISPLATINA FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO
HIALURÔNICO**

Belo Horizonte – MG

2021

ISABELA PEREIRA GOMES

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE LIPOSSOMAS
TERMOSENSÍVEIS DE CISPLATINA FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO
HIALURÔNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para obter o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Elaine Amaral Leite

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Belo Horizonte – MG

2021

G633p Gomes, Isabela Pereira.
Propriedades físico-químicas e biológicas de lipossomas termossensíveis de cisplatina funcionalizados com ácido hialurônico / Isabela Pereira Gomes. – 2021.
132 f. : il.

Orientadora: Elaine Amaral Leite.
Coorientador: André Luís Branco de Barros.

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

1. Lipossomos – Teses. 2. Toxicidade – Teses. 3. Câncer – Tratamento – Teses. 4. Agentes antineoplásicos – Teses. 5. Lipossomas. 6. Cisplatina. 7. Ácido hialurônico. I. Leite, Elaine Amaral. II. Barros, André Luís Branco de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.994



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

*"PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE LIPOSSOMAS TERMOSENSÍVEIS DE CISPLATINA
FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO HIALURÔNICO"*

ISABELA PEREIRA GOMES

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

Profa. Dra. Raquel Silva Araújo
Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Prof. Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares
Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Profa. Dra. Marta Marques Gontijo de Aguiar
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Elaine Amaral Leite - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. André Luís Branco de Barros - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 28 de maio de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Cristian Ferreira Soares, Usuário Externo**, em 28/05/2021, às 18:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marta Marques Gontijo de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 28/05/2021, às 18:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Antonio Miranda Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 28/05/2021, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com

assinatura
eletrônica

fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Branco de Barros, Professor do Magistério Superior**, em 28/05/2021, às 18:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 28/05/2021, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Silva Araújo, Usuário Externo**, em 31/05/2021, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0747675** e o código CRC **18CEE4B1**.

Colaboradores

Prof. Ângelo Malaquias

Dep. de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais

Profª. Cristiane dos Santos Giuberti

Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Ricardo José Alves

Dep. de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Geovanni Dantas Cassali

Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Ana Luiza Chaves Maia

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Farmacotécnica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

MSc. Eduardo Burgarelli Lages

Dep. de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

MSc. Juliana de Oliveira Silva

Dep. de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico esse trabalho àqueles que sempre
estiveram ao meu lado,
Minha mãe, meu pai *in memoria*,
meus irmãos e ao meu marido.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado os meus passos até aqui. À minha mãe pelo apoio incondicional e por estar sempre ao meu lado, me cobrindo com seus cuidados e com suas orações. Ao meu pai, que não está mais entre nós, mas deixou seus ensinamentos e sei que estaria muito feliz por mim. Aos meus irmãos, Alessandra, Ricardo e Renata pela amizade, incentivo e pelos conselhos, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Aos meus sobrinhos Marvim, Vanessa, Rafael, Eduardo e Sofia, que só alegram a nossa vida, amo muito vocês. Ao meu namorado Júlio que além de me apoiar com seu companheirismo, sempre me auxiliou durante a minha jornada.

À Professora Elaine Amaral Leite, pela dedicação, competência e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho, tenho você como um exemplo de orientadora e de pessoa, serei sempre grata por tudo. Ao meu coorientador André Branco de Barros, seu papel foi fundamental para esse trabalho. Aos professores colaboradores Ângelo Malaquias, Cristiane Giubert, Ricardo José Alves e Geovanni Cassali, pelo suporte ao longo do desenvolvimento do trabalho. A todos os colegas do LTF, pela ajuda, incentivos e bons momentos compartilhados. Em especial à Ana Luiza Chaves Maia, Eduardo Burgarelli, Jaqueline, Eliza e Juliana de Oliveira, pela boa convivência, companheirismo e por sempre compartilharem conhecimento.

Aos funcionários da UFMG, em especial à Nazaré, Jamil e Marton pela ajuda constante.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira compartilharam desse momento, contribuindo para que eu realizasse esta pesquisa.

RESUMO

A administração continuada de cisplatina (CDDP), quimioterápico usado no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, é limitada em função de reações adversas, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, mielotoxicidade e ototoxicidade. Na tentativa de contornar esses inconvenientes e melhorar o índice terapêutico da CDDP, modificações farmacotécnicas têm sido propostas, como a encapsulação da CDDP em sistemas de liberação de fármacos, tais como os lipossomas. Nesse sentido, foi proposto o desenvolvimento de lipossomas termossensíveis de cisplatina não funcionalizado (LTS-CDDP), funcionalizado com ácido hialurônico (AH) por interação eletrostática (LTS-CDDP-AH-1) e funcionalizado com AH por ligação covalente (LTS-CDDP-AH-2), no intuito de proporcionar um direcionamento ativo para a região tumoral. Inicialmente foi realizado um estudo de caracterização das formulações desenvolvidas, por meio da associação das técnicas espalhamento dinâmico da luz (DLS), microcalorimetria e espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS). A taxa de encapsulação de CDDP foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência por um método de derivatização com dietilditiocarbamato. Em seguida, foi avaliada a citotoxicidade frente as células tumorais MDA-MB-231, bem como a toxicidade *in vivo* em camundongos Swiss sadios. Os resultados de caracterização mostraram diâmetro médio menor que 200 nm e índice de polidispersão (PDI) sugestivos de formulações homogêneas ($< 0,2$), indicando a ausência de agregação de vesículas mesmo após funcionalização com AH. A eficiência do revestimento na superfície do lipossoma foi atribuída a valores de potencial zeta próximos da neutralidade. Os dados de DLS mostraram uma redução significativa no diâmetro médio e contagem de partículas (Kcps) das formulações avaliadas a 40°C, e o revestimento com AH não alterou a temperatura de transição de fase das formulações. A encapsulação de CDDP foi de $9,3 \pm 0,7\%$ para LTS-CDDP-AH-2, $16,1 \pm 1,9\%$ para LTS-CDDP-AH-1 e $13,7 \pm 0,9\%$ para LTS-CDDP. O perfil obtido por SAXS para todas as formulações estudadas foi característico de uma organização lamelar independente da temperatura avaliada e apresentou dilatação da bicamada, causada por desorganização na estrutura dos lipídeos, confirmando a alteração conformacional devido ao aquecimento. No entanto, o perfil de liberação *in vitro* sugeriu uma possível adsorção do fármaco na bicamada fosfolipídica ocasionando uma taxa de difusão de CDDP antes de atingir a T_c (42°C), para LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-2. Para o LTS-CDDP-AH-1, a presença do polímero pode estar modulando essa difusão, gerando um perfil de liberação mais controlado e lento. Os resultados biológicos mostraram que LTS-CDDP

apresentou maior citotoxicidade quando comparado com CDDP livre, além de levar ao aumento da ocorrência de senescência. O uso de hipertermia nos grupos tratados com LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1 aumentou a ocorrência de apoptose em relação aos grupos sem hipertermia. No estudo *in vivo*, foi observado maior toxicidade da formulação catiônica para células saudáveis, sendo observado a ocorrência de nefrotoxicidade nos animais tratados com LTS-CDDP. Enquanto que, com o uso do ligante AH, os efeitos adversos conhecidos relacionados ao uso de CDDP foram eliminados, uma vez que os animais tratados com essa formulação não apresentaram alterações significativas nos exames hematológicos e bioquímicos, bem como nas análises histológicas. Sendo assim, a formulação de CDDP proposta, termossensível e contendo AH por interação eletrostática, apresenta características adequadas para tratamento do câncer por via intravenosa, em associação com hipertermia moderada, podendo ser capaz de reduzir a toxicidade relacionada a CDDP, representando uma alternativa potencial para veiculação desse fármaco.

Palavras-Chave: lipossoma termossensível; ácido hialurônico; cisplatina; direcionamento ativo.

ABSTRACT

The continuous administration of cisplatin (CDDP), a chemotherapeutic agent used to treat various types of solid tumors, is limited due to adverse reactions, such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity, myelotoxicity, and ototoxicity. In an attempt to circumvent these inconveniences and improve the therapeutic index of CDDP, pharmacotechnical modifications have been proposed, such as the encapsulation of CDDP in drug delivery systems, like liposomes. In this sense, it was proposed to develop a thermosensitive liposome of non-functionalized cisplatin (TSL-CDDP), functionalized with hyaluronic acid (HA) by electrostatic interaction (TSL-CDDP-HA-1) and functionalized with HA by covalent bond (TSL-CDDP-SA-HA-2), in order to provide an active targeting for the tumor region. Initially, a detailed study was carried out to characterize the formulations developed, through the association of dynamic light scattering (DLS), microcalorimetry, and low angle X-ray scattering (SAXS) techniques. The CDDP encapsulation rate was evaluated by high performance liquid chromatography using a diethyldithiocarbamate derivatization method. Then, cytotoxicity against MDA-MB-231 tumor cells was evaluated, as well as *in vivo* toxicity in healthy Swiss mice. The characterization results showed an average diameter less than 200 nm and a polydispersity index (PDI) suggestive of homogeneous formulations (< 0.2), indicating the absence of vesicle aggregation even after functionalization with HA. The efficiency of the HA-coating of liposome was attributed to values of zeta potential close to neutrality. The DLS data showed a significant reduction in the mean diameter and Kcps (Kilo counts per second) of the formulations evaluated at 40°C, and the coating with HA did not alter the phase transition temperature of the formulations. CDDP encapsulation was $9.3 \pm 0.7\%$ for TSL-CDDP-SA-HA, $16.1 \pm 1.9\%$ for TSL-CDDP-HA and $13.7 \pm 0.9\%$ for TSL-CDDP. The profile obtained by SAXS for all the formulations studied was characteristic of a lamellar organization independent of the evaluated temperature and presented dilation of the bilayer, caused by disorganization in the lipid structure, confirming the conformational alteration due to heating. However, the *in vitro* release profile suggested possible drug adsorption in the phospholipid bilayer causing a diffusion rate of CDDP before reaching T_c (42°C), for TSL-CDDP and TSL-CDDP-SA-HA. For TSL-CDDP-HA, the presence of the polymer may be modulating this diffusion, generating a more controlled and slower release profile. The biological results showed that TSL-CDDP have greater cytotoxicity when compared to free CDDP, in addition to leading to an increase in the occurrence of senescence. The use of

hyperthermia in the groups treated with LTS-CDDP and LTS-CDDP-HA increased the occurrence of apoptosis compared to groups without hyperthermia. In the *in vivo* study, greater toxicity of the cationic formulation was observed for healthy cells, with the occurrence of nephrotoxicity in animals treated with LTS-CDDP. While, with the use of the HA ligand, the known adverse effects related to the use of CDDP were eliminated, since the animals treated with this formulation did not show significant changes in hematological and biochemical tests, as well as in histological analyzes. Thus, the proposed formulation of CDDP, thermosensitive and containing HA by electrostatic interaction, has adequate characteristics for cancer treatment intravenously, in association with moderate hyperthermia, and may be able to reduce CDDP-related toxicity, representing a potential alternative for the delivery of this drug.

Keywords: thermosensitive liposome; hyaluronic acid; cisplatin; active targeting.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔH	Do inglês, <i>enthalpy of transition</i>
ΔH_v	Do inglês, <i>van't Hoff enthalpy</i>
AH	Ácido hialurônico
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis of Variance</i>)
CD44	Cluster de receptores de diferenciação 44
CDDP	Cisplatina
CHEMS	Hemisuccinato de Colesterila
CHOL	Colesterol
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
CPP	Peptídeo de penetração celular
C _p	Capacidade calorífica
Cu	Do inglês, <i>cooperative unit</i>
DAD	Do inglês, <i>diode array detector</i>
DDTC	Do inglês, <i>Sodium diethyldithiocarbamate</i>
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento dinâmico da luz (do inglês, <i>Dynamic light scattering</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DOTAP	1,2-Dioleoiloxi-3-trimetilamonio propano
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DPPE	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DPPG2	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês, <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DSPE	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPE-PEG	1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina associada a polietilenoglicol
EP	Do inglês, <i>encapsulation percentage</i>
EPC	Fosfatidilcolina de ovo
EPR	Efeito de permeação e retenção aumentado (do inglês, <i>Enhanced Permeability and Retention</i>)

FBS	Soro fetal bovino (do inglês, <i>Fetal bovine serum</i>)
Gd-DTPA	Gadopentetato de dimeglumina
GLcUA	Ácido <i>D</i> -glicurônico
GLcNAc	<i>N</i> -acetilglicosamina
HBS	Salina tamponada com Hepes
HIFU	Ultrassom focado de alta intensidade (do inglês, <i>High Intensity Focused Ultrasound</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high-performance liquid chromatography</i>)
HSPC	Fosfatidilcolina de soja
HT	Hipertermia
IV	Intravenoso
Kcps	Contagem de kilo por segundo (do inglês, <i>Kilo counts per second</i>)
L α	Fase líquida cristalina
L β	Fase lamelar gel ordenado
LTS	Lipossoma Termossensível
LTS-CDDP	Lipossoma termossensível de cisplatina
LTS-CDDP-AH-1	Lipossoma termossensível de cisplatina funcionalizado com ácido hialurônico por interação eletrostática
LTS-CDDP-AH-2	Lipossoma termossensível de cisplatina funcionalizado com ácido hialurônico por ligação covalente
LUV	Vesículas unilamelares grandes (do inglês <i>Large Unilamellar Vesicle</i>)
M ²⁺	Íons metálicos
MLV	Vesículas multilamelares (MLV, do inglês <i>Multilamellar Vesicle</i>)
MPPC	1-Miristoil-2-palmitol-sn-glicero-3-fosfocolina
MR-HIFU	Ultrassom focado de alta intensidade guiado por ressonância magnética (do inglês, <i>High Intensity Focused Ultrasound guided by magnetic resonance</i>)
MSPC	1-Miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
PDI	Índice de polidispersão (do inglês, <i>polidispersion index</i>)
PEG	Polietilenoglicol
r	Coefficiente de correlação

REV	Evaporação em fase reversa (do inglês, <i>Reverse-phase Evaporation</i>)
RFA	Radiofrequência
SA	Estearilamina
SAXS	Espalhamento de raio-X de baixo ângulo (do inglês, <i>Small-angle X-ray Scattering</i>)
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SUV	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês <i>Small Unilamellar Vesicle</i>)
Tc	Temperatura de transição de fase
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo, do inglês <i>Triple-negative Breast Cancer</i>

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Estrutura química da cisplatina.....	29
Figura 2: Representação esquemática de um lipossoma encapsulando fármaco hidrofílico no interior aquoso e hidrofóbico na região da bicamada.....	31
Figura 3: Esquema representativo da transição de fase (T_c) da membrana lipídica, dependente da temperatura.....	34
Figura 4: Mecanismo de liberação do fármaco após aquecimento focado. Em A, lipossomas (círculos azuis) atravessam os poros nas paredes dos vasos tumorais. B, HT aumenta o tamanho do poro do tumor e, portanto, aumenta extravasamento de lipossomas tumorais. C, HT pode desencadear liberação de droga (amarelo) a partir de lipossomas no vaso tumoral. D, HT pode desencadear a liberação fármaco no interstício do tumor. E, HT pode ser diretamente citotóxico para células tumorais.....	36
Figura 5: Estrutura química do ácido hialurônico.....	39
Figura 6: Representação esquemática da internalização de lipossomas revestidos com AH em tumores que superexpressam receptores CD44. Em I) acúmulo de lipossoma no tumor devido ao direcionamento ativo conferido pela presença do AH; II) internalização mediada por CD44 e degradação de AH por HAase sobre-expressa na matriz extracelular do tumor e endolisossomas; III) escape endo-lisossomal do lipossoma; IV) liberação do fármaco.....	40

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

Figure 1: Infrared spectra. (a) Stearylamine, (b) hyaluronic acid, (c) SA-HA.....	55
Figure 2: Mean diameter and PDI (a), and zeta potential (b) of thermosensitive liposomes made of DPPC:CHOL:SA at molar ratio 90:5:5 (TSL-90) and 95:2.5:2.5 (TSL-95).....	56
Figure 3: Variation of mean diameter (bars) and particle count rate (lines and points) of TSL-90 (a) and TSL-95 (b) as a function of DLS heating. DSC curves of the formulations TSL-90 (c) and TSL-95 (d).....	56
Figure 4: Microcalorimetry curve of formulation TSL-HA (a) and TSL-SA-HA (b).....	59
Figure 5: Upper panels: SAXS patterns of TSL, TSL-HA, and TSL-SA-HA obtained at different temperatures. The indexes represent Bragg reflections corresponding to lamellar phases. Lower panels: Intensity profile as a function of the scattering vector (Q) obtained from	

the first-order peak. The arrows indicate intensity increase (\uparrow), and peak narrowing ($\rightarrow\leftarrow$).....	61
Figure 6: Peak intensity (normalized) and domain size as a function of the temperature extracted from measured positions of peaks 1 and 4 of Fig 4. Dashed lines connecting the data points are guides to the eyes only.....	61
Figure 7: SAXS intensity profile as a function of the scattering vector modulus q of liposomes with CDDP.....	62
Figure 8: Peak intensity, domain size, and lattice spacing as a function of the temperature extracted from peaks 1 and 4 of liposomes containing CDDP and HA.....	63
Figure 9: SAXS patterns of anhydrous samples, obtained at 37°C. (a) DPPC (b) DPPC:CHOL (c) DPPC:CHOL:SA (d) DPPC:CHOL:SA:HA (e) DPPC:CHOL:AS:SA-HA (f) DPPC:CHOL:SA CDDP (g) DPPC:CHOL:SA CDDP HA (h) DPPC:CHOL:AS:SA-HA CDDP.....	63
Figure 10: SAXS intensity profile as a function of the scattering vector modulus q and Peak intensity as a function of the temperature, of DPPC:CHOL:SA anhydrous sample.....	64
Figure 11: Peak intensity and domain size as a function of the temperature extracted from peaks 1 and 1 high Q of anhydrous samples containing CDDP and HA.....	65
Figure 12: Temperature-dependent CDDP release from TSL-CDDP, TSL-CDDP-HA, and TSL-CDDP-SA-HA.....	66

CAPÍTULO II

Figura 1: Viabilidade celular de MDA-MB-231 após tratamento com as diferentes formulações (a) Sem HT e (b) com HT.....	80
Figura 2: Viabilidade celular de MDA-MB-231 após tratamento com as diferentes formulações sem HT, nas concentrações de 12,5; 25 e 100 μ M	81
Figura 3: Imagens de microscopia em campo claro, objetiva 20x, após 48h de tratamento com a formulação LTS-CDDP-AH-1, com e sem HT.....	82
Figura 4: Imagens de fluorescência de núcleos da linhagem celular MDA-MB-231 corados com Hoescht obtidas após 48h dos diferentes tratamentos na IC_{50} de cada formulação. Os diferentes fenótipos morfométricos observados são indicados. As imagens são representativas de três experimentos independentes. N, normal; LR, grande regular; SR, pequeno regular.....	83

Figura 5: Distribuição morfométrica nuclear da linhagem celular MDA-MB-231 exposta a CI_{50} de diferentes tratamentos por 48 h.....	84
Figura 6: Variação de peso dos camundongos ao longo dos 14 dias de experimento.....	85
Figura 7: Fitomicrografia de fígado, baço, intestino e medula óssea de camundongos Swiss tratados com NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1. Coloração de Hematoxilina & eosina. Aumento de 20x.....	88
Figura 8: Fitomicrografias de rim de camundongos Swiss tratados com NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1. Seta indica espessamento da capsula de Bowman, o asterisco indica infiltrado inflamatório e fibrose. Coloração de Hematoxilina & eosina. Aumento de 40x.....	88

DISCUSSÃO GERAL

Figura 1: Resumo dos principais resultados obtidos nesse estudo.....	97
---	----

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1: Estudos pré-clínicos usando hipertermia e lipossomas termosensíveis.....	35
Tabela 2: Estudos utilizando temperatura e direcionamento ativo para tratamento do câncer.....	38
Tabela 3: Estudos <i>in vivo</i> utilizando hipertermia e lipossomas termosensíveis.....	43
Tabela 4: Estudos pré-clínicos de lipossomas de cisplatina responsivos a estímulos.....	44

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

Table 1. Thermotropic parameters obtained from the DSC of TSL-90 and TSL-95.....	57
Tabela 2: Variation in mean diameter, polydispersity index, and zeta potential of the TSL-95 formulation and its variations.....	58
Tabela 3: Characterization of the formulation with CDDP.....	60

CAPÍTULO II

Tabela 1: Caracterização dos lipossomas termosensíveis de cisplatina.....	78
Tabela 2: CI_{50} e intervalo de confiança em linhagens de célula MDA-MB-231.....	81
Tabela 3: Mortalidade dos camundongos ao longo dos 14 dias de experimento.....	85
Tabela 4: Parâmetros hematológicos dos camundongos Swiss tratados com salina, LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1 e CDDP livre.....	86
Tabela 5: Parâmetros bioquímicos dos camundongos Swiss tratados com salina, LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1 e CDDP livre.....	86

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivos gerais.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
3.1 Ocorrência e fisiopatologia do câncer.....	27
3.2 Cisplatina no tratamento do câncer.....	29
3.3 Lipossomas como carreadores de fármacos.....	31
3.3.1 <i>Lipossomas termossensíveis como carreadores de fármacos</i>	33
3.3.2 <i>Lipossomas funcionalizados para direcionamento ativo</i>	37
3.4 Hipertermia no tratamento do câncer.....	41
3.5 Lipossomas de cisplatina.....	43
TRABALHO EXPERIMENTAL.....	46
CAPÍTULO I: THERMOSENSITIVE LIPOSOMES CONTAINING CISPLATIN FUNCTIONALIZED BY HYALURONIC ACID: PREPARATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION.....	46
ABSTRACT.....	47
1 INTRODUCTION.....	48
2 MATERIALS AND METHODS.....	49
2.1 Materials.....	49
2.2 Stearylamine-Hyaluronic acid synthesis and TSL-SA-HA, TSL-CDDP-SA-HA preparation.....	49
2.3 Preparation of Thermosensitive liposomes (TSL).....	50
2.4 Physicochemical and Thermal Characterization.....	51
2.4.1 <i>Mean Diameter, Polydispersity Index, and Zeta Potential Analysis</i>	51

2.4.2 <i>Thermal proprieties analyses</i>	52
2.4.3 <i>Drug encapsulation efficiency</i>	52
2.4.4 <i>Small-angle X-ray scattering (SAXS)</i>	53
2.5 <i>In vitro</i> release analyses.....	53
2.6 Statistical analysis	54
3 RESULTS	54
3.1 Stearylamine-Hyaluronic acid synthesis	54
3.2 Characterization of TSL	55
3.2.1 <i>Mean Diameter, Polydispersity Index, and Zeta Potential</i>	55
3.2.2 <i>Thermal properties analyses</i>	56
3.2.3 <i>HA functionalization - physicochemical and thermal characterization</i>	57
3.2.4 <i>Drug encapsulation efficiency</i>	59
3.2.5 <i>Small-angle X-ray scattering (SAXS)</i>	60
3.3 <i>In vitro</i> release analyses.....	65
4 DISCUSSION	66
5 CONCLUSIONS	69
ACKNOWLEDGMENTS	69
CAPÍTULO 2: LIPOSSOMA TERMOSENSÍVEL DE CISPLATINA FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	71
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 Material.....	74
2.2 Preparo dos lipossomas termosensíveis de cisplatina (LTS-CDDP)	74
2.3 Caracterização	74
2.3.1 <i>Determinação do diâmetro e potencial zeta</i>	74
2.3.2 <i>Teor de encapsulação de cisplatina</i>	75
2.4 Experimentação <i>in vitro</i>	75

2.4.1 Cultura celular	75
2.4.2 Viabilidade celular in vitro	76
2.4.3 Análise da Morfologia nuclear	76
2.5 Experimentação in vivo	77
2.5.1 Estudo de toxicidade in vivo	77
2.5.2 Avaliação histopatológica	77
2.6 Análise estatística	78
3 RESULTADOS	78
3.1 Caracterização	78
3.1.1 Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e EP	78
3.2 Experimentação in vitro	79
3.2.1 Viabilidade celular in vitro	79
3.2.2 Análise da Morfologia nuclear	82
3.3 Estudo de toxicidade in vivo	84
3.3.1 Avaliação dos sinais clínicos, peso e mortalidade dos animais	84
3.3.2 Investigação hematológica	85
3.3.3 Investigação bioquímica	86
3.3.4 Investigação histopatológica	87
4 DISCUSSÃO	88
5 CONCLUSÃO	91
DISCUSSÃO GERAL	93
CONCLUSÃO GERAL	97
PERSPECTIVAS	98
BIBLIOGRAFIA	99
ANEXO I	109
ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO .	109

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O câncer se tornou um problema de saúde pública no mundo e vem aumentando cada vez mais devido ao envelhecimento, crescimento populacional, como também pelo aumento nos fatores de risco associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2020). A quimioterapia, dentre as modalidades de tratamento disponíveis, é amplamente utilizada para todos os tipos de câncer. No entanto, é reconhecida pelos efeitos adversos que acometem os pacientes, sendo um dos principais motivos de morbidade resultando, muitas vezes, em abandono do tratamento (Wakiuchi et al., 2019). A cisplatina (CDDP), fármaco antitumoral largamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, possui seu uso limitado devido à grande quantidade de efeitos adversos, os quais incluem principalmente nefrotoxicidade aguda e neurotoxicidade crônica (Dasari & Paul Bernard, 2014). É bem descrito que a encapsulação de fármacos anticâncer pode melhorar seu índice terapêutico, aumentando sua concentração na região do tumor e diminuindo os efeitos colaterais tóxicos (Alavizadeh et al., 2017; Bulbake et al., 2017; White et al., 2006). Nesse cenário, os lipossomas têm sido investigados extensivamente para a distribuição tumoral de vários fármacos citotóxicos, como doxorubicina, paclitaxel e CDDP.

Levando em consideração as limitações do uso de lipossomas convencionais, os lipossomas responsivos a estímulos externos têm sido muito estudados (Shi et al., 2017). Em particular os lipossomas termossensíveis (LTS) associados à hipertermia (HT), aquecimento da região tumoral, têm se mostrado uma ferramenta promissora para a administração de fármacos, uma vez que o aquecimento leva a um aumento da permeabilidade vascular do tumor e favorece a liberação do fármaco para o interstício (Gomes et al., 2019; Ta & Porter, 2013). Esses sistemas são compostos de misturas de fosfolípidios que passam por uma transição da fase gel para líquido cristalino em resposta ao aquecimento. Após o aumento da temperatura, a mobilidade dos lípides aumenta gradualmente e, à medida que a temperatura está próxima da temperatura de transição de fase (T_c), a membrana se torna altamente permeável causando a liberação do fármaco (Ta & Porter, 2013).

Além disso, a combinação do mecanismo de liberação termossensível com o direcionamento tumoral do lipossoma pode potencializar a seletividade do sistema. A principal abordagem nessa área é funcionalizar lipossomas com moléculas específicas de ligação celular (Riaz et al., 2018). Sabe-se que *cluster* de receptores de diferenciação 44 (CD44) são superexpressos em vários tipos de tumores humanos, incluindo câncer de mama (Almalik et al.,

2013; Sheridan et al., 2006). Esse fato faz do ácido hialurônico (AH), um ligante para CD44, uma estratégia interessante para alcançar maior acúmulo na região do tumor.

Portanto, este estudo teve como objetivo desenvolver um LTS funcionalizado por AH por duas diferentes estratégias, interação eletrostática e ligação covalente. Os LTS foram compostos por dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), colesterol (CHOL) e estearilamina (SA), com o intuito de encapsular um fármaco hidrofílico, CDDP. Foram realizados estudos de caracterização da formulação, como diâmetro hidrodinâmico (DH), potencial zeta e índice de polidispersão (PDI), porcentagem de encapsulação, bem como a caracterização das propriedades da bicamada lipídica. Sabendo que a composição da membrana é um fator chave para se alcançar o mecanismo de termosensibilidade, as características físico-químicas e térmicas dessa formulação foram estudadas por diferentes técnicas: espalhamento dinâmico da luz (DLS), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difração de raios-X em baixo ângulo (SAXS). Ademais, foram realizados estudos biológicos *in vitro* de viabilidade celular por sulforodamina e de morfologia nuclear por coloração por Hoescht além de um estudo *in vivo* de toxicidade utilizando camundongos Swiss sadios para avaliar o potencial tóxico de cada formulação desenvolvida em comparação com o fármaco livre.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial citotóxico *in vitro* e toxicidade *in vivo* de formulações lipossomais termossensíveis de cisplatina não funcionalizada (LTS-CDDP), funcionalizada com AH por interação eletrostática (LTS-CDDP-AH-1) e funcionalizada com AH por ligação covalente (LTS-CDDP-AH-2).

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver formulações LTS-AH utilizando AH de 4 kDa por meio de interação eletrostática e/ou ligação covalente;
- Caracterizar as formulações, quanto ao diâmetro médio das vesículas, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a termossensibilidade das formulações lipossomais utilizando a técnica de espalhamento dinâmico da luz;
- Caracterizar as formulações por microcalorimetria a fim de determinar a Tc dos lipossomas;
- Avaliar o teor de encapsulação de CDDP;
- Avaliar a termossensibilidade das formulações contendo o fármaco, por SAXS;
- Realizar estudos *in vitro* de citotoxicidade em células de câncer de mama triplo negativo, MDA-MB-231;
- Realizar estudos *in vitro* de morfologia nuclear em MDA-MB-231;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* em camundongos Swiss fêmeas sadias.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocorrência e fisiopatologia do câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem como característica principal o crescimento desordenado de células que tendem a ser muito agressivas e, invadem tecidos e órgãos (INCA, 2020). O câncer é atualmente o principal problema de saúde pública no mundo e está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. Esse problema vem aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento, pelo crescimento populacional, como também pelo aumento nos fatores de risco, principalmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (INCA, 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou no dia mundial do câncer (4 de fevereiro de 2020) um novo relatório global sobre essa doença. Segundo esse documento, o número de novos casos previstos até 2040, aumentará para cerca de 29 a 37 milhões, com os maiores aumentos nos países de baixa e média renda (WHO, 2020). Para o Brasil, a estimativa global aponta a ocorrência de 685 mil casos novos para os anos de 2020 – 2022. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2020). Em especial para o câncer de mama, estima-se 66.280 novos casos para 2021. Sabe-se que este não tem uma única causa, sendo a idade um dos fatores mais importantes de risco para a doença (cerca de quatro em cada cinco casos ocorre após os 50 anos). Outros fatores que aumentam o risco inclui os fatores ambientais como sedentarismo, obesidade e consumo de bebida alcoólica, além de fatores relacionados a história reprodutiva e hormonal, bem como fatores genéticos e hereditários (INCA, 2021).

O câncer é considerado uma doença genética causada por mutações em genes específicos. Essas mutações causam uma interrupção em alguma parte essencial da via de sinalização e conferem à célula a capacidade de se dividir de maneira descontrolada e gerar células filhas que preservam essa característica. Posteriormente, essas células acumulam diversas mutações que permitem gerar clones distintos que apresentam maior capacidade de sobrevivência e crescimento, desenvolvendo uma neoplasia maligna (Mitrus et al., 2012). Normalmente, o sistema imunológico pode identificar e destruir células tumorais recém-formadas em um processo denominado imunovigilância do câncer, que funciona como uma importante defesa do organismo. No entanto, mesmo com a existência de um sistema imune vigilante contra o câncer, indivíduos imunocompetentes desenvolvem neoplasias malignas. Surge então o conceito de imunoeedição como uma extensão da hipótese de imunovigilância,

propondo que o sistema imune define o fenótipo tumoral e gera tumores que, quando atingem o estágio clinicamente detectável, já não despertam respostas efetivas do sistema imune (Torrezine & Athanazio, 2008; Vesely et al., 2011). Esse processo ocorre em três fases distintas: 1) fase de eliminação, que corresponde à imunovigilância; 2) fase de equilíbrio, quando as células imunes e tumorais sobreviventes entram num equilíbrio dinâmico, embora a neoplasia possa ser reativada a partir da imunossupressão e, 3) fase de escape das células tumorais e consequente progressão do tumor (Torrezine & Athanazio, 2008). Nesse contexto, o entendimento dos mecanismos de progressão tumoral, especialmente das neoplasias em estágios avançados, é importante para a escolha adequada de estratégias de tratamento.

Sabe-se que o tratamento do câncer pode ser feito por cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea e a escolha é dependente do tipo e estado do tumor. Na maioria dos casos é necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento (INCA, 2020). Com relação ao transplante de medula óssea, essa modalidade é proposta especificamente para as doenças que afetam as células do sangue, como leucemias e os linfomas, e consiste na substituição de uma medula óssea doente por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma medula saudável (INCA, 2020; Oncoguia, 2018).

A cirurgia pode ser indicada, de forma curativa, quando há identificação precoce do tumor, podendo haver a retirada total do mesmo, ou de forma paliativa quando o objetivo é reduzir a quantidade de células tumorais ou controlar sintomas que comprometam a qualidade da sobrevivência do paciente (INCA, 2020).

O tratamento com radioterapia utiliza radiações ionizantes para destruir ou impedir a proliferação das células tumorais. No entanto, alguns efeitos colaterais dessa modalidade de tratamento estão diretamente relacionados com a área do corpo tratada, a dose administrada e a capacidade das células saudáveis em reparar o dano (INCA, 2020).

Quando os tumores se encontram em estágios mais avançados e apresentam micrometástases, a escolha por um tratamento sistêmico utilizando fármacos quimioterápicos é comumente realizada. O foco principal dessa modalidade de tratamento é a destruição das células neoplásicas, entretanto, é reconhecida pelos inúmeros efeitos adversos que acometem os pacientes (Wakiuchi et al., 2019). É um tipo de tratamento em que se utilizam medicamentos administrados tanto por via oral como por via intravenosa, porém os fármacos estão associados à baixa especificidade, susceptibilidade à resistência, elevada toxicidade e direcionamento ineficiente aos tecidos e órgãos alvos, podendo causar danos às células saudáveis (INCA, 2020;

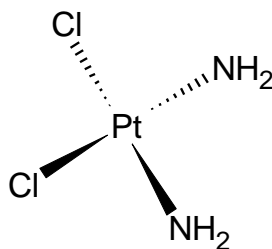
Nurgali et al., 2018). Os principais efeitos colaterais associados a esse tipo de tratamento são complicações neurológicas, cardiovasculares, respiratórias e gástricas, sendo as náuseas e vômitos os efeitos mais comuns e temidos pelos pacientes (Nurgali et al., 2018). Outro efeito comum é a neuropatia periférica induzida pela quimioterapia (NPIQ), caracterizada por formigamento, dormência, pontada ou ardência bem como aumento da sensibilidade à temperatura, acometendo geralmente as mãos e os pés, e atinge gradualmente braços e pernas (Oncoguia, 2018). A NPIQ de longo prazo está associada à alta morbidade, incluindo depressão, ataxia e insônia (Nurgali et al., 2018). Nesse contexto, um dos grandes desafios enfrentados na quimioterapia do câncer é o desenvolvimento de agentes antineoplásicos e/ou formulações farmacêuticas que apresentem baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral.

3.2 Cisplatina no tratamento do câncer

A cisplatina (CDDP) é um fármaco antitumoral muito utilizado principalmente em combinação com outros fármacos como tratamento de primeira escolha contra vários tipos de tumores sólidos, incluindo câncer testicular, carcinoma de ovário e mama, câncer de cabeça e pescoço e câncer de pulmão (Amidi et al., 2017; Bae et al., 2017; Snee, 2018). Apesar da sua aplicação em vários tipos de tumor, desde sua descoberta em 1965 por Rosenberg vem sendo amplamente estudada também para o tratamento do câncer de mama. Já foi usada em altas doses em ensaios com pacientes para o tratamento de câncer de mama metastático, com taxas de resposta de aproximadamente 50% quando administrada por quatro dias a cada 3 semanas (Sledge et al., 1988). Atualmente tem sido estudado os subtipos de câncer de mama triplo negativo resistentes a esse quimioterápico (Hill et al., 2019).

Quimicamente, a CDDP é o cis-diaminodicloroplatina (II), um complexo inorgânico de configuração planar formado por um átomo de platina ligado a dois átomos de cloro e dois grupos amino na posição *cis* do plano (**Figura 1**).

Figura 1: Estrutura química da cisplatina



O principal mecanismo de ação da CDDP está relacionado com a inibição seletiva da síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA). No citoplasma os átomos de cloro são deslocados por moléculas de água, formando um eletrólito potente. Assim, a CDDP hidrolisada se liga aos resíduos de purina (N7 da guanina e N3 da adenina), causando danos ao DNA das células cancerígenas, bloqueando a divisão celular e levando a apoptose (Jamieson & Lippard, 1999). Além disso, a CDDP também induz espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a morte celular, além de danos ao DNA. A formação de espécies reativas de oxigênio depende da concentração de CDDP e do tempo de exposição (Saad et al., 2004). Além desses mecanismos, a CDDP atua ainda na modulação da sinalização de cálcio, uma vez que sob baixas concentrações de íons cloreto intracelular, sofre hidrólise formando espécies que são 1.000 vezes mais reativas e atuam por meio da inibição da respiração mitocondrial ao interferir na fosforilação oxidativa. Isso resulta em um efluxo de cálcio das mitocôndrias e em um aumento temporário dos níveis celulares de cálcio, que desempenha um papel significativo na função celular (Dasari & Paul Bernard, 2014).

No entanto, a administração continuada deste quimioterápico é limitada em função de reações adversas, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, mielotoxicidade e ototoxicidade. Sabe-se que os efeitos terapêuticos da CDDP são significativamente melhorados com o aumento da dose, no entanto, doses mais altas implicam em maior vulnerabilidade renal, que se manifesta, principalmente, por comprometimento dos túbulos renais e redução da taxa de filtração glomerular (Alam et al., 2015). Uma das principais causas da nefrotoxicidade reside no fato de que os rins são a principal via de excreção para CDDP, sendo que a sua concentração nas células epiteliais tubulares proximais é cerca de 5 vezes a concentração sérica (Dasari & Paul Bernard, 2014; Miller et al., 2010). Estudos mostraram que o receptor Ctr1, responsável por transportar a CDDP para as células também é altamente expresso no rim adulto, especificamente na membrana basolateral do túbulo proximal (Pabla et al., 2009), corroborando também para o maior acúmulo nesse órgão. Além disso, estudos *in vivo* indicam que a CDDP sofre ativação metabólica no rim em um processo mediado pela glutathione-S-transferase, resultando em uma toxina mais potente (Townsend et al., 2009). Sabe-se que a CDDP tem como alvo o DNA nuclear, porém alguns estudos sugerem que alvos mitocondriais também são importantes na mediação da morte celular, e que parece estar relacionado a densidade de mitocôndrias. Esse fato também pode contribuir para o dano renal, uma vez que os túbulos renais proximais exibem uma das maiores densidades de mitocôndrias do rim (Qian et al., 2005). Estudos ainda sugerem uma correlação com os mecanismos de apoptose (Hwa Lee et

al., 2001; Lieberthal et al., 1996), inflamação, fibrogênese e estresse oxidativo (Dasari & Paul Bernard, 2014; Miller et al., 2010).

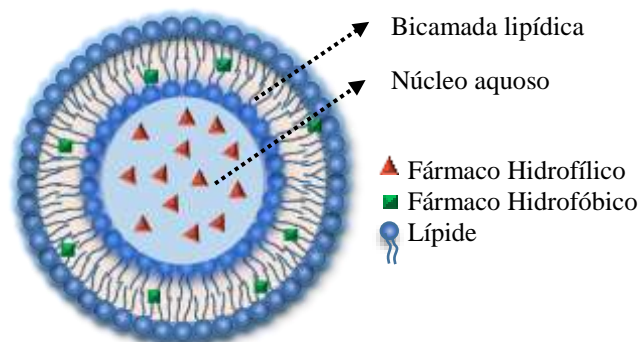
Na tentativa de contornar esses inconvenientes e melhorar o índice terapêutico da CDDP, modificações farmacotécnicas têm sido propostas, como a encapsulação da CDDP em sistemas de liberação de fármacos, tais como os lipossomas (Alavizadeh et al. 2017; Bulbake et al. 2017; White et al. 2006; Leite, et al. 2012; Carvalho et al. 2007; Silva et al. 2017).

3.3 Lipossomas como carreadores de fármacos

Os lipossomas foram descritos pela primeira vez pelo hematologista britânico Dr. Alec D Bangham em 1964, no Instituto Babraham, em Cambridge (Bangham, 1993). São nanopartículas coloidais compostas de lipídeos sintéticos e/ou naturais biocompatíveis, os quais se organizam em bicamadas lipídicas, envolvendo um compartimento aquoso. São formados espontaneamente quando os lipídeos são dispersos em solução aquosa sob agitação (Daraee et al., 2016; Y. Dou et al., 2017). Essas nanoestruturas atuam como veículos de entrega de fármacos e, são grandes o suficiente para escapar da depuração renal, mas pequenos o suficiente para explorar o efeito de permeação e retenção aumentados (EPR), aumentando a biodisponibilidade e reduzindo a toxicidade associadas à administração sistêmica do fármaco livre (Ta & Porter, 2013).

Sua estrutura anfifílica permite encapsular fármacos que apresentem qualquer tipo de polaridade (**Figura 2**). Além disso, suas propriedades (diâmetro médio, lamelaridade, carga, fluidez e superfície) podem ser modificadas por meio da escolha da composição lipídica e do método de preparo (Frézard et al., 2005).

Figura 2: Representação esquemática de um lipossoma encapsulando fármaco hidrofílico no interior aquoso e hidrofóbico na região da bicamada



Esses sistemas podem ser classificados de acordo com o número de bicamadas. Vesículas unilamelares pequenas (SUV, do inglês *Small Unilamellar Vesicle*) apresentam uma

única bicamada lipídica com diâmetro médio entre 25 e 100 nm. Vesículas unilamelares grandes (LUV, do inglês *Large Unilamellar Vesicle*) são compostas por uma bicamada, no entanto possuem diâmetro médio superior a 100 nm. Vesículas multilamelares (MLV, do inglês *Multilamellar Vesicle*) apresentam várias bicamadas concêntricas, cujo diâmetro médio encontra-se na faixa entre 1.000 e 5.000 nm (Caldeira et al., 2013; Lasic, 1998; Vemuri & Rhodes, 1995). Os diferentes tipos de vesícula podem ser obtidos de acordo com a composição e o método de preparo.

Com base no mecanismo de liberação de fármacos e interação com sistemas biológicos, os lipossomas podem ser classificados em: lipossomas convencionais, lipossomas de circulação prolongada e lipossomas polimórficos (Caldeira et al., 2013; Daraee et al., 2016; Maia et al., 2015). Os lipossomas convencionais foram os primeiros a serem desenvolvidos e, são constituídos principalmente por fosfatidilcolinas e colesterol (Bangham, 1993; Batista et al., 2007). No entanto, a principal limitação desses lipossomas está relacionada ao seu curto tempo de circulação. Quando administrados por via intravenosa, são rapidamente reconhecidos pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM). O SFM é uma parte do sistema imune composta por monócitos e macrófagos, localizados no tecido conjuntivo reticular que envolve fígado, baço e medula óssea. Sendo assim, os lipossomas convencionais são rapidamente removidos da corrente sanguínea, devido à captação por células do SFM, portanto, se acumulam preferencialmente em órgãos que compõem esse sistema (Shi et al., 2017).

No entanto, ao longo dos anos, modificações estruturais têm sido realizadas, com o objetivo de aprimorar a eficácia terapêutica desses sistemas. Alterações foram propostas para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas, surgindo assim os chamados lipossomas de circulação prolongada (Klibanov et al., 1990). Esses lipossomas são normalmente revestidos com polietilenoglicol (PEG), um polímero hidrofílico capaz de reduzir a imunogenicidade e prolongar a circulação dessas nanoestruturas (Ta & Porter, 2013). A presença desse polímero gera uma barreira hidrofílica estérica que reduz a adesão e adsorção de componentes do sangue, como imunoglobulinas, proteínas complementares e moléculas similares (Lasic, 1998). Além disso, a utilização de PEG em lipossomas, também pode favorecer um aumento da estabilidade das formulações, impedindo a coalescência das vesículas, por meio de repulsão estérica (Ulrich, 2002). No entanto, estudos mais recentes têm apontado o PEG como a causa de uma inesperada resposta imunológica, o “fenômeno de depuração sanguínea celerada” (efeito ABC). O mecanismo proposto para o fenômeno ABC é que, uma vez que os lipossomas peguados na primeira dose, atingem o baço, as células B reativas são ativadas e há produção de IgM anti-

PEG, que é independente das células T. Na segunda dose, se os anticorpos IgM anti-PEG produzidos em resposta à primeira dose ainda estiverem na circulação sanguínea, se ligam aos lipossomas peguilados com ativação do complemento e estes são capturados por macrófagos do fígado por um mecanismo de endocitose mediada pelo complemento. Sendo assim, os lipossomas peguilados são rapidamente eliminados da circulação sanguínea a partir da segunda dose, sugerindo que esse revestimento não tem sido tão efetivo em manter o tempo de circulação prolongado (Chunling et al., 2015).

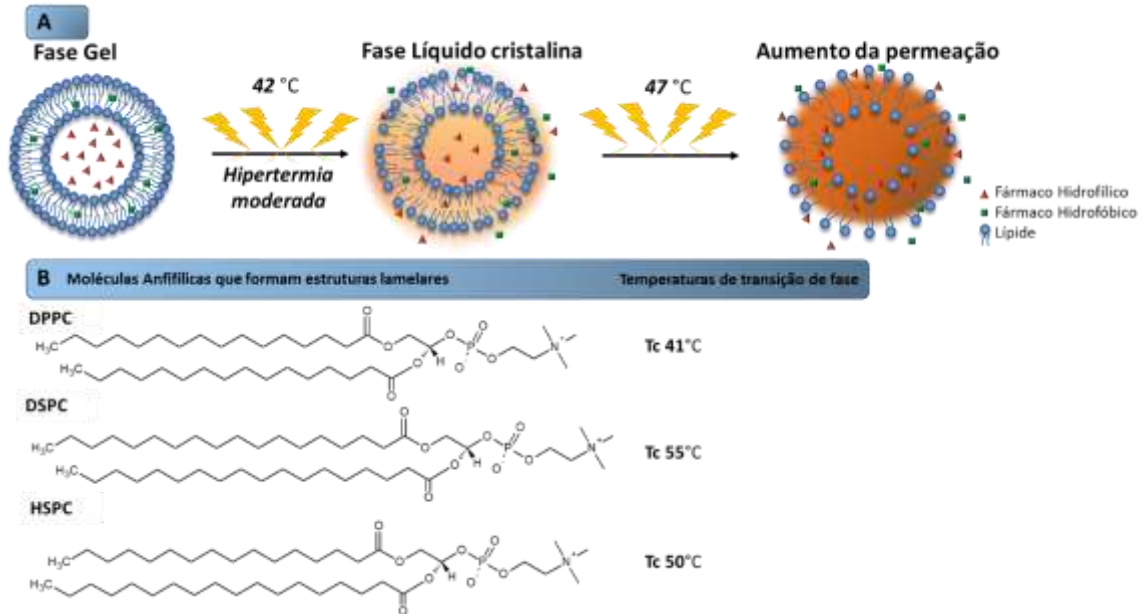
Com relação aos lipossomas polimórficos, esses são sistemas responsivos a um determinado estímulo endógeno, tal como pH (lipossomas pH-sensíveis) e exógeno, como temperatura (lipossomas termosensíveis) (Jing et al., 2015). Com o objetivo de aumentar o efeito terapêutico e reduzir os efeitos colaterais, esses nanocarreadores são projetados para responder a fatores internos, relacionados ao microambiente da região doente, ou a fatores externos, ou ambos, e dessa forma, o fármaco é distribuído seletivamente para a região doente (Hatakeyama, 2017).

3.3.1 Lipossomas termosensíveis como carreadores de fármacos

De maneira geral, os lipossomas termosensíveis são compostos por misturas de fosfolípides que exibem transições da fase gel para a fase líquida cristalina em resposta ao aquecimento (**Figura 3**) (Ta & Porter, 2013). Normalmente, são usados em associação com um aquecimento ligeiramente acima da temperatura corporal, sendo possível realizar hipertermia local (Yatvin et al., 1978).

Na fase gel (chamada de $L\beta$), as moléculas lipídicas são ordenadas e condensadas com cadeias carbônicas totalmente estendidas e são limitadas ao plano bidimensional da membrana. Após o aquecimento, as mobilidades dos grupos de cabeça polar aumentam gradualmente. À medida que a temperatura aumenta e se aproxima da temperatura de transição de fase (T_c), a orientação das ligações simples C-C nas cadeias de hidrocarbonetos começa a mudar de uma configuração *trans* para *gauche*. As regiões de interface começam a se desenvolver e geram incompatibilidade no empacotamento molecular o que torna a membrana altamente permeável nesses locais (Kim, 2007). Essa nova fase é chamada de fase líquida cristalina ou $L\alpha$. Dessa forma, os fármacos encapsulados são liberados da vesícula durante e após a transição de fase.

Figura 3: Mecanismo de liberação de fármacos a partir de lipossomas termossensíveis. (A) Ilustração esquemática do mecanismo de transição de fase dos lipídios que formam a bicamada do lipossoma. O aumento da temperatura acima da temperatura da transição de fase (47 °C) leva a uma maior permeabilidade da bicamada, e, conseqüentemente, a liberação do fármaco é favorecida. (B) Moléculas anfifílicas que formam estruturas lamelares e suas temperaturas de transição de fase (Tc).



Extraído de (Gomes et al., 2019).

Estudos tem abordado o uso de hipertermia leve, conhecida como um aquecimento na região tumoral, como uma terapia adjuvante à radiação e à quimioterapia na terapia antitumoral (Wust et al., 2002). Quando combinada com lipossomas termossensíveis, a HT pode aumentar a eficácia terapêutica por: (i) aumentar a permeabilidade vascular do tumor e, assim, o acúmulo de lipossomas no tumor, e (ii) promover a liberação do fármaco das formulações sensíveis à temperatura para a vasculatura tumoral e interstício tumoral (Ta & Porter, 2013). A **Tabela 1** traz alguns estudos pré-clínicos com o uso de hipertermia associado a lipossomas termossensíveis.

Tabela 1: Estudos pré-clínicos usando hipertermia e lipossomas termosensíveis

Composição	HT	Fármaco	Alvo	Resposta	Referência
DPPC:DSPC: DSPE-PEG ₂₀₀₀ 70:25:5	Banho de água	doxorubicin a	Câncer de mama	Aumento significativo na resposta do tumor ao tratamento com lipossoma e HT	Lokerse et al., 2017
DPPC:DSPC:DPP G ₂ 50:20:30	Laser	doxorubicin a	Sarcoma de tecido mole	Alta captação seletiva de doxorubicina e aumento da sua concentração no tecido tumoral aquecido	Peller et al., 2016
DPPC:DSPC:DPP G ₂ 50:20:30	Laser	doxorubicin a	Sarcoma de tecido mole	Entrega eficaz de doxorubicina por lipossoma nos tumores aquecidos	Willerding et al., 2016
DPPC:DSPC:DPP G ₂ 50:20:30	HIFU	Gemcitabina	Sarcoma de tecido mole	Melhora significativa no retardo do crescimento do tumor	Limmer et al., 2014
DPPC:MSPC:DSP E-PEG ₂₀₀₀ :DSPG 83:3:10:4	Banho de água	Paclitaxel	Câncer de pulmão	Supressão do crescimento do tumor, em comparação com lipossoma não termosensível e fármaco livre	Wang et al., 2016a
DPPC:MSPC:DSP E-PEG ₂₀₀₀ 86:5:4	Radiofr equênci a	Vinorelbina	Tumor de fígado	Acúmulo intratumoral de lipossoma aumentou 15 vezes em comparação com a fármaco livre. Lipossoma + HT levou a uma melhor sobrevida	Wang et al., 2016a

* **HT:** hipertermia; **DPPC:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; **DSPE:** 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **DSPC:** 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocholina; **DPPG₂:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol; **MSPC:** 1-Miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfolina; **PEG:** polietileno glicol.

O acúmulo dessas vesículas na região tumoral depende principalmente da estrutura específica da vasculatura tumoral e de mecanismos de direcionamento, podendo ser aumentada pelo aquecimento do tecido tumoral (**Figura 4**). No entanto, o extravasamento do fármaco a partir da vesícula é o passo limitante e as nanopartículas devem circular durante um determinado período de tempo para se acumularem em concentrações suficientemente altas. Quando se trata de lipossomas que possuem um mecanismo de direcionamento, apenas após o período necessário para acumulação é que se aplica a hipertermia, permitindo assim a liberação do fármaco no interior da célula tumoral, aumentando a especificidade da ação (Kneidl et al., 2014).

Figura 4: Mecanismo de liberação do fármaco após aquecimento focado. Em A, lipossomas (círculos azuis) atravessam os poros nas paredes dos vasos tumorais. B, HT aumenta o tamanho do poro do tumor e, portanto, aumenta extravasamento de lipossomas tumorais. C, HT pode desencadear liberação de droga (amarelo) a partir de lipossomas no vaso tumoral. D, HT pode desencadear a liberação fármaco no interstício do tumor. E, HT pode ser diretamente citotóxico para células tumorais.

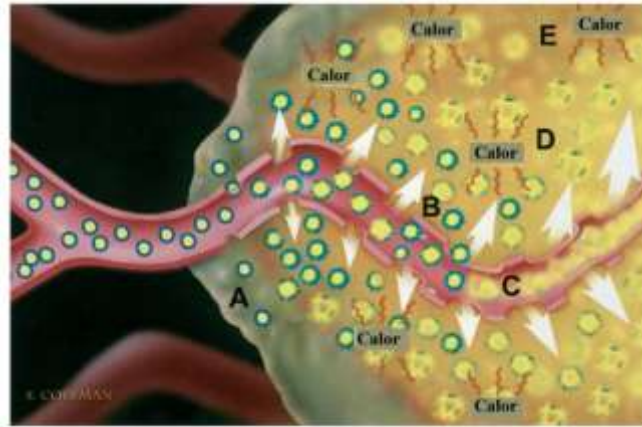


Figura adaptada (Kong et al., 2000)

Inicialmente, as formulações de lipossomas termossensíveis foram baseadas em dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), um fosfolípido com Tc de 41 °C, ideal para combinação com hipertermia leve. Nesse estudo, observou-se que os lipossomas liberaram neomicina e inibiram a síntese proteica de bactérias *in vitro* quando o sistema foi submetido a temperaturas específicas. No entanto, essas formulações foram modificadas ao longo dos anos com o objetivo de contornar limitações, como por exemplo, rápida eliminação da circulação sanguínea e liberação lenta mesmo sob aquecimento, devido a membranas muito rígidas (Yatvin et al., 1978).

Lisofosfolípides, como por exemplo, monopalmitoilfosfatidilcolina (MPPC) e monoestearoilfosfatidilcolina (MSPC), passaram a ser adicionados às formulações termossensíveis com o objetivo de desenvolver uma bicamada menos rígida, com um perfil de liberação mais adequado do conteúdo encapsulado. Isso ocorre porque na Tc, esse tensoativo desestabiliza a bicamada por meio da formação de poros na membrana lipossomal (Kneidl et al., 2014). Estudo desenvolvido por Wang e colaboradores (2016), utilizando lipossomas de MSPC contendo paclitaxel, apresentou um perfil de liberação de até 90% do fármaco após o aquecimento, enquanto que o lipossoma contendo EPC (fosfatidilcolina de ovo), lípido saturado, a taxa de liberação é bem menor (20%) (Wang et al., 2016b).

O colesterol também foi incluído nas formulações termossensíveis ao longo dos anos, devido a sua capacidade de interferir na fluidez da bicamada. Nos lipossomas convencionais, ele é incorporado na bicamada para aumentar a estabilidade dos mesmos. Um estudo realizado

por Sadeghi e colaboradores em 2018, de um lipossoma composto por DPPC:MSPC:CHOL:DSPE-PEG, mostrou que a inclusão de colesterol reduziu a liberação indesejada de doxorubicina a 37°C em solução salina tamponada com Hepes (HBS), bem como no soro fetal bovino (FBS). Por outro lado, a presença do colesterol não influenciou a propriedade de liberação em altas temperaturas (hipertermia moderada). Estes resultados foram corroborados por medidas de DSC. Portanto, os dados indicaram que a inclusão dessa molécula no LTS oferece uma solução simples para o problema de liberação indesejada do fármaco à temperatura fisiológica na corrente sanguínea (Sadeghi et al., 2018).

A primeira e única formulação termossensível de lipossomas em fase de estudo clínico é a ThermoDox®. Essa formulação é composta por DPPC:MSPC:DSPE-PEG2000 (86,5:9,7:3,8) com uma concentração de 2 mg/mL de doxorubicina. Os estudos pré-clínicos dessa formulação foram realizados por Staruch e colaboradores (2015), com o objetivo de determinar se a liberação localizada do fármaco usando doxorubicina lipossomal termossensível (TLD) e hipertermia leve produzida por um sistema clínico de ultrassom focado de alta intensidade de ressonância magnética (MR-HIFU) melhora a eficácia antitumoral em coelhos portadores de tumor Vx2 (carcinoma de células escamosas). Uma única infusão de TLD e hipertermia leve reduziu o crescimento do tumor em comparação aos tumores tratados apenas com TLD (sem hipertermia). Esses achados foram um passo importante para a tradução clínica da entrega localizada de fármacos usando ultrassom focado de alta intensidade guiado por ressonância magnética (MR-HIFU) e TLD (Staruch et al., 2015). O ensaio clínico inicial de fase III que avaliou a combinação de ThermoDox® e aquecimento por radiofrequência (RFA) em comparação com a RFA sozinho, para o tratamento de carcinoma hepatocelular, não obteve progressão de sobrevida. Os motivos para o fracasso do teste de aquecimento foram relacionados a problemas com o delineamento do ensaio clínico, falta de dados pré-clínicos de apoio e melhorias no controle de aquecimento (Y. Dou et al., 2017).

3.3.2 Lipossomas funcionalizados para direcionamento ativo

Uma estratégia usada para promover o direcionamento de fármacos é a funcionalização da superfície dos lipossomas com o uso de ligantes, que exercem um papel fundamental na superação das limitações dos nanocarreadores convencionais. Sabe-se que vários receptores são superexpressos nas células cancerígenas em comparação às células normais. Dessa forma, o direcionamento para esses receptores superexpressos é uma abordagem vital e forma a base do direcionamento ativo, levando a maior captação e acúmulo de agentes anticâncer nas células

tumorais. Várias substâncias podem ser usadas para funcionalizar a superfície dos lipossomas, como anticorpos, peptídeos, aptâmeros, moléculas específicas como ácido hialurônico (AH) e folato (Riaz et al., 2018). Essa abordagem de direcionamento ativo associada ao uso de lipossomas sensíveis a estímulos externos, como a temperatura, pode ser uma alternativa promissora para administração de fármacos antitumorais. A Tabela 2 mostra alguns estudos envolvendo os mecanismos combinados.

Tabela 2: Estudos utilizando temperatura e direcionamento ativo de lipossomas para tratamento do câncer

Ligante	Fármaco	Receptor Alvo	Composição lipídica	Modelo Tumoral	Referência
Anticorpo	Doxorrubicina	MUC1-gene	DPPC:HSPC: DSPE-PEG(2000)	Câncer de mama	Al-Ahmady et al., 2014
Aptâmero	Gd-DTPA	Receptor de nucleolina	DPPC:MSPC: DSPE-PEG(2000)-COOH	Câncer de mama	Zhang et al., 2015
Folato	Doxorrubicina	Receptor de folato	DPPC:DSPE-PEG(2000), DSPE-PEG-Folato	Câncer cervical	Pradhan et al., 2010
Folato	Doxorrubicina	Receptor de folato	DPPC:CHOL:DSPE-PEG-Folato	Câncer de pulmão	Guo et al., 2015
CPP	Doxorrubicina	Célula	DPPC: MSPC: DSPE-PEG	Câncer e mama	Lin et al., 2016

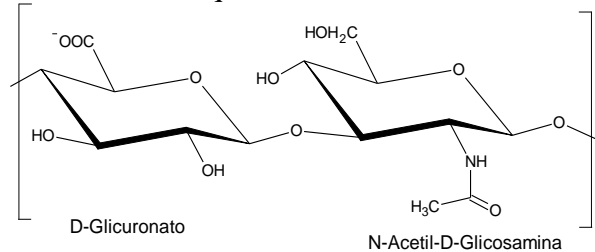
***CPP:** peptídeo de penetração celular; **Gd-DTPA:** Gadopentetato de dimeglumina; **DPPC:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; **DSPE:** 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **MSPC:** 1-Miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfolina; **PEG:** polietilenoglicol.

A funcionalização pode ter como objetivo um direcionamento extracelular, isto é, receptores superexpressos na superfície das células cancerígenas, como por exemplo o receptor *cluster* de diferenciação 44 (CD44) e, um direcionamento intracelular, isto é, receptores superexpressos no citoplasma e núcleo, como por exemplo as tirosina-quinases transmembranares. Níveis elevados desses receptores são vistos em muitos tipos de câncer. Em particular, CD44 é uma proteína receptora superexpressa em muitos tumores, e é um receptor específico para a molécula de AH (Riaz et al., 2018).

O AH é um biopolímero que ocorre naturalmente em organismos vivos (Gasperini et al., 2015), composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido *D*-glicurônico (GlcUA) e *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4 (**Figura 5**). É uma parte integrante da matriz extracelular, e contribui para a lubrificação das

articulações, migração celular durante a morfogênese embrionária, adesão celular, angiogênese, regeneração de tecidos, tráfico de leucócitos e progressão da inflamação (Bhattacharya et al., 2018).

Figura 5: Estrutura química do ácido hialurônico



Esse polímero aniônico é usado para funcionalização da superfície de nanocarreadores no intuito de reduzir a adsorção de proteínas do sangue, aumentando o tempo de circulação, bem como um ligante de direcionamento para o tumor, mediante interação específica com os receptores CD44 que são superexpressos em câncer de mama, ovário, cólon, pulmão e estômago. AH se liga a porção *N* terminal do CD44, que funciona como o local de encaixe e é revestido por uma mistura de aminoácidos principalmente básicos e hidrofóbicos. Os eventos desencadeados pela interação são acionados quando o CD44 reconhece certas frações-chave na cadeia do polímero de AH que incluem interações hidrofóbicas entre o grupo *N*-acetil de AH com o anel fenil de Tyr83, a cadeia lateral de Ile92 e a ligação dissulfeto entre Cys81 e Cys101 de CD44; ligação de hidrogênio mediada por água entre o grupo carboxilato de AH com Tyr46 e Arg45 de CD44 e ligações de hidrogênio entre os dióis vicinais de AH com grupos guanidina de Arg45 e Arg82 de CD44.

Seu comprimento e sua massa molar dependem do número de unidades de dissacarídeos presentes (Kuo, 2005). Qhatal e colaboradores (2014) comprovaram que o tamanho da cadeia de AH exerce influência na atividade biológica, sendo que os lipossomas funcionalizados com AH de elevado peso molecular (175 - 350 kDa) apresentaram eliminação mais rápida em relação aos lipossomas com AH de baixo peso molecular (5 - 8, 50 - 60 kDa) ou lipossomas revestidos com PEG (Qhatal et al., 2014). A **Figura 6** representa o mecanismo de internalização de lipossomas funcionalizados com AH. A via endocítica é o principal mecanismo de captação de agentes biológicos. Esses agentes ficam aprisionados nos endossomos e são degradados por enzimas específicas no lisossomo. Assim, uma etapa limitante para alcançar uma terapia eficaz e garantir a distribuição citosólica do agente biológico é o escape endossomal (Varkouhi et al., 2011). A hialuronidase (HAase) é rica em

matriz extracelular tumoral e endo-lisossomas e tem a função de degradar a camada de AH, permitindo a exposição do lipossoma catiônico. Nos endo-lisossomas, a propriedade catiônica facilita o escape endo-lisossomal e a distribuição citoplasmática do nanossistema (Assanhou et al., 2015; Varkouhi et al., 2011).

Figura 6: Representação esquemática da internalização de lipossomas revestidos com AH em tumores que superexpressam receptores CD44. Em I) acúmulo de lipossoma no tumor devido ao direcionamento ativo conferido pela presença do AH; II) internalização mediada por CD44 e degradação de AH por HAase sobre-expressa na matriz extracelular do tumor e endo-lisossomas; III) escape endo-lisossomal do lipossoma; IV) liberação do fármaco.

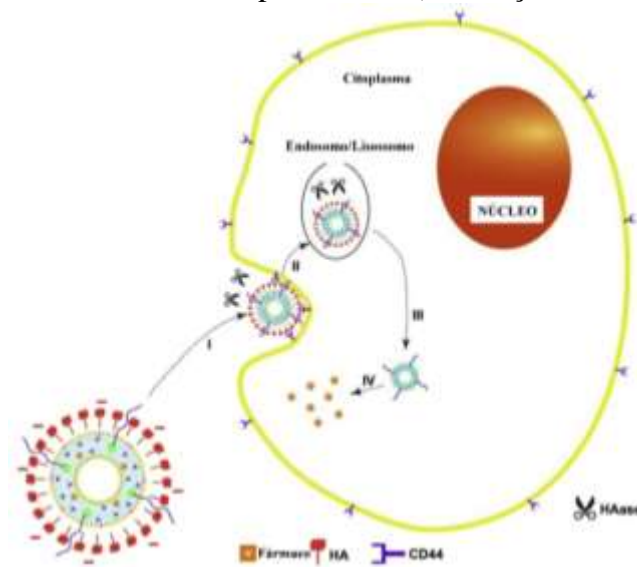


Figura adaptada (Assanhou et al., 2015).

O acoplamento de AH à superfície dos lipossomas pode ser realizado por duas rotas, (i) a derivação química de moléculas para incorporar AH nos fosfolípidos e (ii) o revestimento de nanopartículas catiônicas com AH (Gasperini et al., 2015). No primeiro método, a derivação química pode ser realizada por meio de ligação covalente entre o lípide de interesse e a molécula de AH. Essa ligação ocorre entre os grupos amina dos fosfolípidos e a carboxila do AH, levando em consideração que a carboxila precisa ser inicialmente ativada por uma carbodiimida (Arpicco et al., 2013; Qhattal et al., 2014). No segundo método, a funcionalização do lipossoma ocorre por meio de interação eletrostática entre um lípide catiônico e os grupos ionizáveis do AH. Nesse caso, após a formação das vesículas, essas são incubadas com uma solução de AH, de forma que ocorra a interação eletrostática. Vários autores têm estudado esse tipo de funcionalização com o objetivo de ampliar o direcionamento do fármaco (Assanhou et al., 2015; Chi et al., 2017; Gasperini et al., 2015; Giovanna Esposito, Simonetta Geninatti Crich, 2008).

3.4 Hipertermia no tratamento do câncer

Na oncologia, a hipertermia se refere ao aquecimento de tumores, tecidos ou sistemas a temperaturas acima da temperatura fisiológica (Januszewski & Stebbing, 2014). Na medicina foi usada pela primeira vez pelo ginecologista Frans Westermarck, em 1898, que obteve uma excelente resposta em carcinomas cervicais avançados (Westermarck, 1898). Sabe-se que existe um efeito tumor-seletivo da hipertermia a temperaturas entre 40°C e 46°C e, que o ambiente vascular em tumores sólidos é crítico, resultando em regiões com hipóxia e baixos níveis de pH, o que não se encontra em tecidos normais. Esses fatores tornam as células tumorais mais sensíveis à hipertermia, especialmente em áreas com baixa perfusão. Portanto, além da citotoxicidade direta, a hipertermia conduz *in vivo* a uma destruição quase seletiva de células tumorais em meio hipóxico e, conseqüentemente, ácido em partes de tumores sólidos (Behrouzkia et al., 2016; Vaupel, 2004; Vaupel et al., 1989).

Assim sendo, o aquecimento de tecidos a temperaturas superiores às encontradas em condições fisiológicas normais, pode ser usado de duas formas: i) temperatura elevada por períodos curtos de tempo (> 50°C durante 10 min) comumente referida como ablação que pode ocasionar a morte celular, ou ii) temperaturas mais baixas por longos períodos de tempo (40 a 46°C durante ~ 60 min) chamado de hipertermia moderada (Hildebrandt et al., 2002; May & Li, 2013). Embora a ablação térmica possa efetivamente destruir o tecido tumoral, uma grande limitação em sua eficácia deve-se às dificuldades de aquecimento de tumores grandes, o que impossibilita que todo o tumor possa atingir uma temperatura suficiente para coagulação e necrose (Vaupel & Horsman, 2010). Em casos de hipertermia moderada, alguns efeitos como aumento do fluxo sanguíneo, perfusão melhorada, oxigenação aumentada e maior permeabilidade são observados (Hildebrandt et al., 2002).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, atualmente existem três formas de realizar a hipertemia: local, regional ou de corpo inteiro. A hipertermia local ou regional é usada principalmente para melhorar a terapia local, como radioterapia ou quimioterapia e, a hipertermia de corpo inteiro geralmente é aplicada isoladamente ou em combinação com a quimioterapia para o tratamento de doença metastática (Peeken et al., 2017).

Os equipamentos usados na hipertermia podem ser: ultrassom focado de alta intensidade (HIFU), radiofrequência e micro-ondas. HIFU envolve a propagação de ondas sonoras a uma frequência de 2 a 20 MHz através do tecido. A absorção dessas ondas resulta em aquecimento do meio (Habash et al., 2006). A técnica HIFU permite tanto a ablação, quanto a hipertermia moderada do tumor. Quando realizado sob orientação de ressonância magnética (MR-HIFU), é

possível um mapeamento *in vivo* da mudança de temperatura, para proporcionar o aquecimento preciso do tecido durante um período de tempo prolongado (Smet et al., 2011). Para aquecer tumores grandes em profundidade, os campos de radiofrequência na faixa de 10 a 120 MHz são geralmente usados com comprimentos de onda longo, comparado com as dimensões corporais e, assim, depositam energia sobre uma região considerável (Habash et al., 2006). Já a hipertermia por micro-ondas utiliza geralmente antenas que funcionam a 434, 915 e 2450 MHz. Um sistema de micro-ondas inclui a antena e um sensor de temperatura sem contato que varre um caminho predeterminado sobre a superfície do tecido a ser tratado. Tem sido muito usado em pacientes com câncer de próstata ou de mama (Habash et al., 2006; Nguyen et al., 2017).

Dessa forma, as pesquisas na área de hipertermia combinada a outros tratamentos convencionais aumentaram nos últimos anos (Y. Dou et al., 2017; Grill & Langereis, 2012; Kneidl et al., 2014; Koning et al., 2010). Essa combinação com terapias convencionais para retardar o crescimento do tumor, tem como vantagem significativa a possibilidade de usar doses mais baixas de quimioterapia e radiação, levando a um tratamento mais eficaz com menos efeitos indesejados e uma redução da resistência das células cancerosas à combinação de fármacos e radiação (Ahmed & Zaidi, 2013). Atualmente, a técnica está em fase de ensaios clínicos e ainda não está amplamente disponível (National Cancer Institute, 2018).

Segundo Koning e colaboradores (2010), além do fenômeno de hipertermia aumentar a permeabilidade vascular em tumores sólidos, atuando como quimiossensibilizador, pode também aumentar o acúmulo de lipossomas e ainda, de lipossomas termosensíveis, que podem liberar seus conteúdos após a hipertermia. Ao aplicar essas duas estratégias, a entrega de substâncias ativas nos tumores pode ser fortemente aprimorada (Koning et al., 2010; Li et al., 2014).

Atualmente muitos estudos têm sido realizados nessa área. A Tabela 3 mostra alguns estudos *in vivo* mais recentes de lipossomas termosensíveis associados a hipertermia.

Tabela 3: Estudos *in vivo* utilizando hipertermia e lipossomas termosensíveis

Composição lipossoma termosensível	Hipertermia	Alvo	Fármaco	Referência
DPPC:HSPC:CHOL:D PPE-PEG ₂₀₀₀ (50:25:15:3)	MR-HIFU	Gliosarcoma	Doxorrubicina e gadolínio	Smet et al., 2011
DPPC:DSPC:DPPG2 (50:20:30)	Fonte de luz fria	Sarcoma de tecido mole	Gencitabina	Limmer et al., 2014
DPPC:DPPG:MSPC:D SPE-mPEG ₂₀₀₀ (57,7:28,9:9,6:3,8)	Laser-MR	Carcinoma cervical humano	Cisplatina	Dou et al. 2014
DPPC:DSPC:DPPG2 (50:20:30)	Luz laser	Sarcoma de tecido mole	Doxorrubicina	Peller et al., 2016
DPPC:DPPG:MSPC:D SPE-mPEG ₂₀₀₀ (57,7:28,9:9,6:3,8)	Laser-MR	Carcinoma de pulmão de células grandes	Cisplatina	(Y. Dou et al., 2016)
DPPC:DSPC:DSPE-PEG (70:25:5)	Banho de água	Câncer de mama	Doxorrubicina	(Lokerse et al., 2017)
DPPC:HSPC:CHOL:D PPE-PEG ₂₀₀₀ :DOTAP-DSPE (50:25:15:3:1)	MR-HIFU	Rabdomiossarcoma	Doxorrubicina	(Hijnen et al., 2017)
DPPC:HSPC:MSPC:D SPE-mPEG ₂₀₀₀ (60:30:10:4;	Banho de água	Carcinoma de cólon	Cisplatina	(Alavizadeh et al., 2017)

***DPPC:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; **DSPE:** 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **MSPC:** 1-Miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfolina; **PEG:** polietileno glicol; **DPPG2:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol; **HSPC:** fosfatidilcolina de soja; **CHOL:** colesterol; **DPPE:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **DOTAP:** 1,2-Dioleoiloxi-3-trimetilamônio propano.

3.5 Lipossomas de cisplatina

Considerando as desvantagens da CDDP e os benefícios dos lipossomas, pesquisadores vem desenvolvendo sistemas lipossomais para carrear a CDDP objetivando reduzir a nefrotoxicidade e aumentar o acúmulo do fármaco no tumor (Carvalho et al., 2007; Leite, Souza, et al., 2012; Qun et al., 2014; R. Silva et al., 2017). No entanto, esses sistemas ainda apresentam limitações. SPI-077, um lipossoma de CDDP, se mostrou eficaz em estudos pré-clínicos, porém não exibiu eficácia em pacientes. As falhas na terapia foram atribuídas a baixa encapsulação de CDDP e a liberação espontânea do fármaco insuficiente no local do tumor (Alavizadeh et al. 2017; White et al. 2006).

Sengupta e colaboradores (2012) realizaram uma síntese envolvendo a ligação da CDDP ao colesterol, e o produto dessa reação foi utilizado no preparo de uma formulação lipossomal. A nanopartícula lipossomal exibiu potência e eficácia aumentadas *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a síntese de CDDP-colesterol inclui várias etapas e resultará em dificuldade no escalonamento de produção desse sistema (Sengupta et al., 2012).

Lipoplatin™, outra formulação lipossomal composta de DPPG, PC de soja, DSPE-mPEG e colesterol, contendo CDDP, pode ser considerada a formulação lipossomal em estágio mais avançado de estudo, atualmente sendo testada em estudos de fase III, exibiu eficácia antitumoral em estudos de fase I e II com efeitos colaterais reduzidos em comparação com o fármaco livre (Bulbake et al., 2017).

Lipossomas de CDDP responsivos a estímulos ainda estão em fase de estudos pré-clínicos e estão apresentados na Tabela 4. Com base nas pesquisas existentes até o momento, mais estudos se fazem necessários a respeito dos sistemas responsivos a estímulos, quanto a redução da nefrotoxicidade, principal limitante do uso da CDDP.

Tabela 4: Estudos pré-clínicos de lipossomas de cisplatina responsivos a estímulos

Tipo de lipossoma	Composição	Tipo de estudo	Resultado	Referência
Termossensível	HSPC:DPPC:M SPC:DSPE-PEG	Neoplasia de órgãos digestivos	Liberação prematura do fármaco e T1/2 reduzido. Porém aumentou a sobrevida dos animais	Alavizadeh et al., 2017
Termossensível	DPPC:DPPG:M SPC:DSPE-PEG	Câncer cervical	O acúmulo de fármaco no tumor não é preditivo da eficácia do tratamento	(Y. N. Dou et al., 2017)
Termossensível	DPPC:DPPG:M SPC:DSPE-PEG	Carcinoma cervical	Aumento significativo no índice terapêutico do fármaco	(Y. Dou et al., 2014)
Termossensível	DPPC:M ²⁺	Carcinoma cervical	Maior citotoxicidade em linhagem de HeLa	(H. Liu et al., 2015)
pH-sensível	DOPE:CHEMS: DSPE-PEG	Carcinoma pulmonar	Foram mais eficazes do que a CDDP livre para inibição do crescimento de A549	(Carvalho et al., 2007)
pH-sensível	DOPE:CHEMS: DSPE-PEG	Tumor de Ehrlich sólido	Maior taxa de inibição do crescimento do tumor	(Leite, Souza, et al., 2012)
pH-sensível	DOPE:CHEMS: DSPE-PEG	Avaliação da toxicidade intestinal	Diminuição do dano intestinal	Silva et al. 2017

***DPPC:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina; **DOPE:** 1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **DSPE:** 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina; **DPPG2:** 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol; **MSPC:** 1-Miristoil-2-estearoil-sn-glicero-3-fosfolina; **HSPC:** fosfatidilcolina de soja; **CHEMS:** Hemisuccinato de Colesterila; **PEG:** polietileno glicol. **M²⁺:** íons metálicos

Diante do exposto, a toxicidade severa relacionada à CDDP, as falhas nas terapias com lipossomas de CDDP, o potencial dos lipossomas responsivos a estímulos associado às vantagens com o uso de moléculas de direcionamento ativo, justificam o desenvolvimento de um novo lipossoma termossensível funcionalizado com AH para carrear CDDP. Essa nova

estratégia pode permitir o acúmulo do fármaco especificamente no tumor, reduzindo assim os seus efeitos indesejados.

A presente tese foi dividida em dois capítulos. No capítulo 1 foram descritas todas as etapas de desenvolvimento e caracterização dos lipossomas termossensíveis, na forma de um artigo, o qual foi submetido para publicação no periódico *Journal of Nanoparticle Research*. No capítulo 2 foram apresentados os resultados dos ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* das formulações desenvolvidas.

TRABALHO EXPERIMENTAL
CAPÍTULO I: THERMOSENSITIVE LIPOSOMES CONTAINING CISPLATIN
FUNCTIONALIZED BY HYALURONIC ACID: PREPARATION AND
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Trabalho submetido para publicação no periódico Journal of Nanoparticle Research

ABSTRACT

This study aimed to develop a thermosensitive liposomal formulation (TSL) functionalized with hyaluronic acid (HA), to encapsulate a hydrophilic drug, the CDDP. The physicochemical and thermal characteristics of this new formulation were studied by dynamic light scattering (DLS), microcalorimetry, and small-angle X-ray scattering (SAXS) techniques. Our results showed mean diameter and PDI data characteristics of homogeneous formulations, indicating the absence of aggregation of vesicles after functionalization with HA. The efficiency of coating in the liposome surface was attributed to zeta potential values close to neutrality. DLS data showed a significant reduction in the average diameter and K_{cps} of the formulations evaluated at 40°C. It was also observed that the HA-coating did not alter the T_c of the formulations. The SAXS profile of all formulations was characteristic of a lamellar organization regardless of temperature evaluated and showed dilation of the bilayer, caused by local misorientation in the structure of the lipids, confirming the conformational alteration due to warming. Therefore, the *in vitro* release profile showed that possible drug adsorption in the phospholipid bilayer may be generating the diffusion rate of CDDP before reaching T_m (42°C), for TSL-CDDP and TSL-CDDP-SA-HA. For TSL-CDDP-HA, the presence of the polymer may be modulating this diffusion, generating a more controlled and slow release profile.

Keywords: thermosensitive liposome; hyaluronic acid; characterization; lipid bilayer.

1 INTRODUCTION

Successful cancer therapy is often related to the ability of the anticancer drug to selectively kill tumor cells with minimal damage to healthy tissues. It is well-described that the encapsulation of anticancer drugs may improve their therapeutic index by increasing the drug concentration at the tumor region and decreasing the toxic side effects. In this scenario, liposomes have been investigated extensively for the tumor delivery of several cytotoxic drugs such as doxorubicin, paclitaxel, and cisplatin (CDDP) (Alavizadeh et al., 2017; Bulbake et al., 2017; White et al., 2006). However, as the interstitial tumor matrix shows high heterogeneity and complexity, the diffusion of these systems in the extracellular space is sometimes hindered (Dabbagh et al., 2015). In this sense, the use of thermosensitive liposomes (TSL) associated with hyperthermia has shown to be a promising tool for drug delivery since the heating leads to an increased tumor vascular permeability and favoring the drug release from thermo-responsive nanostructures to the tumor interstitium (Gomes et al., 2019; Ta & Porter, 2013).

TSL were described for the first time in 1978 and designed to be stable at body temperature (37 °C) but allow the drug release after heating (Yatvin et al., 1978). These systems are composed of mixtures of phospholipids or polymers that undergo a phase transition from gel to crystalline liquid in response to heating. In the gel phase ($L\beta$), the lipid molecules are ordered and condensed with fully extended hydrocarbon chains and are limited to the two-dimensional membrane plane. After heating, the mobility of the polar head groups gradually increases, and as the temperature is close to the phase transition temperature (T_c), the orientation of the single C-C bonds in the hydrocarbon chains changes from *trans* to *gauche* configuration. In this phase, named the crystalline liquid phase or $L\alpha$, the membrane becomes highly permeable, which favors the release of the drug (Kim, 2007).

Furthermore, the combination of the thermosensitive release mechanism with tumor targeting of the liposome may potentiate the selectivity of the system. The approach in this area is to decorate liposomes with cell binding specific ligand molecules (Torchilin, 2014). It is well-known that clusters of differentiation 44 (CD44) receptors are frequently overexpressed on several types of human tumors, including breast cancer (Almalik et al., 2013; Sheridan et al., 2006). This fact makes hyaluronic acid (HA) an interesting strategy to reach higher tumor accumulation. HA is a non-toxic and biodegradable natural biopolymer composed of repeated disaccharide units of D-glucuronic acid and *N*-acetyl-glucosamine, which shows a high affinity to CD44 receptors (Gasperini et al., 2015; Kuo, 2005; Lv et al., 2018). Some studies have also reported that HA is a suitable alternative to polyethyleneglycol (PEG). Besides promoting

selective recognition to the tumor site, this molecule provides a hydrophilic coating for the liposome and might prevent opsonin adsorption (Dufaý Wojcicki et al., 2012; Jiang et al., 2014; Ravar et al., 2016). The decoration of liposomes with HA might be performed by two routes: (i) chemical derivation of molecules to incorporate HA into the phospholipids, by a covalent bond between the lipid of interest and the HA molecule; or (ii) electrostatic interaction between the cationic lipid and HA ionizable groups (Arpicco et al., 2013; Gasperini et al., 2015; Qhattal et al., 2014).

Therefore, this study aimed to develop TSL functionalized with HA, composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol (CHOL), to encapsulate a hydrophilic drug, the cisplatin (CDDP). We focused on a formulation in which the biophysical properties of the phospholipids were responsible for the thermosensitivity of the system and allowed the drug release specifically in the heated region of the tumor. As changes in the organization of the structural lipid must be addressed to achieve adequate thermosensitivity, the physicochemical and thermal characteristics of this formulation were studied by different techniques, such as dynamic light scattering (DLS), microcalorimetry, and small-angle X-ray scattering (SAXS) under heating conditions.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Hyaluronic acid (HA) 4 kDa was provided by Innovasell (São Paulo, Brazil). Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) was purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Cholesterol (CHOL) and stearylamine (SA) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). Cisplatin was acquired from Quiral Química do Brasil (Juiz de Fora, Brazil). Polycarbonate membranes were purchased from Millipore (Billerica, USA). Sodium diethyldithiocarbamate (DDTC) was provided by the Sigma-Aldrich Company (St. Louis, USA). The water used to prepare all solutions and samples was purified on a Milli-Q[®] Direct-Q3 Millipore system (Billerica, USA). All other chemicals were of analytical or HPLC grade and were used without further purification.

2.2 Stearylamine-Hyaluronic acid synthesis and TSL-SA-HA, TSL-CDDP-SA-HA preparation

The synthesis of the stearylamine-hyaluronic acid conjugate (SA-HA) was performed using HA 4 kDa in the presence of a carbonyl activator, 1-ethyl-3-hydrochloride-(3-

dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) associated with *N*-hydroxysuccinimide (NHS). In a round-bottomed flask, 100mg of hyaluronic acid (0.2625 mmol) was dissolved in 100mL of double-distilled water, then 51mg of EDAC (0.2625 mmol) and 31mg of NHS (0.2625 mmol) were added to the reaction mixture. Afterward, 20mL of DMF and 5mL of chloroform were added and the solution was stirred for 20min at room temperature. Next, 71mg of a solution of stearylamine in 12mL of chloroform:THF (1:1) (0,2625 mmol) was added to the reaction mixture, which was then vigorously stirred for 42h at 50°C (Toriyabe et al., 2011).

The final product was then purified by dialysis using a Spectrapore® membrane with 1000 Da cut off, at room temperature. The external medium was a solution of PBS:tert-butyl alcohol (1:1, v/v). To avoid saturation the external phase was completely replaced every 8 h (Toriyabe et al., 2011). Next, the purified product was lyophilized for 48h and stored at 4 °C (Liobras® k105, São Paulo, Brasil).

The purified product was used for the preparation of TSL and TSL-CDDP. In this case, the SA was substituted by stearic acid (AS) and the conjugate SA-HA, on the same proportion of the SA. The AS was used in the proportion of 0.05 mM and SA-HA 0.2 mM, totaling 0.25 mM. The liposome composition was DPPC:CHOL:AS:SA-HA at a lipid molar ratio of 95:2.5:0.5:2.0, respectively.

2.3 Preparation of Thermosensitive liposomes (TSL)

Thermosensitive formulations were prepared by the reverse-phase evaporation method (Júnior et al., 2007). Liposomes were composed by DPPC:CHOL:SA at two lipid molar ratios, as 90:5:5 (TSL-90) and 95:2.5:2.5 (TSL-95) at a total lipid concentration of 20 mmol L⁻¹. Firstly, chloroform aliquots of DPPC, CHOL, and SA were transferred to a round bottom flask and the solvent was removed under reduced pressure using a rotary evaporator (BüchiLabortechnik R-210, Flawil, Switzerland) until the formation of a thin lipid film. The following conditions were used: 103 mbar, 120 rpm for 1 hour at 30 °C. Then, the lipid film was dissolved in ethyl ether, and 0.9% (w/v) NaCl solution was added to reach an organic:aqueous ratio (v/v) of 3:1. The obtained mixture was stirred for 3 min to produce a water/oil emulsion. Next, the ethyl ether was completely removed under reduced pressure, until the formation of the lipid vesicles. Afterward, the liposomes were calibrated by using five extrusion cycles (Extruder T 001, LipexBiomembranes, Vancouver, Canada) through polycarbonate membranes with a porous size of 0.4 µm, 0.2 µm, and 0.1 µm, under nitrogen

flow at 55 °C. Each cycle corresponds to the passage of the complete volume of the formulation through the extruder.

For the preparation of CDDP-loaded liposomes (TSL-CDDP), the same method described above was used. In this case, CDDP solution (2.0 mg/mL), prepared in 0.9% (w/v) NaCl, was added to the lipid film dissolved in ethyl ether, and the total lipid concentration was equal to 40 mmol.L⁻¹. After size calibration, non-entrapped CDDP was separated from the liposomes by ultracentrifugation (Optima® L-80XP ultracentrifuge, Beckman Coulter) at 44,800 g at 10° C for 30 min. The pellet was reconstituted in 0.9% (w/v) NaCl to obtain the initial volume of the liposomal formulation.

TSL and TSL-CDDP were functionalized with HA 4 kDa according to the method described by Ravar and collaborators (2016), with some modifications. An aliquot of the liposomes was slowly added dropwise to an HA solution, at concentrations of 24.0 and 66.0 mg/mL, under constant stirring on a magnetic stirrer (IKA color squid, Hytrel HTR 8068, Germany). The mixture was kept under stirring for 10 min. The liposome:HA ratio (v/v) used was 1:2. Free HA was removed by ultracentrifugation at 44,800g, 10° C for 30 min (Optima L-XP Series Ultracentrifuge, BeckmanCoulter, California, USA). After ultracentrifugation, the *pellet* was reconstituted in 0.9% (w/v) NaCl solution.

2.4 Physicochemical and Thermal Characterization

2.4.1 Mean Diameter, Polydispersity Index, and Zeta Potential Analysis

The mean diameter and polydispersity index (PDI) of the vesicles were determined by the DLS at 25 °C using a fixed angle of 90° (Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, England). Samples were diluted 40-times in 0.9% (w/v) NaCl solution previously filtered (filter 0.45µm, Millipore).

The zeta potential was determined by the DLS associated with the electrophoretic mobility of the vesicles at a temperature of 25 °C and a fixed angle of 90° (Zetasizer Nano ZS 90 equipment, Malvern Instruments, England). Samples were diluted 40-times in filtered NaCl 1mM (filter 0.45µm, Millipore). All results were expressed as the mean ± standard error of three batches of each formulation.

2.4.2 Thermal properties analyses

The thermosensitivity of liposomes was evaluated by DLS and differential scanning calorimetry (DSC). For DLS, samples were diluted 40-times in 0.9% (w/v) NaCl solution and heated at a temperature ranging from 25 °C to 55 °C, with a heating rate of 3°C/min. Mean diameter and kilo counts per second (Kcps) were evaluated. Measurements were carried out in triplicate using Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments, England), and the results were expressed as the mean \pm standard error of three different batches of each formulation.

The liposome T_c values were determined by DSC analyzes using a Microcal VP-DSC microcalorimeter Instruments (Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil). The samples were previously diluted in 0.9% (w/v) NaCl solution to a concentration of 5 mmol L⁻¹ and analyzed with a 0.9% (w/v) NaCl solution as a baseline. The heat capacity (C_p), at constant pressure in units of cal/°C, was then measured from 15 to 65 °C with a heating rate of 1 °C/min. The parameters ΔH and ΔH_v were obtained from the DSC curve. In addition, it was calculated the cooperative unit (CU) size, which reflects intermolecular cooperation of phospholipids in a bilayer during phase transition, and changes from infinity for ideal cooperativity to one in the absence of cooperativity. The CU was calculated according to the equation: $CU = \Delta H_v / \Delta H$.

2.4.3 Drug encapsulation efficiency

The encapsulation percentage (EP) of CDDP into liposomes was determined by the high-performance liquid chromatography (HPLC), using a derivatization method with sodium diethyldithiocarbamate (DDTC) (Tezcan et al., 2013; Toro-Córdova et al., 2016). This parameter was based on the determination of CDDP concentration in the liposomes before (non-purified liposomes) and after centrifugation (purified liposomes). In brief, acetonitrile (500 μ L) was added to an aliquot of liposome (250 μ L) followed by vortex agitation for 1 min and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The supernatant (250 μ L) was transferred to an eppendorf and dried under N₂ atmosphere. The residual product was suspended in 1mL of 0.9% (w/v) NaCl and 250 μ L was used to react with a solution of DDTC in NaOH (600 μ L of a 1mM solution). The samples were incubated at 37°C for 60 min and extracted with 250 μ L of chloroform. After separating the layers, the chloroform layer was filtered through a 0.45 μ m filter and injected into the chromatographic system.

The chromatographic apparatus equipped with a degasser, a quaternary pump (G1311B), a column oven (G1316A), an autosampler (G1329B), and a diode array detector

(DAD) (G4212B), coupled to the EzChrom integration program (Agilent Technologies, California USA). The separation was carried out at 25°C using a 250 x 25 mm Hypersil C18 column, 5 µm particle size (Agilent Technologies, California USA). The mobile phase consisted of a mixture of methanol and water (65:35 v/v) in isocratic flow. The flow rate was 1.5 mL/min, and the samples (20 µL) were monitored at 254 nm. The six-point standard curve (5, 7.5, 10, 15, 20, and 50 µg/mL) vs. area under the curve was previously obtained by linear regression analysis. The linear equation determined was $y=2879250.31x-10217144.16$ and $r = 0.9964$.

2.4.4 Small-angle X-ray scattering (SAXS)

TSL and TSL-CDDP were submitted to ultracentrifugation at 44,800 g, 10° C for 30 min to produce a pellet to be evaluated by SAXS. The measurements were performed at the D1B-SAXS1 beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil), at an X-ray wavelength $\lambda = 0.1488$ nm. SAXS patterns were detected using a 300K Pilatus detector positioned 1.0 m from the sample, providing a reciprocal space vector range (Q) from 0.15 nm⁻¹ to 4.0 nm⁻¹, where Q was calculated as $Q = (4 \pi/\lambda)\sin \theta$ and θ is the scattering angle. Samples were deposited on metal rings, which were sealed by two polyimide film (Kapton®). A sample holder with a DSC-linkam heating system was also used to allow the heating rate of 1°C/min in a heating range from 25 °C to 50°C. After analysis, the domain size (L) and interplanar distance (d) were calculated by the relations $L = 2\pi/\Delta Q$ (where ΔQ is the width of each scattering peak) and $d = 2\pi/Q$. These values, whenever shown without specific description in the following figures, were obtained from the first-order peaks of all packing structure types analyzed.

2.5 In vitro release analyses

The influence of temperature on TSL-CDDP and TSL-CDDP-HA release rate was determined. The content of CDDP release from the liposomes was measured after 5, 15, 30, 60, 120, and 240 min of incubation in 0.9% (w/v) NaCl, at temperatures of 37 °C and 42 °C. For this, each formulation was diluted at a ratio of 1:10 in 0.9% (w/v) NaCl and added in a heat-resistant vial. Then, the vial was incubated in a pre-heated thermoshaker (KS 4,000 I control, IKA, Wilmington, USA), and kept under stirring at 50 rpm. After incubation, during the pre-set time, each vial was quickly immersed into an ice bath to stop the release and was immediately submitted to ultracentrifugation at 44,800g, 10° C for 30 min (Optima L-XP Series

Ultracentrifuge, BeckmanCoulter, California, USA). The CDDP released from the liposomes was determined by the HPLC, using a derivatization method, such as described in item 2.4.3.

2.6 Statistical analysis

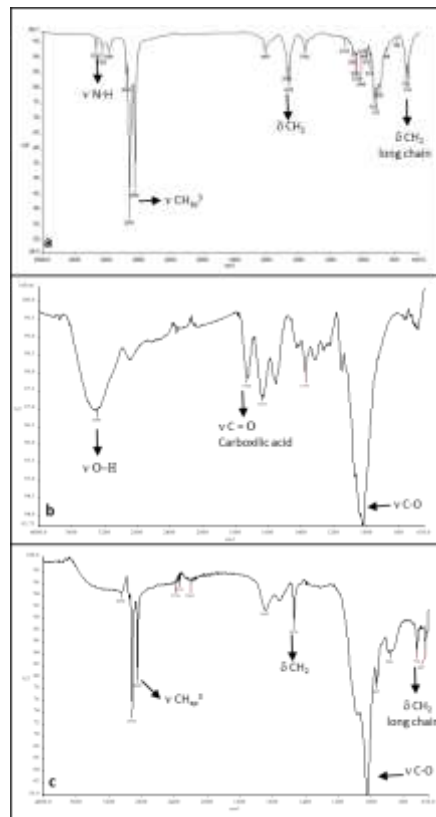
Normality and homogeneity of variance analyses were performed by D'Agostino and Pearson and Bartlett's tests, respectively. Liposome characterization data were tested using the one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's test or Student's t test. Differences were considered significant when the p-value was lower than 0.05. The computer program used for all statistical analyses was GraphPad Prism 5.0.

3 RESULTS

3.1 Stearylamine-Hyaluronic acid synthesis

Infrared spectra of SA, HA, and the product SA-HA were performed to identify the main functional groups of the three compounds (Fig 1). In the spectrum of SA-HA, the absence of the O-H band of HA, and the NH₂ band of SA might indicate the formation of the covalent amide bond between the carboxyl group of the HA and the amine group of SA, forming the conjugate SA-HA. In addition, the stretching bands of sp³ CH bond present in A and C, C-O bond present in B and C and CH₂ bending at 1470 cm⁻¹ (scissoring) and 720 cm⁻¹ (rocking long chain) present in A and C (Pavia et al., 2010), corroborate the occurrence of the reaction. This product was used in the preparation of thermosensitive liposomes, as mentioned in topic 2.3.

Figure 1: Infrared spectra. (a) Stearylamine, (b) hyaluronic acid, (c) SA-HA

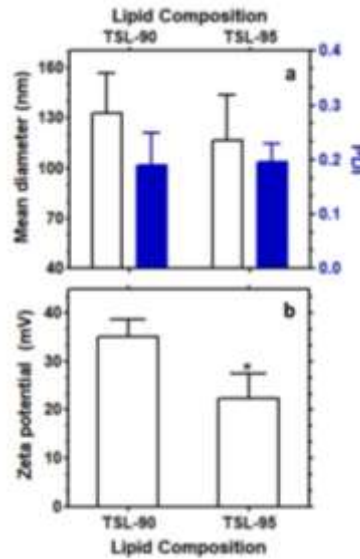


3.2 Characterization of TSL

3.2.1 Mean Diameter, Polydispersity Index, and Zeta Potential

Firstly, in order to evaluate the influence of lipid composition on the physicochemical parameters, measurements of mean diameter, PDI, and zeta potential of TSL (without CDDP) were performed by DLS (Fig 2). TSL-90 and TSL-95 showed similar diameters in the range of 150 nm and PDI lower to 0.2 indicating homogeneous size distribution. Additionally, the decrease of SA concentration leads to a significant reduction in the zeta potential values. Therefore, TSL-95 showed lower zeta potential (+20 mV) due to the small amount of stearylamine.

Figure 2: Mean diameter and PDI (a), and zeta potential (b) of thermosensitive liposomes made of DPPC:CHOL:SA at molar ratio 90:5:5 (TSL-90) and 95:2.5:2.5 (TSL-95)

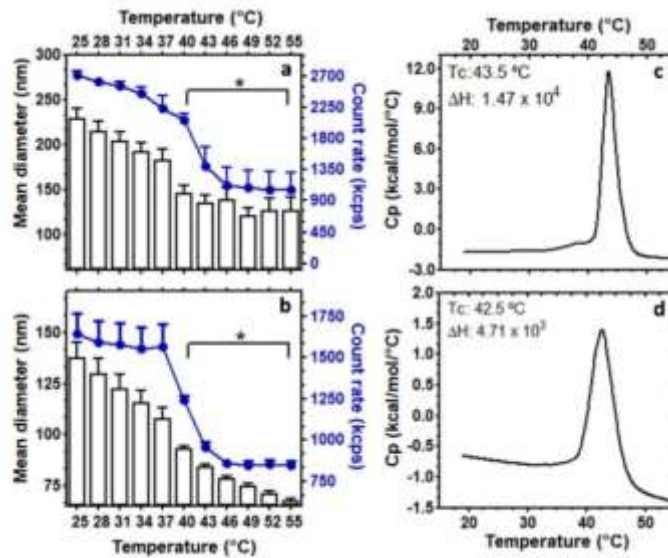


Data expressed as the mean \pm standard error ($n = 3$ batches). * represents a significant difference compared to TSL-90, $p < 0.05$ (Student t-test).

3.2.2 Thermal properties analyses

We also performed DLS and DSC studies to assess the influence of the lipid ratio on the thermal properties of the systems. The results are presented in Fig 3.

Figure 3: Variation of mean diameter (bars) and particle count rate (lines and points) of TSL-90 (a) and TSL-95 (b) as a function of DLS heating. DSC curves of the formulations TSL-90 (c) and TSL-95 (d)



Data expressed as the mean \pm standard error ($n = 3$ batches). * represents a significant difference in particle size and count when compared to the initial temperature of the experiment (25 °C), $p < 0.05$ (Tukey test).

By analyzing the DLS data are shown in Figures 3A and 3B it was possible to estimate a range of temperature for the transition phases ($L\beta \rightarrow L\alpha$). No significant change in the mean diameter and particle count rate was observed from 25 °C to 40 °C for both formulations, which suggests possible stability at body temperature (37 °C). In contrast, at 40 °C, both parameters were significantly decreased, suggesting a membrane destabilization that may be a consequence of the transition phase $L\beta \rightarrow L\alpha$. Therefore, we could estimate that the T_c for both liposomes is close to 40 °C. In agreement, endothermic peaks, characteristic of the $L\beta \rightarrow L\alpha$ transition, were detected in both formulations by DSC analyses. TSL-90 showed a peak with onset at 40°C and offset at 48°C, the T_c (maximum peak) was 43.5 °C (Fig 3C). With increasing SA concentration (TSL-95), it was observed a reduction in the onset (37.6°C) and offset (47.5°C) temperatures with T_c of 42.5 °C (Fig 3D). These results corroborate the preliminary study of DLS, confirming the T_c of TSL-90 and TSL-95 in the range of moderate hyperthermia approaches (40 to 46 °C)(Chatterjee et al., 2011; May & Li, 2013; Wust et al., 2002). Moreover, transition enthalpy for TSL-95 was lower than that obtained for TSL-90 (Table 1). Simultaneously, the CU reduced significantly in TSL-95, suggesting an increase in structural disorder in the bilayer after heating. Thus, TSL-95 was selected to further studies of HA functionalization and drug encapsulation.

Table 1: Thermotropic parameters obtained from the DSC of TSL-90 and TSL-95

Formulations	TSL-90	TSL-95
Parameters		
T_c (°C)	43.5 ± 0.01	42.5 ± 0.01
ΔH (KJ.mol ⁻¹)	$1.5 \times 10^4 \pm 68$	$4.7 \times 10^3 \pm 11.3$
ΔH_v (KJ.mol ⁻¹)	$2.7 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^3$	$1.6 \times 10^4 \pm 4.7 \times 10^2$
CU	18.3	3.35

T_c : temperature of phase transition; ΔH : enthalpy of transition; ΔH_v : van't Hoff enthalpy, CU: cooperative unit.

3.2.3 HA functionalization - physicochemical and thermal characterization

Initially, the functionalization was performed by incubating TSL-95 with HA 4KDa (TSL-HA) at concentrations of 24 and 66 mg/mL (TSL-HA-24 and TSL-HA-66, respectively). Considering that, at pH 7.0, HA is in the ionized form (pKa 3.0), the electrostatic interaction between negative and positive charge from HA and liposome, respectively, may be favored. Measurements of mean diameter, PDI, and zeta potential are presented in Table 2. There was no significant change in mean diameter and PDI after incubation with HA 4KDa at both concentrations. However, a significant reduction in zeta potential compared to non-coated liposomes suggests the occurrence of electrostatic interaction and neutralization of the positive

charges of SA. Noteworthy, zeta potential values obtained after functionalizing with 24 and 66 mg/mL were similar, indicating probable saturation of the surface interaction. Thus, 24 mg/mL of HA was the concentration chosen for further studies.

TSL-95 containing synthesized SA-HA conjugate (TSL-SA-HA) was also prepared. The physicochemical characteristics were similar to those obtained for liposome functionalized by electrostatic interaction. The zeta potential was near neutrality, indicating success in incorporating the synthetic conjugate into the liposome.

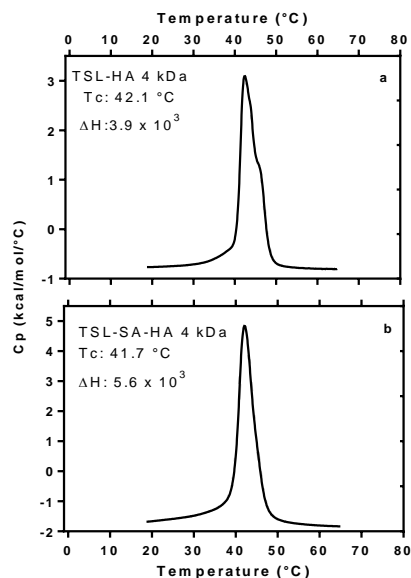
Table 2: Variation in mean diameter, polydispersity index, and zeta potential of the TSL-95 formulation and its variations

Formulation	Mean Diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
TSL	94.2 ± 4.4	0.08 ± 0.02	+15.7 ± 1.0
TSL-HA-24	98.8 ± 4.4	0.09 ± 0.04	+4.6 ± 1.8*
TSL-HA-66	101.3 ± 2.6	0.07 ± 0.04	+5.1 ± 1.5*
TSL-SA-HA	86.7 ± 2.5	0.13 ± 0.001	+4.7 ± 1.4*

TSL: thermosensitive liposome; TSL-HA-24: thermosensitive liposome functionalized with HA (24 mg/mL) by electrostatic interaction; TSL-HA-66: thermosensitive liposome functionalized with HA (66 mg/mL) by electrostatic interaction; TSL-SA-HA: thermosensitive liposome functionalized with SA-HA conjugate. * represents a significant difference compared to the formulation without HA. Data expressed as mean ± standard error (n = 3 batches). p < 0.05 (Tukey test).

After coating, DSC studies were also performed to verify if the HA modified the Tc previously reported (Figure 4). Similar to the abovementioned, endothermic peaks were detected in both formulations. Tc values for TSL-HA and TSL-SA-HA were 42.1 °C (Figure 4A) and 41.7 °C (Figure 4B), respectively. Thus, the HA and the conjugate SA-HA did not alter the Tc compared to non-coated formulations (Fig 3C and 3D) and both formulations showed suitable properties as thermosensitive liposomes.

Figure 4: Microcalorimetry curve of formulation TSL-HA (a) and TSL-SA-HA (b).



3.2.4 Drug encapsulation efficiency

CDDP was used as a model of hydrophilic drug to be encapsulated in the thermo-responsive liposomes at 2 mg/mL (TSL-CDDP). Afterward, formulations were functionalized with HA by either electrostatic or covalent approaches. The physicochemical features are presented in Table 3. There is no significant change in the mean diameter, PDI, and zeta potential, compared to those formulations without CDDP (Table 2). Low zeta potential was again obtained in the presence of HA, suggesting the neutralization of positive stearylamine charges by HA. EP (%) between 10 and 16% was verified for all formulations developed. The smaller size observed for TSL-CDDP-SA-HA may be due to the SA-HA conjugate between the lipids and not on the surface as in the case of functionalization by electrostatic interaction, leading to the formation of more compact liposomes. Besides, the composition and smaller size could justify the lower encapsulation efficiency than the formulation functionalized by electrostatic interaction. A previous study showed that small size could impact drug encapsulation efficiency (Maritim et al., 2021).

Table 3: Characterization of the formulation with CDDP

Formulation	Mean Diameter (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	Encapsulation ($\mu\text{g/mL}$)	EP (%)
TSL-CDDP	103.4 ± 2.9	0.11 ± 0.02	$+20.9 \pm 0.3$	263.8 ± 19.5	13.7 ± 0.9
TSL-CDDP-HA	109.4 ± 3.8	0.06 ± 0.01	$+5.5 \pm 0.5$	251.5 ± 20.9	16.1 ± 1.9
TSL-CDDP-SA-HA	86.06 ± 1.4	0.15 ± 0.02	$+9.1 \pm 1.6$	229.8 ± 31.6	9.3 ± 0.7

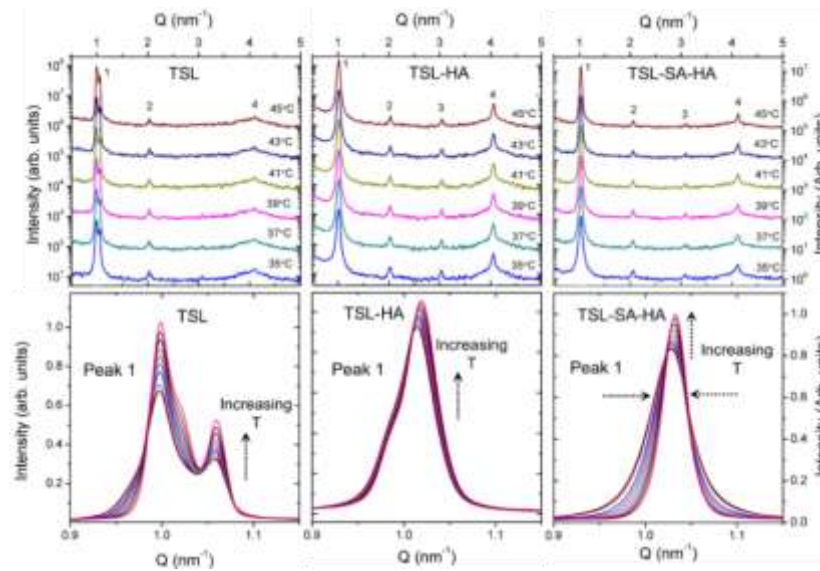
TSL-CDDP: thermosensitive liposome containing CDDP; TSL-CDDP-HA: thermosensitive liposome functionalized with HA (24 mg/mL) by electrostatic interaction; TSL-CDDP-SA-HA: thermosensitive liposome functionalized with SA-HA conjugate. Average initial concentration of cisplatin: $1.7 \pm 0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Data expressed as mean \pm standard error (n = 5 batches). p < 0.05 (Tukey test).

3.2.5 Small-angle X-ray scattering (SAXS)

Finally, we evaluated the effects of HA and CDDP on the supramolecular organization of lipid bilayer after exposure to warming conditions. SAXS measurements of formulations with CDDP (TSL-CDDP-HA and TSL-CDDP-SA-HA) or without CDDP (TSL, TSL-HA, and TSL-SA-HA) were carried out in a temperature range of 25°C at 50°C, using a heating rate of 1°C/min in an in-situ DSC equipment adapted to the synchrotron beamline.

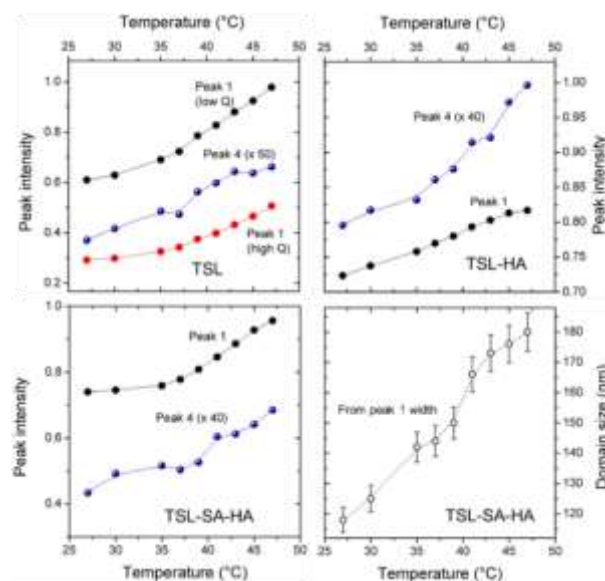
The data obtained clearly indicates that the liposomes destabilize in conditions of moderate hyperthermia, which was confirmed by the SAXS analysis of the dry samples. SAXS profiles of liposomes without CDDP are shown in Fig 5. A sequence of peaks with Bragg reflection periodicity of 1, 2, 3, and 4, characteristic of a lamellar organization, was observed in all formulations evaluated, regardless of the temperature employed. From the position of the first-order peak, we determined the interplanar spacing between adjacent lamellae. Values close to 6 nm, typical of formulations in a lamellar organization, were obtained at all formulations and temperatures evaluated.

Figure 5: Upper panels: SAXS patterns of TSL, TSL-HA, and TSL-SA-HA obtained at different temperatures. The indexes represent Bragg reflections corresponding to lamellar phases. Lower panels: Intensity profile as a function of the scattering vector (Q) obtained from the first-order peak. The arrows indicate intensity increase (\uparrow), and peak narrowing ($\rightarrow\leftarrow$).



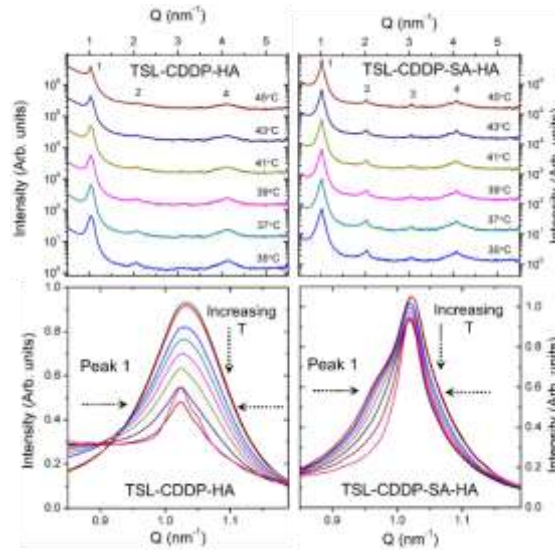
The integrated intensity of the peaks, which is proportional to the volume of ordered structures, increases with temperature through the investigated range (Fig 6). This tendency is also observed for an increase of the size of the ordered domain (L) for liposomes containing the SA-HA conjugate, given by $L = 2\pi/\Delta Q$, where ΔQ is the width of the peak in reciprocal space.

Figure 6: Peak intensity (normalized) and domain size as a function of the temperature extracted from measured positions of peaks 1 and 4 of Fig 4. Dashed lines connecting the data points are guides to the eyes only



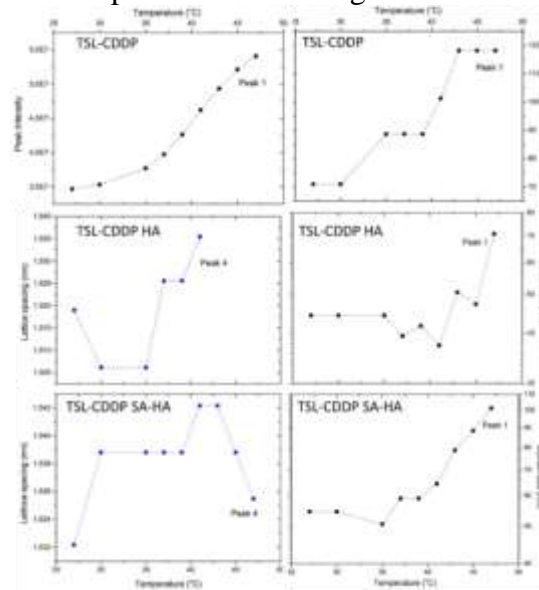
Regarding the diffraction patterns of the formulations containing CDDP (Fig 7), lamellar structures were also identified (Bragg reflections periodicity equal to 1, 2, 3, and 4) at all temperatures studied. In addition, here narrower peaks at lower temperatures (indicated by arrows $\rightarrow \leftarrow$) were observed, while broad peaks were detected at high temperatures.

Figure 7: SAXS intensity profile as a function of the scattering vector modulus q of liposomes with CDDP



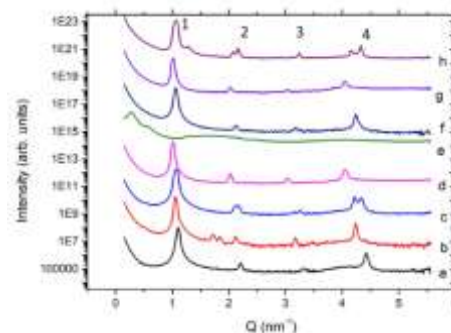
Besides, a shift of the fourth-order peak position to lower Q values with increasing temperature could be observed (Fig 8). The interplanar spacing d in these systems (spacing between lamellae) was given by $d = 2\pi/Q$, where Q is the position of the peak under analysis. For formulations containing CDDP and HA, the reduction of the Q value related to the peak position in the spreading profile is associated with increased bilayer thickness (increased interplanar spacing) (Neunert et al., 2018). This fact is followed by an increase in the size of the ordered domain for all liposomes containing CDDP. For the HA-free formulation (TSL-CDDP), an increase in intensity with temperature was also observed.

Figure 8: Peak intensity, domain size, and lattice spacing as a function of the temperature extracted from peaks 1 and 4 of liposomes containing CDDP and HA



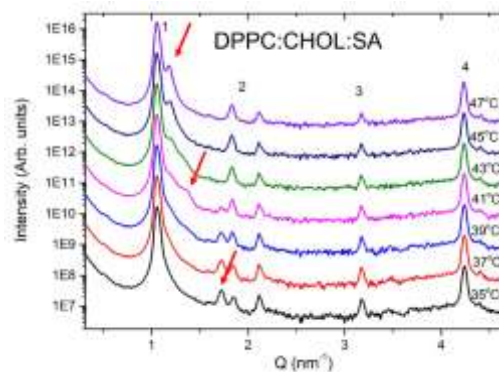
To further investigate the changes mentioned above, SAXS measurements of the mixture of components of the formulations in the quasi-anhydrous conditions were also evaluated at 37°C (Fig 9). It was possible to observe well-defined peaks and periodicity of Bragg reflections in the 1, 2, 3, 4 sequence, except for the sample containing SA-HA conjugate (Fig 9, profile indicated by the letter “e”). This can be explained by the existence of a more complex multicomponent system, evidenced experimentally by the presence of only first-order peak (high-order peaks disappear). The great entropy of the mixture in these conditions occurs as a consequence of a larger number of molecular species competing for the interaction with the lipids (Monteiro et al., 2018).

Figure 9: SAXS patterns of anhydrous samples, obtained at 37°C. (a) DPPC (b) DPPC:CHOL (c) DPPC:CHOL:SA (d) DPPC:CHOL:SA:HA (e) DPPC:CHOL:AS:SA-HA (f) DPPC:CHOL:SA CDDP (g) DPPC:CHOL:SA CDDP HA (h) DPPC:CHOL:AS:SA-HA CDDP



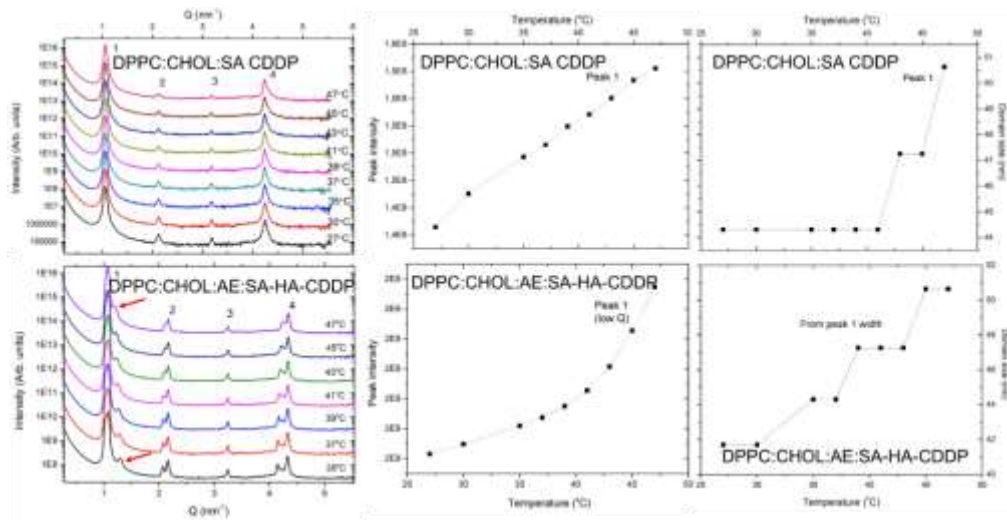
In the anhydrous mixture containing CDDP:CHOL:SA (Fig 10), an increase in intensity was observed again with increasing temperature, as was observed for its corresponding hydrated sample (Fig 6 - TSL). In addition, in the absence of water, it was still possible to observe a change in the position of peak 1', retrieved at low temperatures for Q values slightly below that of the 2nd order peak (indicated by the red arrow) and drifting towards lower values of Q with increasing temperature. This effect is again associated with an increase in the thickness of the bilayer (increase in the network spacing), as previously mentioned.

Figure 10: SAXS intensity profile as a function of the scattering vector modulus q and Peak intensity as a function of the temperature, of DPPC:CHOL:SA anhydrous sample



In samples containing CDDP and HA (Fig 11), it was also possible to infer that the presence of these substances does not interfere with the thermosensitivity property of the system since it was possible to observe the same changes in intensity and domain size in these dry samples. It was also possible to visualize a change in the position of peak 1', from a higher to a lower Q value (red arrow) with increasing temperature, for the anhydrous sample containing the SA-HA conjugate, indicating an increase in the distance between adjacent lamellae (increasing interplanar distance). This fact was also observed for the corresponding hydrated sample (Fig 8 - TSL-CDDP-SA-HA), ideal for allowing the release of the drug under heating conditions.

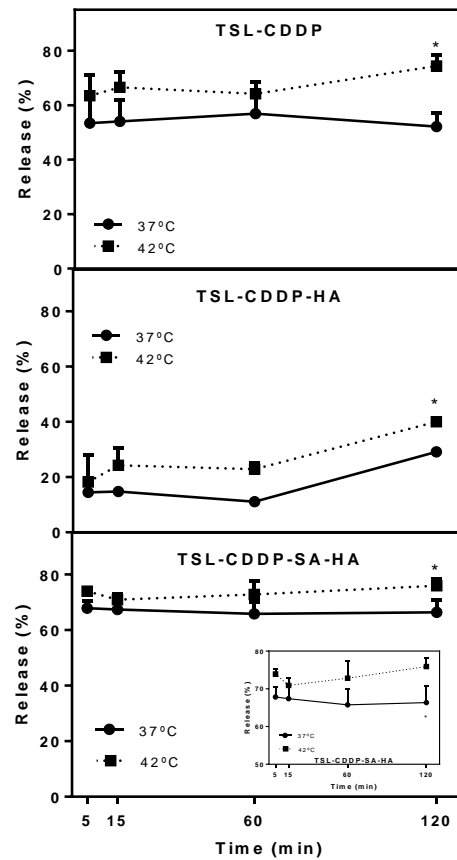
Figure 11: Peak intensity and domain size as a function of the temperature extracted from peaks 1 and 1 high Q of anhydrous samples containing CDDP and HÁ



3.3 *In vitro* release analyses

The results of the temperature-dependent CDDP release are shown in Fig 12. By analyzing each formulation individually, there were no significant differences in the release of CDDP between the temperatures of 37°C and 42°C up to 60 min. However, after 120 min, at 42°C , a higher release occurred compared to the same timeframe at 37°C . Additionally, the electrostatically HA-coated liposomes showed a lower CDDP release compared to TSL-CDDP and TSL-CDDP-SA-HA.

Figure 12: Temperature-dependent CDDP release from TSL-CDDP, TSL-CDDP-HA, and TSL-CDDP-SA-HA



* represents a significant difference compared to 37°C. Data expressed as mean \pm standard error ($n = 3$ batches). $p < 0.05$ (Tukey test).

4 DISCUSSION

Thermosensitive liposomes associated with moderate hyperthermia have emerged as an approach to improve the therapeutic efficacy of antitumor drugs. These systems release the drug specifically to the heated region after the tumor reaches a temperature of approximately 40 to 46°C (Behrouzki et al., 2016; Vaupel, 2004; Vaupel et al., 1989). Previous studies have demonstrated a significant release of antitumor drugs from these nanosystems associated with warming (Lokerse et al., 2017; Peller et al., 2016; Willerding et al., 2016). In addition, to promote the active targeting of the drug to the tumor region, the use of specific ligands has been widely investigated. The HA is an anionic polymer that might contribute to reduce the adsorption of blood proteins, increase the blood circulation time, as well as act as a targeting ligand for the tumor region by specific interaction with CD44 receptors overexpressed in many types of cancer (Hornof & Urtili, 2008; Jiang et al., 2014). It is well described that HA-coating

increases the cell uptake by endocytosis as well as decreases blood clearance (Qhattal et al., 2014).

Thus, two formulations composed of DPPC:CHOL:SA, using different molar ratios 90:5:5 (TSL-90) and 95:2.5:2.5 (TSL-95) decorated with HA were developed and characterized. The use of SA in the liposome composition provides a positive surface charge, facilitating its interaction with negatively charged substances such as HA (Mattheolabakis et al., 2012). Here, we test two different concentrations of SA to achieve the best composition for electrostatic interaction. TSL-90 and TSL-95 showed, as expected, positive zeta potential values that are suitable for further functionalization with HA. Both liposomes showed vesicles distributed evenly over a small size range (Fig 2). It is known that nanoparticles with a size range of 70 to 200 nm often demonstrate a prolonged blood circulation time and better results in antitumor therapies (Ravar et al., 2016). Concerning the HA-coating, a previous study showed that with the addition of a large amount of HA in the preparation, the individual cationic liposomes are rapidly coated, favoring the dispersion of the vesicles without aggregation (Gasperini et al., 2015). Our results showed mean diameter and PDI data characteristics of homogeneous formulations (Table 2), indicating the absence of aggregation of vesicles after functionalization with this molecule. The efficiency of coating in the liposome surface was attributed to zeta potential values close to neutrality, indicating the neutralization of positive charges from SA by negative from HA (da Silva Tinoco et al., 2018). Similar results were observed after HA-decorating by electrostatic interaction and covalent bonding. Likewise, Ravar and collaborators also prepared a targeted liposomal formulation of paclitaxel using hyaluronic acid Liposomes had a particle size of 106.4 ± 3.2 nm and a weakly negative zeta potential of -9.7 ± 0.8 mV, confirming the efficiency of coating (Ravar, et al., 2016).

Since the fluidity of the bilayer is a determining factor in the drug's release profile from thermosensitive liposomes, we also investigated the phase transition temperature of the formulations using DLS, DSC, and SAXS analyses (Biltonen & Lichtenberg, 1993). DLS data (Fig 3A and 3B) showed a significant reduction in the average diameter and Kcps of the formulations evaluated from 40°C. These findings may be related to a conformational change in the carbon chains due to the change $L\alpha$ to $L\beta$ phase as well as the rupture of the liposomal membrane caused by heating (Jung, 2000; New, 1990). Similar results were also observed by Maia and collaborators (2019) for thermosensitive liposomes composed of DPPC:DSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀ in a lipid molar ratio of 80:15:5 and DPPC:MSPC:DSPE-PEG₂₀₀₀ in lipid molar ratio of 85:10:5 (Maia, Chaves et al., 2021). In line with these data, a change in

the calorimetric parameters of the formulation with lower SA concentration was also observed (Fig 3C and 3D). This fact can be attributed to high order-disorder in the packing of phospholipid molecules, causing decreasing cooperativity of the main transition and more fluidization of the TSL-95 (Neunert et al., 2018). It was also observed that the HA-decorating did not alter the T_c of the formulations (Fig 4). As HA is a hydrophilic molecule, it does not interfere with the lipid-lipid packaging and, consequently, the phase transition energy and the T_c were not altered. Then, considering that the success of therapy with thermosensitive liposomes has been attributed to the association with hyperthermia techniques, being moderate hyperthermia (40 to 46 °C) the most used procedure in antitumor therapy (Ahmed & Zaidi, 2013; Chatterjee et al., 2011; Willerding et al., 2016) the formulation TSL-95 would be adequate for the propose of cancer treatment.

Some studies report that the permeability of the lipid bilayer enhances above the T_c ; however, the diffusion rate of compounds through DPPC liposomes may occur before reaching the T_c due to a conformational change in the vesicles (Chen et al., 2013; Papahadjopoulos et al., 1973). Thus, even though T_c determination is a classic method for permeability liposome evaluation, the data do not have a direct correlation. In this sense, we carried out SAXS analysis to better understanding the behavior of the liposomal formulations. The SAXS profile of all formulations studied was characteristic of a lamellar organization regardless of the temperature evaluated. Such structural condition of the lamellar phase is in agreement with previous studies for anionic liposomes composed of DOPE, oleic acid, and cholesterol (De Oliveira et al., 1998, 2000), as well as for liposomes made of DOPE and CHEMS (S. M. L. Silva et al., 2011). However, with increasing temperature, blank TSL exhibits an increase in the SAXS peak intensity (Fig 5 and 6). This finding suggested an increase in the number of vesicles (when peak intensity increases but does not change its width), as well as their size (when peaks become narrow), under heating. Such phenomenon may be ascribed to a dilation of the bilayer, caused by local misorientation in the structure of the lipids, confirming the conformational alteration described before.

Then, a hydrophilic drug was incorporated into the thermosensitive formulation. To the best of our knowledge, this is the first report of HA-coated thermosensitive liposome containing CDDP for the treatment of cancer. No physicochemical changes, such as mean diameter, PDI, and zeta potential (Table 3), were observed after adding CDDP. Similar results were observed in previous studies carried out by our research group in pH-sensitive formulations (Leite, Souza, et al., 2012; Santos Giuberti et al., 2011). For the formulations containing CDDP and

functionalized with HA, SAXS diffractograms exhibit broader peaks at high temperatures (Fig 7). Such observation may be related to diffuse scattering which is generated by less ordered structures. This indicates a substantial change in the bilayer structure at high temperatures formed as a consequence of the fluidization of the bilayer (Neunert et al., 2018). Furthermore, for TSL-CDDP, an increase in intensity was also observed, again showing a possible increase in the volume of the liposomes ordered in the lamellar phase at high temperatures (Fig 8).

In the same perspective of trying to elucidate the behavior of these thermosensitive formulations, the *in vitro* release profile was performed (Fig 12) and showed that possible drug adsorption in the phospholipid bilayer may be generating the diffusion rate of CDDP before reaching T_c (42°C), for TSL-CDDP and TSL-CDDP-SA-HA. According to Ruano and his collaborators (2020), during the permeation process of CDDP in lipid bilayers, in addition to interactions with the polar head, there are also attractive interactions between the drug and apolar chain which is dominated by Van der Waals interactions, that these interactions correspond to 40% of the total energy of the CDDP/lipid bilayer interaction (Ruano et al., 2020). For TSL-CDDP-HA, the presence of the polymer may be modulating this diffusion, generating a more controlled and slow release profile. Due to the electrostatic interactions between negatively charged HA and positively charged SA, a steric barrier is formed. This barrier, likely, modulates the release of the encapsulated drug and therefore, its release kinetics (El Kechai et al., 2017).

5 CONCLUSIONS

In the present study, it was demonstrated that the presence of HA, SA-HA and CDDP does not alter the thermosensitivity of the system. Therefore, our study brings substantial information to validate the feasibility of the CDDP-loaded thermosensitivity liposome as a potential nanoformulation to improving the therapeutic efficiency of CDDP. However, further *in vitro* and *in vivo* assays must be conducted to confirm the insights presented by this study.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS), Brazil, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) for their financial support and fellowships. The authors also thank the Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares of Universidade

Federal do Espírito Santo (<http://labiom.ufes.br/>), for providing the equipment and technical support for experiments involving microcalorimetric analysis.

**CAPÍTULO 2: LIPOSSOMA TERMOSENSÍVEL DE CISPLATINA
FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO HIALURÔNICO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN
VIVO***

**Trabalho em fase de redação para submissão em periódico indexado na área de
Farmácia**

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento *in vitro* e a toxicidade *in vivo* da formulação lipossomal termossensível (LTS) funcionalizada com ácido hialurônico (AH) contendo cisplatina (CDDP). Foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) e análise da morfologia nuclear dessa mesma linhagem celular, para fins de estudo da influência da nossa formulação frente aos núcleos celulares. Além disso, foi realizado um estudo de toxicidade *in vivo*, utilizando camundongos Swiss sadios. Os resultados mostraram maior citotoxicidade da formulação catiônica (LTS-CDDP) em comparação com CDDP livre, bem como aumento da ocorrência de senescência nos núcleos tratados com essa formulação. Além disso, o uso de hipertermia nos grupos tratados com LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1 aumentou a ocorrência de apoptose em relação aos grupos sem hipertermia. Não foi observada diferença significativa da formulação LTS-CDDP-AH-2 em relação a CDDP livre em nenhum estudo *in vitro* realizado, portanto essa formulação não foi usada no estudo posterior *in vivo*. Quanto aos resultados de toxicidade *in vivo*, foi observado que a formulação catiônica, além de ser tóxica para células cancerígenas (resultado *in vitro*), também foi tóxica para células saudáveis, sendo observado a ocorrência de nefrotoxicidade nos animais tratados com LTS-CDDP. Já a formulação contendo AH, foi capaz de eliminar os danos conhecidos relacionados ao uso de CDDP, uma vez que os animais tratados com essa formulação não apresentaram alterações significativas nos exames hematológicos e bioquímicos, bem como nas análises histológicas. Dessa forma, conclui-se que a formulação proposta para veiculação de cisplatina, termossensível e contendo AH, apresentou características importantes para uma possível diminuição da toxicidade relacionada a esse fármaco, representando uma alternativa potencial para o tratamento do câncer.

1 INTRODUÇÃO

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II), CDDP) é um fármaco antineoplásico usado no tratamento de muitos tumores sólidos, incluindo os de cabeça, pescoço, pulmão, testículo, ovário e mama. É um agente quimioterápico de uso conhecido e altamente eficaz, porém apresenta muitos efeitos tóxicos. Os inconvenientes do uso desse quimioterápico são principalmente nefrotoxicidade severa, mielosupressão, ototoxicidade e neurotoxicidade, além de efeitos adversos como náuseas e vômitos, que podem levar até mesmo à interrupção do tratamento pelo paciente (Alam et al., 2015). No entanto, o principal problema relacionado ao seu uso é a nefrotoxicidade, sendo a forma mais séria e uma das apresentações mais comuns, a lesão renal aguda, que ocorre em 20-30% dos pacientes (Miller et al., 2010). Nesse sentido, diferentes estratégias vem sendo estudadas durante décadas com a finalidade de diminuir a sua toxicidade e aprimorar a sua eficácia antitumoral (Miller et al., 2010).

Uma alternativa que vem sendo amplamente discutida é o uso de lipossomas de CDDP, que atuam como moduladores da farmacocinética e farmacodinâmica. A composição lipídica desses nanocarreadores pode alterar o tempo de meia-vida do fármaco, biodistribuição, permeabilidade, além de permitir um direcionamento para o tumor e, conseqüentemente, reduzir a toxicidade (Ait-Oudhia et al., 2014). Dentre os nanocarreadores amplamente estudados, os lipossomas termosensíveis apresentam muitas vantagens, uma vez que foram projetados para liberar o fármaco especificamente após um aquecimento moderado na região do tumor (hipertermia) (Gomes et al., 2019; Huang et al., 2017; Lokerse et al., 2017).

Como descrito no capítulo 1, a CDDP encapsulada em lipossomas termosensíveis (LTS-CDDP) associado a um sistema de direcionamento ativo (LTS-CDDP-AH-1 e LTS-CDDP-AH-2), pode constituir uma alternativa promissora para contornar os inconvenientes apresentados pela CDDP livre. O potencial termosensível dessas formulações pode permitir uma liberação específica do fármaco no tumor, associado ao uso de hipertermia (Lokerse et al., 2017; Peller et al., 2016), além de um direcionamento ativo devido ao uso do ligante na superfície do lipossoma (Qhattal et al., 2014), aumentando a seletividade de ação e reduzindo os efeitos indesejados.

Pensando em possíveis aplicações clínicas desses nanosistemas termosensíveis no tratamento do câncer, faz-se necessário avaliar a toxicidade pré-clínica dessas formulações. Portanto, foram realizados estudos *in vitro* de citotoxicidade e análise da morfologia nuclear, além de um estudo *in vivo* de toxicidade aguda após administração por via intravenosa (IV) em camundongos Swiss sadios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

O ácido hialurônico (AH) 4 kDa foi fornecido pela Innovasell (São Paulo, Brasil). A dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foi adquirida da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O colesterol (CHOL) e a estearilamina (SA) foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). A cisplatina foi adquirida da Quiral Química do Brasil (Juiz de Fora, Brasil). As membranas de polycarbonato foram adquiridas na Millipore (Billerica, EUA). O dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) foi fornecido pela Sigma-Aldrich Company (St. Louis, EUA). A água utilizada para preparar todas as soluções e amostras foi purificada em um sistema Milli-Q® Direct-Q3 Millipore (Billerica, EUA). A linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 foi adquirida da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina e sulforrodamina foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). Os camundongos utilizados no estudo foram obtidos do Biotério da Faculdade de Farmácia - UFMG (Belo Horizonte, Brasil). Os kits para análises bioquímicas foram obtidos das empresas Labtest (Lagoa Santa, Brasil) e Bioclin (Belo Horizonte, Brasil). Todos os outros produtos químicos eram analíticos ou de grau HPLC e foram usados sem purificação adicional.

2.2 Preparo dos lipossomas termosensíveis de cisplatina (LTS-CDDP)

As formulações lipossomais foram preparadas como descrito no capítulo I, item 2.3.

2.3 Caracterização

2.3.1 Determinação do diâmetro e potencial zeta

O diâmetro médio e o índice de polidispersão (PDI) das vesículas foram determinados por Espalhamento de luz dinâmico (DLS) a 25 °C usando um ângulo fixo de 90 ° (Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas 40 vezes em solução de NaCl a 0,9% (p/v) previamente filtrada (filtro de 0,45 µm, Millipore).

O potencial zeta foi determinado por DLS associado à mobilidade eletroforética das vesículas a uma temperatura de 25 °C empregando um ângulo fixo de 90° (equipamento Zetasizer Nano ZS 90, Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas 40 vezes em NaCl 1 mM filtrado (filtro de 0,45 µm, Millipore). Todos os resultados foram expressos como a média ± erro padrão de três lotes de cada formulação.

2.3.2 Teor de encapsulação de cisplatina

A porcentagem de encapsulação (EP) de CDDP nas formulações lipossomais foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um método de derivatização com dietilditiocarbamato de sódio (DDTC) (Tezcan et al., 2013; Toro-Córdova et al., 2016). Este parâmetro foi baseado na determinação da concentração de CDDP nos lipossomas antes (lipossomas não purificados) e após a centrifugação (lipossomas purificados). Resumidamente, acetonitrila (500 µL) foi adicionado a uma alíquota de lipossoma (250 µL) seguido por agitação em vórtex por 1 min e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante (250 µL) foi transferido para um eppendorf e seco sob atmosfera de N₂. O produto residual foi ressuscitado em 1mL de NaCl a 0,9% (p/v) e 250 µL foram usados para reagir com uma solução de DDTC em NaOH (600 µL de uma solução 1mM). As amostras foram incubadas a 37 °C por 60 min e extraídas com 250 µL de clorofórmio. Após a separação das camadas, a camada clorofórmica foi filtrada através de um filtro de 0,45 µm e injetada no sistema cromatográfico.

O aparelho cromatográfico foi equipado com um desgaseificador, uma bomba quaternária (G1311B), um forno de coluna (G1316A), um amostrador automático (G1329B) e um detector de matriz de diodos (DAD) (G4212B), acoplado ao programa de integração EzChrom (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A separação foi realizada a 25 °C usando uma coluna Hypersil C18 250 x 25 mm, tamanho de partícula de 5 µm (Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A fase móvel consistiu de uma mistura de metanol e água (65:35 v/v), em fluxo isocrático. A vazão foi de 1,5 mL/min e as amostras (20 µL) foram monitoradas a 254 nm. A curva padrão de seis pontos (5, 7,5, 10, 15, 20 e 50 µg/mL) vs. área sob a curva foi obtida previamente por análise de regressão linear. A equação linear determinada foi $y = 2879250,31x - 10217144,16$ e $r = 0,9964$.

2.4 Experimentação in vitro

2.4.1 Cultura celular

Células de tumor de mama humano da linhagem MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura DMEM, suplementado com FBS (10% v/v), penicilina (1% p/v) e estreptomicina (1% v/v). As culturas foram mantidas em uma incubadora umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Ao atingir o estágio de confluência, as células foram tripsinizadas e uma alíquota foi transferida para outro frasco contendo meio de cultura completo para subcultura.

2.4.2 Viabilidade celular *in vitro*

Células MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 96 poços a 1×10^4 células/poço ($n=3$). Estas foram pré-incubadas por 24h em estufa de 5% de CO₂, a 37°C. Posteriormente, as células foram tratadas com LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1, LTS-CDDP-AH-2, e CDDP livre nas concentrações 0,19; 0,39; 0,70; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 µM e as respectivas formulações brancas. Esse experimento foi conduzido com e sem hipertermia para efeitos de comparação. Dessa forma, a placa sem hipertermia foi mantida por 48h a 37 °C em estufa de CO₂, e a placa com hipertermia foi mantida por 6h a 37°C, posteriormente 1h a 42°C e, em seguida a 41h a 37°C em estufa de CO₂. Foi usado um termoshaker (KS 4,000 I control, IKA, Wilmington, USA) com agitação a 50 rpm, 1h, 42°C (Al-Ahmady et al., 2014; Alavizadeh et al., 2017). Foram feitas imagens de microscopia em campo claro após aquecimento e após 48h de incubação e a viabilidade celular foi então avaliada por ensaio com sulforrodamina e a leitura realizada em leitor de Elisa VersaMax™ (Molecular Devices, LLC. San Jose, CA). A IC₅₀ foi obtida por análise de regressão não linear utilizando software GraphPad Prism® Version 6.0 (GraphPad Software Inc).

2.4.3 Análise da Morfologia nuclear

Células da linhagem MDA-MB-231 foram plaqueadas em placas de 6 poços a 1×10^4 células/poço. Estas foram pré-incubadas por 24h em estufa de 5% de CO₂, a 37°C. Posteriormente as células foram tratadas com LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1, LTS-CDDP-AH-2 e CDDP livre, na IC₅₀ de cada formulação. Esse experimento foi conduzido com e sem hipertermia para efeitos de comparação. Dessa forma, a placa sem hipertermia foi mantida por 48h a 37 °C em estufa de CO₂, e a placa com hipertermia foi mantida por 6h a 37°C, posteriormente 1h a 42°C e, em seguida a 41h a 37°C em estufa de CO₂. Foi usado um shaker termoshaker (KS 4,000 I control, IKA, Wilmington, USA) com agitação a 50 rpm, 1h, 42°C. Após as 48h de tratamento, as células foram fixadas com formaldeído 4% por 10 min e, em seguida, coradas com uma solução Hoescht 33342 (0,2 µg/mL) durante 10 min à temperatura ambiente no escuro. As imagens de fluorescência dos núcleos foram obtidas usando um microscópio AxioVert 25 com um módulo de fluorescência Fluo HBO 50 conectado à câmera Axio Cam MRC (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os núcleos foram analisados usando o Software Image J 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, 2016) e o plugin “NII_Plugin” disponível em <http://www.ufrgs.br/labsinal / NMA />.

2.5 Experimentação in vivo

2.5.1 Estudo de toxicidade in vivo

Camundongos Swiss fêmeas, com 4–6 semanas de idade, 15 – 17 g, foram obtidos na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas com livre acesso a comida e água e mantidos em área com controle de ciclo claro/escuro. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 218/2020). Os animais foram separados em quatro grupos, de acordo com o tratamento a ser recebido, sendo 6 animais por grupo. Os animais receberam por via intravenosa os tratamentos com LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1, CDDP livre e o grupo controle foi tratado com NaCl 0,9% (p/v). A dose administrada foi de 10 mg/kg, escolhida com base no estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual a dose máxima tolerada (DMT) para camundongos fêmeas tratadas com CDDP livre foi próxima de 10mg/kg (Leite et al., 2012). Durante 14 dias, as modificações de comportamento e o peso dos camundongos foram monitorados. Além disso, o momento em que os sinais de toxicidade ou mortes ocorreram também foram registrados. Exames hematológicos e bioquímicos foram realizados em todos os animais sobreviventes após 14 dias de tratamento. Para isso, no final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (15 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg), e amostras de sangue foram coletadas do plexo braquial e transferido para tubos contendo EDTA 0,18% (p/v). O soro foi obtido por centrifugação de sangue a 5000 rpm por 6 min. Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram contagem de glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina, hematócrito, glóbulos brancos (WBC) e contagem de plaquetas. Todas as análises foram determinadas usando um analisador automático (Hemovet® 2300). A função hepática foi avaliada medindo a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A nefrotoxicidade foi determinada pela concentração sérica de uréia e creatinina. Todos os ensaios bioquímicos foram realizados com um analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) utilizando-se kits de ensaio da Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil).

2.5.2 Avaliação histopatológica

Para análise histopatológica, os rins, o fígado, o baço, intestino e a medula óssea foram removidos e fixados em formol tamponado a 10% (v/v). Os fragmentos dos tecidos foram incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm de espessura e corados pelo

método hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas por um patologista e as imagens foram obtidas usando um microscópio óptico conectado a uma câmera.

2.6 Análise estatística

As análises de normalidade e homogeneidade de variância foram realizadas pelos testes de D'Agostino e Pearson e Bartlett. As variáveis que não seguiram uma distribuição normal foram transformadas como log (variável). Os dados de caracterização de lipossomas, estudos *in vitro* e *in vivo* foram testados usando análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, teste t de Student e, teste de Bonferroni, sendo o último usado nos estudos de citotoxicidade *in vitro*. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05. O programa usado para todas as análises estatísticas foi GraphPad Prism 6.0.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização

3.1.1 Diâmetro médio, PDI, potencial zeta e EP

Na análise da Tabela 1, o diâmetro médio das vesículas e índice de polidispersão indicam vesículas distribuídas uniformemente em uma pequena faixa de tamanho. Em relação ao revestimento de AH, o potencial zeta próximo da neutralidade confirma o sucesso do revestimento da superfície dos lipossomas e os resultados mostraram diâmetro médio e dados de PDI de formulações homogêneas. A porcentagem de encapsulação da CDDP nos LTS foi inferior ao encontrado por Leite e colaboradores (2012), provavelmente devido a rigidez da membrana característica de lipossomas termossensíveis, compostos por lípides rígidos (Huang et al., 2017).

Tabela 1: Caracterização dos lipossomas termossensíveis de cisplatina

Formulação	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	Encapsulação (µg/mL)	PE (%)
LTS-CDDP	104,1 ± 1,9	0,14 ± 0,01	+ 21,4 ± 0,3	266,3 ± 19,9	13,7 ± 1,8
LTS-CDDP-AH-1	103,6 ± 2,2	0,06 ± 0,01	+ 0,3 ± 1,4	239,7 ± 12,7	13,1 ± 0,9
LTS-CDDP-AH-2	85,9 ± 0,6	0,12 ± 0,02	+ 10,7 ± 1,9	133,6 ± 19,3	8,1 ± 0,6

LTS-CDDP: lipossoma termossensível contendo CDDP; LTS-CDDP-AH-1: lipossoma termossensível funcionalizado com AH (24 mg/mL) por interação eletrostática; LTS-CDDP-AH-2: lipossoma termossensível funcionalizado com conjugado SA-AH. Concentração inicial média de cisplatina: 1,8 ± 0,1 mg/mL. Dados expressos como média ± erro padrão (n = 3 lotes). p<0,05 (teste de Tukey).

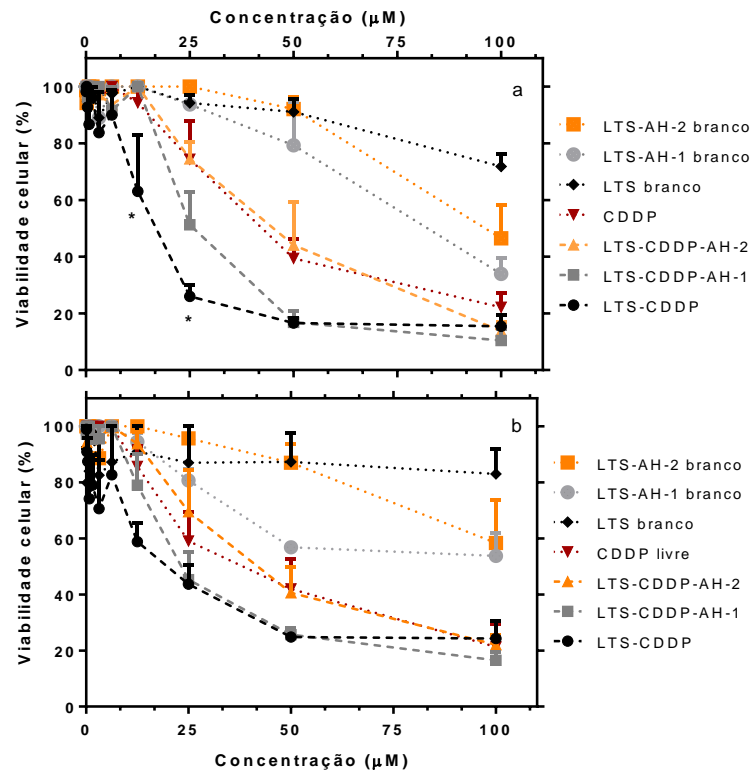
3.2 Experimentação *in vitro*

3.2.1 Viabilidade celular *in vitro*

No presente estudo a citotoxicidade das formulações brancas e contendo o fármaco, bem como o fármaco livre, foi avaliada pelo método de sulforrodamina. Para isso foi selecionada a linhagem de célula MDA-MB-231 como modelo *in vitro*, uma célula de câncer de mama triplo-negativo (TNBC), que expressa grande porcentagem de receptores CD44 (>30%), os quais são receptores para AH (Sheridan et al., 2006).

Para os tratamentos associados a CDDP, uma redução da viabilidade celular foi observada à medida que a concentração de CDDP foi aumentada (Figura 1). Considerando o tratamento com a formulação de LTS-CDDP sem hipertermia, foi possível verificar que nas concentrações de 12,5 μM e 25 μM a viabilidade celular foi significativamente reduzida em comparação com CDDP livre ($p < 0,01$). O valor de CI_{50} para essa formulação foi de 16,61 μM , demonstrando maior efetividade citotóxica em comparação com CDDP livre (Tabela 2). Já as formulações contendo AH, tanto por interação eletrostática como por ligação covalente (LTS-CDDP-AH-1, LTS-CDDP-AH-2 respectivamente) não apresentaram diferença significativa em relação ao fármaco livre.

Figura 1: Viabilidade celular de MDA-MB-231 após tratamento com as diferentes formulações (a) Sem HT e (b) com HT



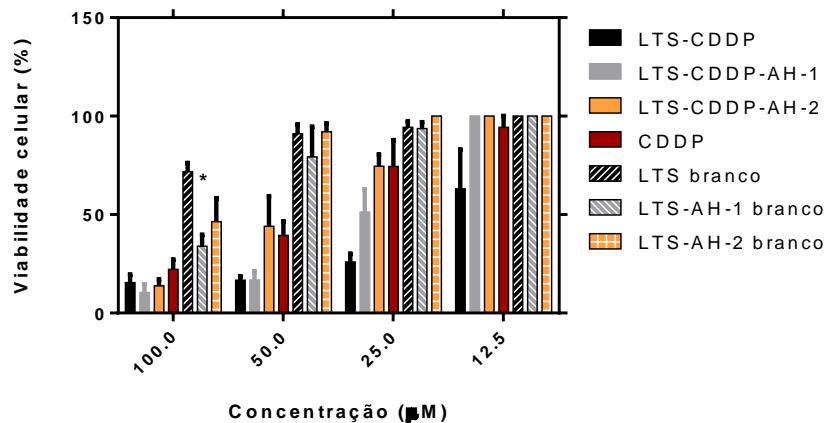
Dados expressos como média \pm erro de 3 experimentos independentes. *Representa diferença significativa quando comparado a CDDP livre. $p < 0,01$ (Teste Bonferroni).

Na Tabela 2, nota-se ainda, que as formulações brancas testadas não apresentam atividade citotóxica expressiva, exceto na maior concentração. Esses dados indicam que estas formulações apresentam citotoxicidade desprezível quando comparadas com as formulações contendo o fármaco. No entanto, LTS-AH branco apresentou uma CI_{50} de 98,98 μM , e na concentração de 100 μM , apresentou diminuição significativa da viabilidade celular em comparação com LTS-branco, sem hipertermia, indicando maior citotoxicidade, que pode ser melhor visualizado na Figura 2. Contudo, o lipossoma branco contendo AH de forma conjugada (LTS-SA-AH) se comportou como a formulação branca sem AH (LTS branco), indicando uma citotoxicidade desprezível quando comparada com as formulações contendo o fármaco, ao contrário do observado para o lipossoma branco contendo AH por interação eletrostática (LTS-AH). Isso provavelmente pode ser explicado pela concentração de AH usada no desenvolvimento de cada formulação, sendo que para realizar a funcionalização por interação eletrostática é usado AH em excesso (2 AH:1 LTS).

Tabela 2: CI₅₀ e intervalo de confiança em linhagens de célula MDA-MB-231

Tratamentos	CI ₅₀ C/HT (μ M)	CI C/HT	CI ₅₀ S/HT (μ M)	CI S/HT
LTS-CDDP	17,03	10,9 a 26,5	16,61*	11,4 a 24,1
LTS branco	344,1	131 a 904	312,8	222,9 a 439,0
LTS-CDDP-AH-1	28,33	21,6 a 37,0	30,57	21,4 a 43,6
LTS-AH branco	98,98	82,37 a 118,9	113,5	78,31 a 164,5
LTS-CDDP-AH-2	48,29	35,9 a 64,8	49,74	36,1 a 68,4
LTS-SA-AH branco	204,7	135,1 a 310,1	181,4	122,3 a 269
CDDP LIVRE	42,06	32,2 a 54,9	50,29	37,5 a 67,2

Dados expressos como média \pm erro de 3 experimentos independentes. *Representa diferença estatística quando comparado a CDDP livre. $p < 0.05$ (Teste t-Student). **Abreviações:** CI₅₀- concentração de CDDP necessária para promover 50% de inibição da viabilidade celular. CI- intervalo de confiança. C/HT- Com Hipertermia. S/HT- Sem Hipertermia.

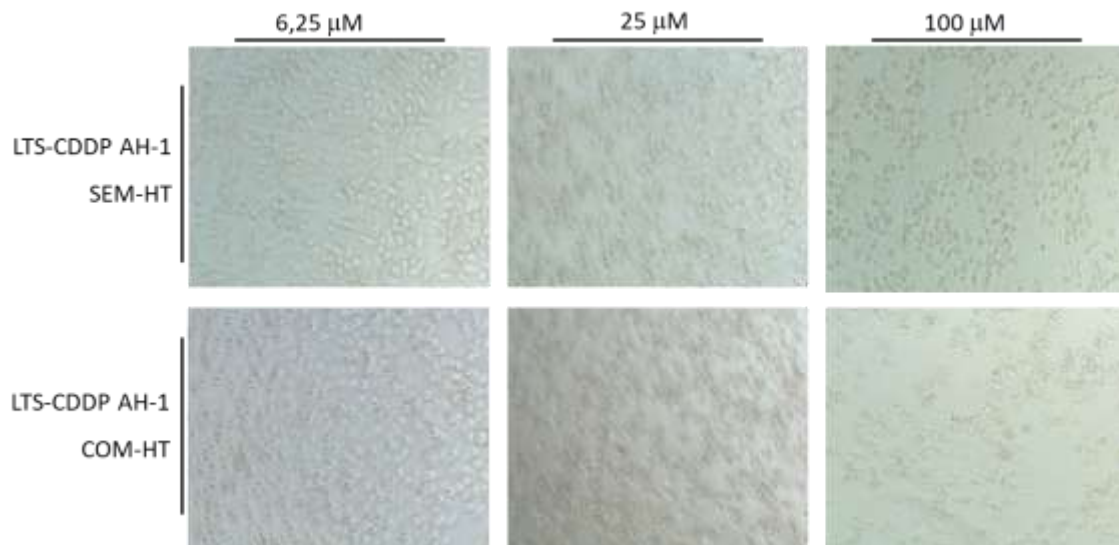
Figura 2: Viabilidade celular de MDA-MB-231 após tratamento com as diferentes formulações sem HT, nas concentrações de 12,5; 25 e 100 μ M.

Dados expressos como média \pm erro de 3 experimentos independentes. *Representa diferença estatística quando comparado a LTS branco. $p < 0.01$ (Teste Bonferroni).

Além disso, pode-se observar que não houve diferença de citotoxicidade entre as formulações com e sem HT, provavelmente devido ao protocolo de aquecimento empregado. Hoda e colaboradores (2017) aplicaram um protocolo de hipertermia diferente do desenvolvido no presente estudo, no qual as células foram aquecidas por 1h a 37 ou 42 °C em meio completo e então incubadas por apenas 3 h a 37 °C em uma incubadora de CO₂. Em seguida as placas foram lavadas e substituídas por meio livre de lipossomas e incubadas por mais 48h a 37° C (Hoda et al, 2017). Essa substituição do meio poderia evitar morte celular por igual nas placas com e sem hipertermia, permitindo assim uma melhor visualização dos resultados. Nas imagens de microscopia em campo claro após 48h de tratamento (**Figura 3**) foi observado que, apenas para a formulação LTS-CDDP-AH-1 com uma dose de 100 μ M, foi possível visualizar uma menor viabilidade celular com uso de hipertermia. Nessas imagens também foram

observadas alterações da morfologia celular após tratamento com LTS-CDDP-AH-1 em concentrações maiores, com presença de condensação nuclear indicando possível a ocorrência de apoptose (Jänicke et al., 1998).

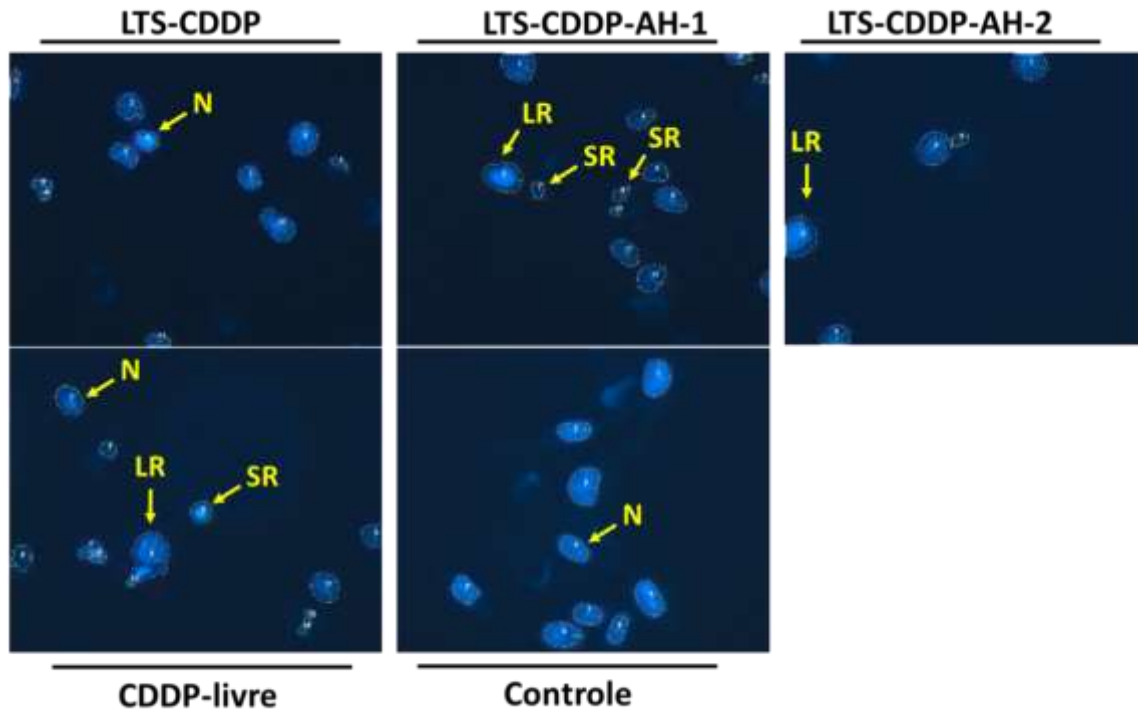
Figura 3: Imagens de microscopia em campo claro, objetiva 20x, após 48h de tratamento com a formulação LTS-CDDP-AH-1, com e sem HT.



3.2.2 Análise da Morfologia nuclear

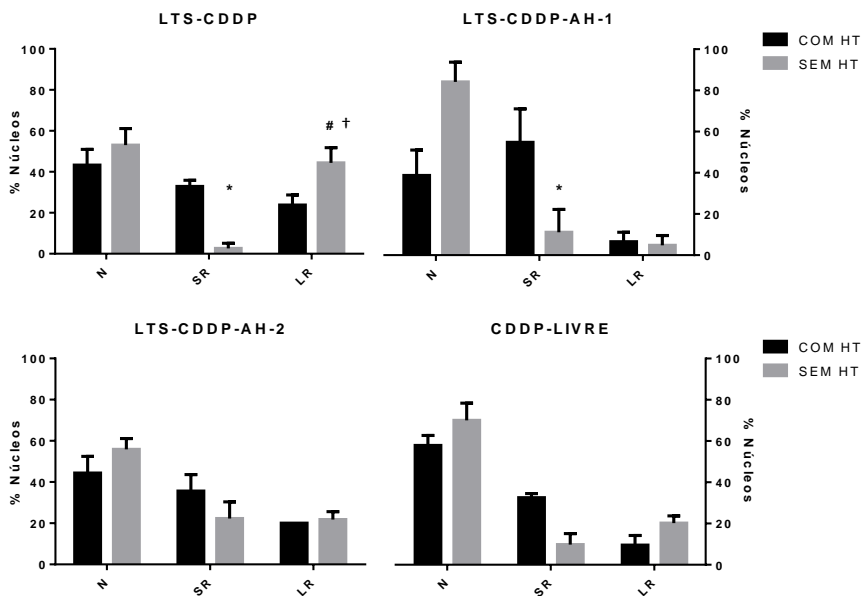
A análise da morfologia nuclear proposta por Filipe-Chiela (2012), utiliza a ferramenta de análise morfométrica nuclear (NMA) e os dados são gerados no software Image J. Essa ferramenta classifica e distribui os núcleos em: normal (N), irregular (I, catástrofe mitótica), pequeno regular (SR, apoptose), pequeno (S, mitose), pequeno irregular (SI, mitose com dano ou fragmentos nucleares), grande regular (LR, senescência) e grande irregular (LI, catástrofe mitótica). A **Figura 4** apresenta as imagens de fluorescência dos núcleos de MDA-MB-231 corados com Hoescht após o tratamento com as formulações e com o fármaco livre, nos quais as alterações nucleares são evidentes quando comparado ao grupo controle.

Figura 4: Imagens de fluorescência de núcleos da linhagem celular MDA-MB-231 corados com Hoescht obtidas após 48h dos diferentes tratamentos na IC₅₀ de cada formulação. Os diferentes fenótipos morfométricos observados são indicados. As imagens são representativas de três experimentos independentes. N, normal; LR, grande regular; SR, pequeno regular



Uma distribuição da classificação dos núcleos tratados com e sem HT foi realizada por meio da ferramenta NMA e está apresentada na **Figura 5**. Uma porcentagem maior de núcleos pequenos regulares (SR) foi observada para os tratamentos com hipertermia, com diferença significativa nas formulações LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1 em relação as mesmas formulações sem hipertermia, o que indica maior ocorrência de apoptose na presença do aquecimento moderado. No entanto, apenas a formulação LTS-CDDP apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com CDDP livre, sendo encontrado maior porcentagem de núcleos LR em relação a CDDP livre, indicando maior ocorrência de senescência no grupo sem hipertermia tratado com LTS-CDDP.

Figura 5: Distribuição morfométrica nuclear da linhagem celular MDA-MB-231 exposta a CI_{50} de diferentes tratamentos por 48 h.



Dados expressos como média \pm erro de 3 experimentos independentes *Diferença significativa em relação ao grupo correspondente com hipertermia. # Diferença significativa em relação a CDDP livre. † Diferença em relação a LTS-CDDP-AH-1. $p < 0.05$ (Teste de Tukey). **Abreviações:** N: normal; SR: pequeno e regular; LR: grande e regular

3.3 Estudo de toxicidade in vivo

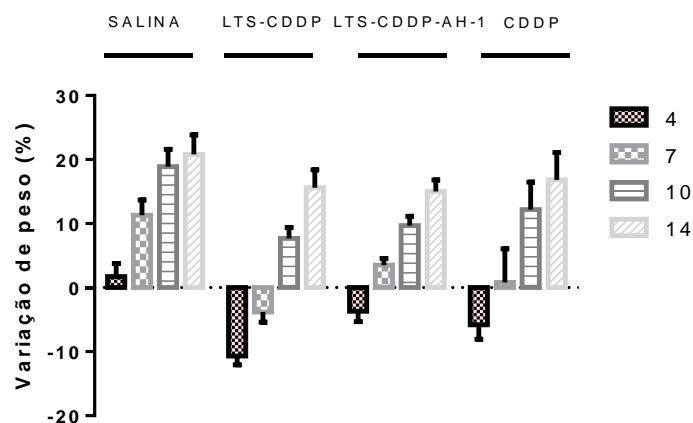
3.3.1 Avaliação dos sinais clínicos, peso e mortalidade dos animais

Para o estudo *in vivo* foram utilizadas as formulações LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH, uma vez que foram as formulações que apresentaram diferença significativa em relação à CDDP livre nos estudos *in vitro*. Foi realizada a administração de CDDP na dose de 10 mg/kg em todos os grupos tratados com base em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Leite et al. 2012). Foi observada uma leve alteração comportamental em todos os grupos, com os animais apresentando-se mais prostrados e com leve piloereção, até 4h após a injeção, com posterior recuperação a partir desse tempo. No entanto, para o grupo tratado com CDDP livre, a piloereção ainda permaneceu em dois animais até o 7º dia após o tratamento, acrescido de um desequilíbrio intestinal, ocorrendo então a morte de um animal nesse dia (Tabela 3). Por outro lado, nenhum sinal de toxicidade extrema e nenhuma morte foram verificados nos grupos controle e tratados com LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1.

Tabela 3: Mortalidade dos camundongos ao longo dos 14 dias de experimento

Tratamento	NaCl 0,9% (p/v)	LTS- CDDP	LTS-CDDP- AH-1	CDDP livre
Nº de animais mortos/ nº tratados	0/6	0/6	0/6	1/6
Dia da morte	-	-	-	7

Foi avaliado também a variação de peso dos animais ao longo dos 14 dias de tratamento (**Figura 6**). Foi observado um ganho de peso corporal dos camundongos tratados apenas com salina. Em contrapartida, uma perda de peso foi observada no período inicial da avaliação para todos os grupos que receberam a CDDP, com uma recuperação do peso a partir do 7º dia para o grupo tratado com LTS-CDDP-AH-1, e a partir do 10º dia para os grupos tratados com CDDP livre e LTS-CDDP. Aqui observa-se que a maior toxicidade observada para LTS-CDDP *in vitro*, também foi constatada, porém em células saudáveis, sugerindo que o lipossoma catiônico pode apresentar certa toxicidade para as células tumorais, mas não de forma seletiva, afetando também células saudáveis, resultando em maior perda de peso dos animais e uma recuperação mais lenta (10º dia). Em contrapartida, no estudo *in vivo*, foi observada uma melhor reação dos camundongos tratados com a formulação LTS-CDDP-AH-1, resultando em menor perda de peso pelos animais e recuperação mais rápida (7º dia).

Figura 6: Variação de peso dos camundongos ao longo dos 14 dias de experimento.

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média.

3.3.2 Investigação hematológica

Os parâmetros hematológicos foram avaliados e estão apresentados na Tabela 4. Mais uma vez podemos sugerir a toxicidade da formulação catiônica LTS-CDDP, até mesmo quando comparado a CDDP livre, sendo que foi observado diferença significativa em relação ao grupo

salina e em relação ao grupo CDDP livre, na série eritrocitária bem como na contagem de glóbulos brancos. O mesmo pode-se dizer do eritrograma, com diminuição de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, comum no período de uso de antitumorais (O'Connell et al., 2015). Não houve diferença nos parâmetros hematológicos entre LTS-CDDP-AH-1 e o fármaco livre.

Tabela 4: Parâmetros hematológicos dos camundongos Swiss tratados com salina, LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1 e CDDP livre

Parâmetros	Salina	LTS-CDDP	LTS-CDDP-AH-1	CDDP livre
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5,1 \pm 0,3	7,8 \pm 0,9 ^{abc}	4,9 \pm 0,6	4,7 \pm 0,5
LINF ($10^3/\mu\text{L}$)	2,8 \pm 0,2	5,0 \pm 0,6 ^{abc}	2,8 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	6,4 \pm 0,1	5,2 \pm 0,1 ^{abc}	5,7 \pm 0,1 ^b	5,6 \pm 0,1 ^b
HGB (g/dL)	13,2 \pm 0,2	10,5 \pm 0,2 ^{ab}	11,4 \pm 0,1 ^b	11,4 \pm 0,3 ^b
HCT (%)	34,1 \pm 0,6	27,7 \pm 0,5 ^{bc}	30,1 \pm 0,5 ^b	31,1 \pm 0,9 ^b
RDW (%)	14,9 \pm 0,3	16,2 \pm 0,1 ^b	15,5 \pm 0,2	15,4 \pm 0,6
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	251,5 \pm 11,5	283,1 \pm 28,8	276,7 \pm 16,9	233,6 \pm 16,3

Dados representados como média \pm erro padrão da média (n= 6 animais), exceto para CDDP livre (n=5). ^a representa diferença em relação ao grupo LTS-CDDP-AH-1. ^b representa diferença em relação ao grupo Salina. ^c representa diferença em relação ao grupo CDDP livre. p<0,05 (teste Tukey). **Abreviações:** **WBC:** contagem de glóbulos brancos; **LINF:** linfócitos; **RBC:** contagem de hemácias; **HGB:** hemoglobina; **HCT:** hematócrito; **RDW:** distribuição de glóbulos vermelhos; **PLT:** contagem de plaquetas.

3.3.3 Investigação bioquímica

A Tabela 5 apresenta os parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal (Ureia e Creatinina) e hepática (ALT e AST). Observou-se uma toxicidade renal causada pelos tratamentos LTS-CDDP e CDDP livre, devido ao potencial tóxico já esperado para essas formulações. Em contrapartida, a formulação contendo AH foi capaz de reduzir o dano renal, uma vez que a presença do polímero neutraliza as cargas positivas da estearilamina presente na composição do lipossoma, diminuindo sua interação com as células saudáveis, podendo sugerir uma maior seletividade de ação. Porém houve um acentuado aumento das enzimas hepáticas (AST e ALT) no grupo tratado com essa formulação.

Tabela 5: Parâmetros bioquímicos dos camundongos Swiss tratados com salina, LTS-CDDP, LTS-CDDP-AH-1 e CDDP livre

Parâmetros	Salina	LTS-CDDP	LTS-CDDP-AH-1	CDDP livre
Ureia	49,2 \pm 2,8	73,1 \pm 2,4 ^{ab}	59,3 \pm 4,6	66,5 \pm 1,0 ^b
Creatinina	0,3 \pm 0,01	0,33 \pm 0,01	0,3 \pm 0,01 ^c	0,4 \pm 0,01 ^b
AST	89,8 \pm 6,3	94,76 \pm 5,2 ^a	121,1 \pm 10,2 ^{bc}	78,1 \pm 2,4
ALT	37,2 \pm 2,1	44,96 \pm 2,8 ^a	65,1 \pm 7,6 ^{bc}	43,5 \pm 3,8

Dados representados como média \pm erro de 6 animais, exceto para CDDP livre (n=5) ^a representa diferença significativa em relação ao grupo LTS-CDDP-AH-1. ^b representa diferença significativa em relação ao grupo Salina. ^c representa diferença significativa em relação ao grupo CDDP livre. p<0,05 (teste Tukey).

3.3.4 Investigação histopatológica

Foi realizada análise histológica de fígado, baço, intestino, rim e medula óssea de todos os grupos estudados. Os cortes histológicos estão apresentados nas Figuras 7 e 8. Não foi encontrado nenhuma alteração aparente em nenhum órgão no grupo controle e no grupo tratado com LTS-CDDP-AH-1.

No grupo tratado com a CDDP livre, foi observado um infiltrado inflamatório e fibrose no rim em apenas um animal (Figura 8), sugerindo uma injúria crônica, provavelmente não causada pelo uso da CDDP. Alterações renais causadas por CDDP livre, foram encontradas em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, apenas a partir de 20mg/kg (Leite et al. 2012).

Para os animais tratados com LTS-CDDP, foi observado lesão glomerular focal, indicada por um espessamento da capsula de Bowman (Figura 8), em todos os animais avaliados desse grupo. Esses resultados mostram uma correlação direta entre os níveis elevados de uréia sanguíneos e a presença de alteração renal, corroborando a alta toxicidade observada para lipossomas catiônicos. No entanto, esse achado foi apenas focal, indicando uma possível recuperação dos animais. Essa toxicidade renal causada pela formulação catiônica, foi eliminada com sucesso com o uso do ligante de direcionamento (AH), uma vez que o grupo tratado com LTS-CDDP-AH-1 não apresentou nenhum tipo de alteração histológica em nenhum órgão analisado.

Figura 7: Fitomicrografia de fígado, baço, intestino e medula óssea de camundongos Swiss tratados com NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1. Coloração de Hematoxilina & eosina. Aumento de 20x.

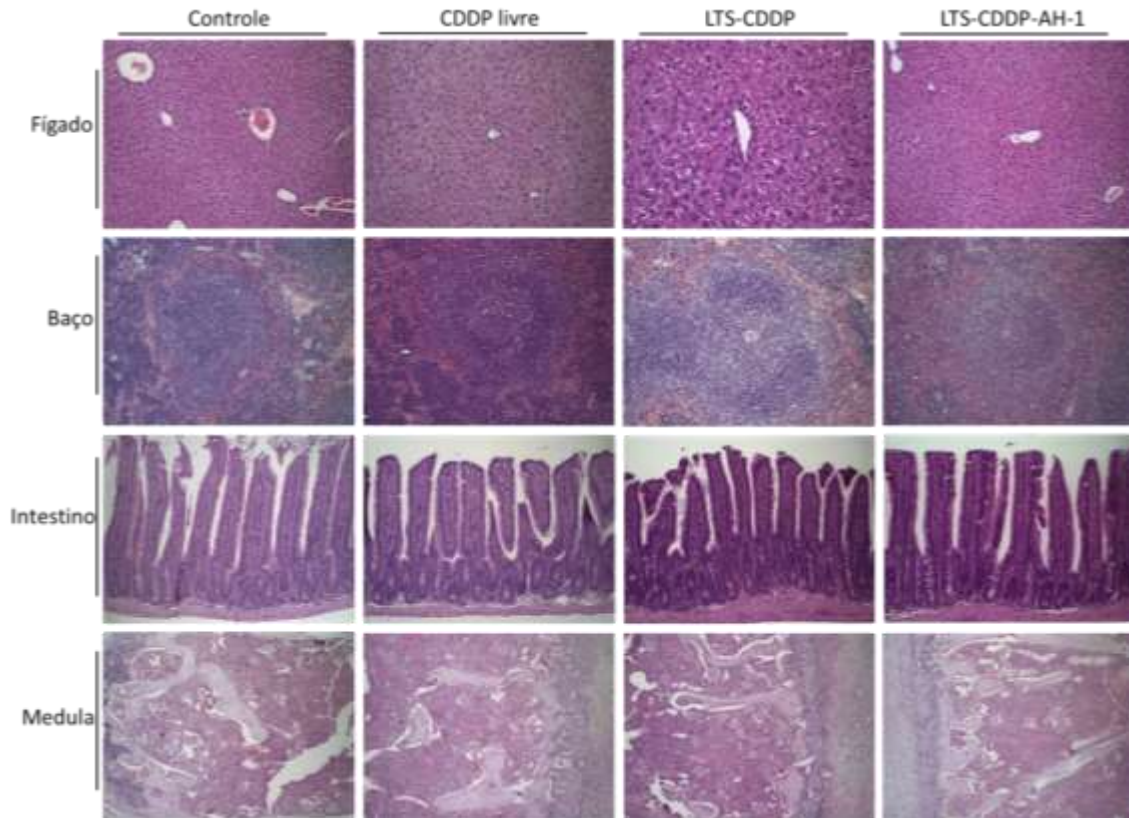
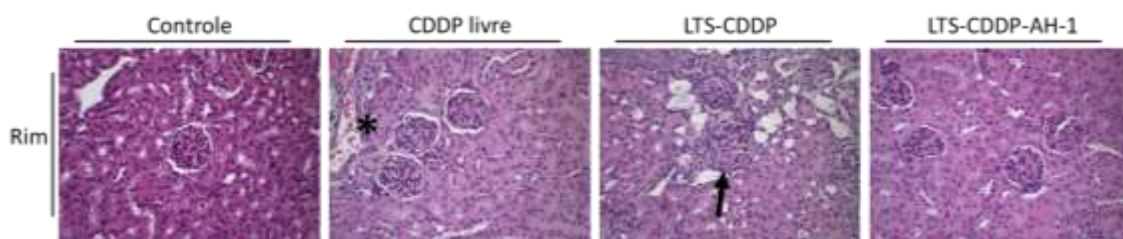


Figura 8: Fitomicrografias de rim de camundongos Swiss tratados com NaCl 0,9% (p/v), CDDP livre, LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1. Seta indica espessamento da capsula de Bowman, o asterisco indica infiltrado inflamatório e fibrose. Coloração de Hematoxilina & eosina. Aumento de 40x



4 DISCUSSÃO

Sabe-se que o uso da CDDP está relacionado a vários efeitos tóxicos e o principal deles é a nefrotoxicidade (Alam et al., 2015). O uso de nanossistemas vem sendo estudado na tentativa de minimizar esses danos causados pela quimioterapia, no entanto, os lipossomas convencionais apresentam algumas limitações como depuração sanguínea rápida, falta de

especificidade pelo tumor, entre outros problemas (Sercombe et al., 2015). Nesse contexto, o uso de ligantes na superfície pode ser aplicado na tentativa de melhorar o tempo de circulação sanguínea além de poder atuar também como um direcionamento para o tumor, uma vez que a região tumoral superexpressa receptores para alguns ligantes, como o caso do AH (Qhattal et al., 2014). Outra alternativa para melhorar a eficácia dos lipossomas é o uso de lípidos termosensíveis, capazes de conferir ao lipossoma a liberação do fármaco apenas após o aquecimento, ou seja, apenas na região tumoral após aplicação de hipertermia moderada (Gomes et al., 2019). Esta nova alternativa terapêutica pode contribuir para uma diminuição ou eliminação dos efeitos tóxicos sistêmicos.

Nesse estudo foi então avaliada a atividade *in vitro* e a toxicidade *in vivo* das novas formulações termosensíveis desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa. A encapsulação da CDDP neste novo sistema de liberação tem algumas vantagens potenciais, como o direcionamento ativo pelo uso do AH e a termosensibilidade, com maior liberação após aquecimento. Para isso, uma série de estudos pré-clínicos foram realizados *in vitro*, como a viabilidade celular, CI_{50} , morfologia nuclear e *in vivo*, um estudo de toxicidade com análise da variação do peso corporal, mortalidade, perfis hematológico e bioquímico (funções renal e hepática) e avaliação histopatológica após a administração intravenosa em camundongos Swiss fêmeas.

As análises *in vitro* permitiram observar maior citotoxicidade da formulação catiônica (LTS-CDDP) frente a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 apresentando a menor CI_{50} quando comparada a CDDP livre (Tabela 2). Esse achado sugere que, LTS-CDDP favorece a captação celular do fármaco, estando as células mais susceptíveis à ação de CDDP. O mesmo foi observado por Sun e colaboradores (2014), em um estudo com lipossomas catiônicos de CDDP, no qual o aumento da citotoxicidade também foi relacionado a captação celular aumentada (Sun et al. 2014). Essa maior citotoxicidade observada para LTS-CDDP pode estar relacionada ao seu potencial zeta positivo (+20 mV) proporcionado pela presença de SA em sua composição, já que nas outras formulações a carga positiva não estava pronunciada devido a interação eletrostática com o AH (LTS-CDDP-AH-1) ou a ligação covalente com o AH (LTS-CDDP-AH-1). A relação da carga superficial positiva com a interação com membranas celulares já foi relatada na literatura, revelando uma diminuição da viabilidade em células tratadas com lipossomas carregados positivamente (Filion and Phillips 1997; Schwendener, Lagocki, and Rahman 1984; Sun et al. 2014). Na análise da viabilidade celular das formulações brancas, foi observado maior citotoxicidade de LTS-AH, isso pode ser devido ao fato de que

AH é um componente crítico da matriz extracelular e desempenha uma importante função biológica de interação com diferentes moléculas e receptores. Avaliações biológicas realizadas por Han e colaboradores em 2019, indicaram que oligômeros de AH inibem significativamente o crescimento e a migração de células MDA-MB-231 de câncer de mama triplo-negativo (TNBC) (Han et al., 2019), podendo ser uma justificativa do potencial tóxico dessa formulação branca (LTS-AH).

Ainda se tratando das análises *in vitro*, sabe-se que vários mecanismos celulares afetam a morfologia nuclear e, portanto, podem ser usados para avaliar os mecanismos de ação de fármacos (Filippi-Chiela et al., 2012). O núcleo corresponde a aproximadamente 10% do volume celular e, devido ao seu envelope nuclear, apresenta formato arredondado e superfície bem definida e regular em condições normais *in vitro*. Condensação nuclear e fragmentação são observadas no processo de apoptose, aumento no tamanho nuclear indica senescência e aumento na irregularidade ocorre devido ao estresse químico ou físico, ou agentes exógenos que afetam a dinâmica dos microtúbulos (Stevens et al., 2008). Nessa análise, o uso de hipertermia com as formulações LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1 levou a formação de apoptose. As células em apoptose sofrem uma condensação alta e regular do núcleo, que ocorre antes da fragmentação nuclear (Saraste, 1999). Devido a essa alta condensação em uma forma quase esférica, foi formulada a hipótese de que os núcleos das células em apoptose podem aparecer como pequenos e regulares (Filippi-Chiela et al., 2012). Além disso, LTS-CDDP exibiu maior formação de núcleos LR em relação a CDDP livre (Figura 4), indicando maior ocorrência de senescência nas células tumorais tratadas com essa formulação. Dessa forma, mais uma vez é possível sugerir maior toxicidade da formulação LTS-CDDP, devido a sua carga positiva. Célula cancerosa em senescência é um estado de parada celular que frequentemente ocorre em resposta à terapia. É frequentemente chamada de senescência induzida por terapia (TIS) ou senescência celular acelerada, para diferenciar do processo de envelhecimento de células normais conhecido como senescência replicativa (Wu et al., 2012). Milczarek e colaboradores (2020) publicaram uma revisão a respeito da senescência em câncer de mama, e destacaram que a CDDP desencadeou senescência em linhagens MDA-MB-231, mas ressaltou que a expressão de 21 genes responsáveis pela resistência do TNBC à CDDP, está ligada à senescência (Milczarek, 2020).

Porém *in vivo*, esses achados não são benéficos, uma vez que essa toxicidade de LTS-CDDP não é seletiva para células tumorais, causando danos também em células saudáveis. Nesse sentido, foram observadas alterações nos exames hematológicos para os grupos tratados

com LTS-CDDP em relação a CDDP livre. A leucocitose e linfocitose observada para essa formulação pode estar relacionada a algum processo inflamatório decorrente da toxicidade causada pela maior interação do lipossoma catiônico com as células do sangue. Resposta semelhante foi encontrada por Filion e colaboradores (1997), no qual lipossomas catiônicos formulados com estearilamina (SA), mostraram interagir com proteínas séricas e glóbulos vermelhos, induzindo uma resposta de coagulação forte e hemólise e, uma alteração laboratorial importante foi a linfocitose (Filion & Phillips, 1997). O mesmo foi observado nos dados de exames bioquímicos, uma vez que LTS-CDDP não foi capaz de evitar o dano renal causado pela CDDP (Tabela 5), que foi contornado pelo uso de AH na superfície dos lipossomas. Em contrapartida, o uso desse ligante levou a um aumento de enzimas hepáticas no plasma, que está relacionado a alguma injúria no fígado, causando morte de hepatócitos que consequentemente são detectadas no sangue. Esse achado é justificado pela presença de receptores para endocitose de AH (HARE), altamente expressos em células endoteliais sinusoidais de nódulos linfáticos, fígado e baço (Pandey et al., 2008), ocasionando um direcionamento do fármaco para o fígado. No entanto, dados da análise histológica mostram que, apesar dessa alteração no exame bioquímico, não foi detectada nenhuma alteração histológica no fígado dos animais tratados com LTS-CDDP-AH-1. Os cortes histológicos em diferentes níveis do parênquima hepático e esplênico mostraram-se dentro dos limites de normalidade, com a arquitetura dos órgãos preservada (Figura 8).

Ainda como consequência da toxicidade devido a carga positiva da superfície de LTS-CDDP, também foi observado maior perda de peso nos animais em relação a CDDP livre (Figura 5). Por outro lado, o uso do ligante AH foi capaz de diminuir a toxicidade *in vivo*, apresentando menor perda de peso dos animais tratados com essa formulação, além de eliminar completamente o dano renal (Tabela 5). Cabe mencionar ainda que as análises histológicas dos demais órgãos dos animais tratados com LTS-CDDP-AH-1, não apresentaram nenhuma alteração microscópica em nenhum órgão avaliado (Figuras 7 e 8).

5 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os resultados sugerem que a formulação inovadora termosensível de CDDP funcionalizada com AH por interação eletrostática pode representar uma vantagem terapêutica no tratamento do câncer de mama uma vez que um dos principais problemas relacionados ao uso de CDDP consiste em toxicidade induzida pelo fármaco. No entanto, se faz

necessário estudos de toxicidade *in vivo* com doses mais altas, a fim de avaliar a redução da toxicidade pelo uso dessa formulação.

Os lipossomas responsivos a estímulos configuram uma grande evolução na área de nanocarreadores, uma vez que buscam a interação entre o sistema e o meio, superando obstáculos previamente existentes com o uso dos lipossomas convencionais (Hatakeyama, 2017; Jing et al., 2015). Dentre esses, os sistemas termossensíveis representam uma estratégia importante no tratamento do câncer em associação com o uso de hipertermia, já que são capazes de explorar características típicas dos lípides, que possuem uma temperatura de transição de fase (T_c) acima da temperatura fisiológica (a partir de 40°C) e dessa forma, aprimorar a liberação do fármaco especificamente na região aquecida do tumor (X. L. Liu & Fan, 2014). T_c é definida como a temperatura necessária para induzir uma mudança no estado físico lipídico da fase de gel ordenada, onde as cadeias de carbônicas estão totalmente estendidas e compactas, para a fase líquido cristalina desordenada, onde as cadeias de carbônicas são fluidas (Gomes et al., 2019; Kneidl et al., 2014). Lipossomas termossensíveis tradicionais são compostos principalmente por DPPC, fosfolípido com cadeias de ácidos graxos saturados de 16 carbonos e uma T_c cerca de 41°C (Kneidl et al., 2014; Willerding et al., 2016). A fim de explorar uma nova alternativa, além de possivelmente agregar outras vantagens ao sistema, o AH pode ser usado como molécula de direcionamento ativo, uma vez que já se sabe que tumores superexpressam receptores para essas moléculas, os receptores CD44 (Almalik et al., 2013; Ravar et al., 2016). Dessa forma, o presente trabalho objetivou desenvolver lipossomas termossensíveis de CDDP funcionalizados com AH e foi delineado com o intuito de responder os seguintes questionamentos:

- 1- A formulação desenvolvida apresenta distribuição homogênea de tamanho?
- 2- O sistema desenvolvido é realmente termossensível?
- 3- A T_c do sistema é compatível com o uso de hipertermia moderada?
- 4- AH e CDDP interferem na organização e conseqüentemente na termossensibilidade do sistema?
- 5- O sistema desenvolvido é mais seguro, em relação a toxicidade *in vitro* e *in vivo*?

As etapas iniciais do estudo foram focadas na obtenção de parâmetros físico-químicos que nos permitissem compreender a organização do sistema, uma vez que essa é de extrema importância para a caracterização de lipossomas termossensíveis. No entanto, sabe-se que em função da complexidade de tais sistemas, na caracterização físico-química dessas nanoestruturas se faz necessária a associação de diferentes técnicas como DLS, microcalorimetria e SAXS. A análise por DLS permitiu-nos avaliar que os lipossomas possuíam uma distribuição homogênea e adequada de diâmetro para possibilitar a administração

intravenosa. Além disso, essa técnica permitiu avaliar, através de um estudo preliminar, o comportamento do sistema com a variação da temperatura, indicando que o nanocarreador proposto era realmente termossensível (Maia, Chaves et al., 2021). A microcalorimetria veio corroborar os dados obtidos por DLS, confirmando a T_c próxima de 41°C , compatível com o uso de hipertermia moderada (May & Li, 2013; Wust et al., 2002). Ao avaliar os dados de SAXS, foi possível constatar uma organização lamelar observada em todas as formulações estudadas e independente das condições de temperatura. A intensidade dos picos, proporcional ao volume de estruturas ordenadas em uma dada fase, aumentou com a temperatura, sugerindo que em condições de aquecimento ocorre um aumento do tamanho dos lipossomas, provavelmente devido a uma dilatação da bicamada, ocasionada por uma desorganização na estrutura dos lípides. Esta tendência foi observada também por meio do aumento no tamanho do domínio, corroborando para a confirmação da termossensibilidade dessas formulações (Neunert et al., 2018). Além disso, foi possível constatar que os componentes AH e CDDP não alteravam a organização lamelar e conseqüentemente não afetavam a T_c do sistema.

Ainda com o intuito de elucidar o comportamento dessas formulações, foi realizado um estudo de liberação *in vitro*, a fim de avaliar a liberação do fármaco em função da temperatura. Aqui observou-se uma possível adsorção de CDDP na bicamada, levando a uma rápida liberação em temperaturas inferiores a T_c (42°C), mas que foi controlada pelo uso de AH, que modulou a liberação, gerando um perfil de liberação mais lento.

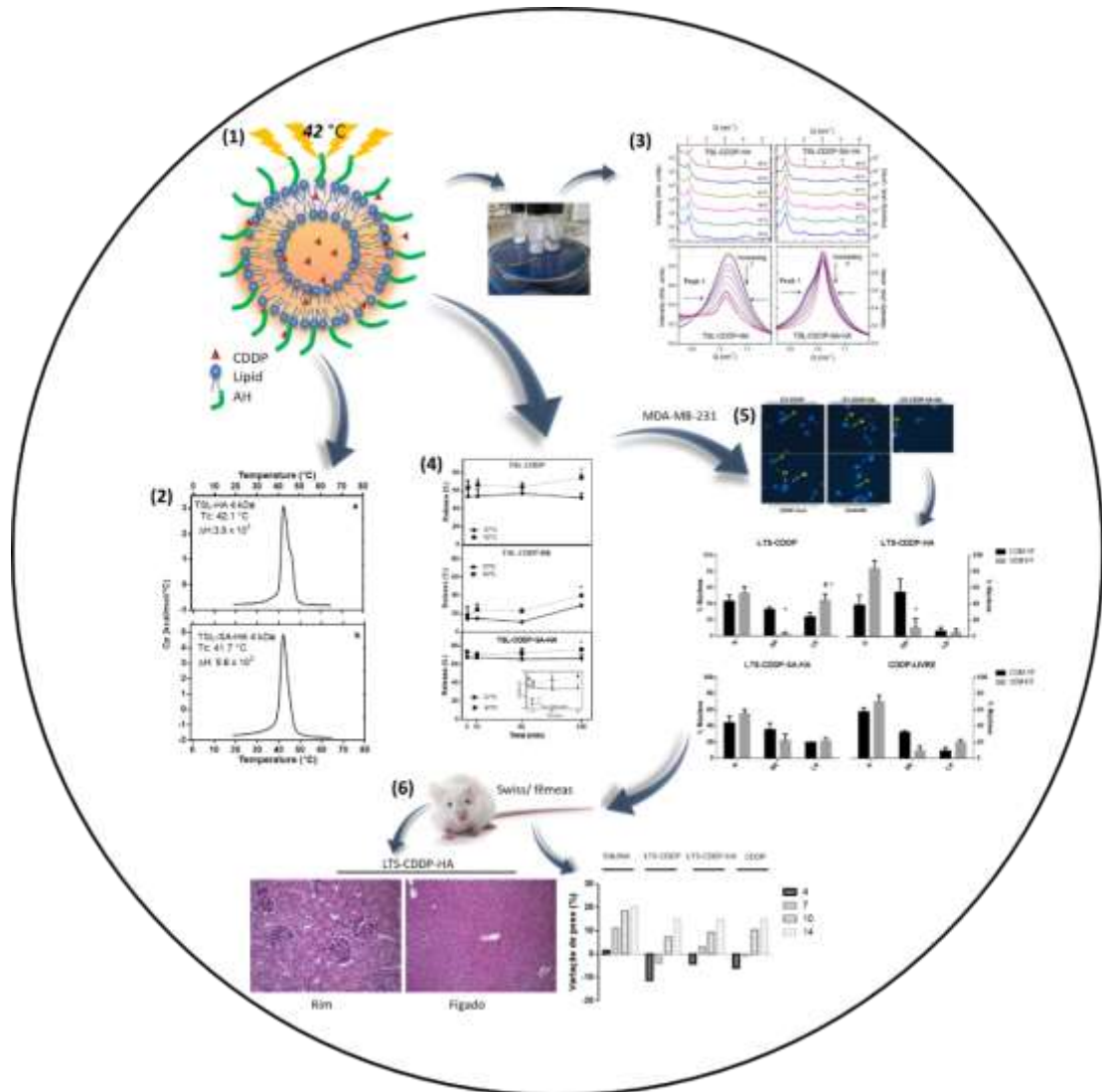
Uma vez realizada uma caracterização que nos permitiu compreender as propriedades do sistema bem como as interações em nível molecular, e tendo em vista que as principais preocupações e limitações quanto ao uso clínico do CDDP dizem respeito aos efeitos tóxicos, foi conduzido um estudo de avaliação pré-clínica para verificar a toxicidade da formulação estudada. Realizamos um estudo *in vitro* de viabilidade celular em um modelo de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231), o qual expressa receptores CD44, além de um estudo de morfologia nuclear, objetivando avaliar a influência da formulação lipossomal termossensível com direcionamento ativo. Os dados mostraram que mesmo com o uso de direcionamento ativo (AH), a formulação sem AH (LTS-CDDP) foi mais citotóxica, provavelmente devido a sua característica catiônica. Nossa hipótese é que essa maior toxicidade em células de câncer, resultaria também em uma toxicidade em células saudáveis. Essa hipótese foi confirmada no estudo de toxicidade *in vivo*, onde a formulação catiônica casou alterações nos exames hematológicos e bioquímicos, indicando também uma nefrotoxicidade. Já com o uso do ligante AH, a nefrotoxicidade *in vivo* não foi observada, representando uma potencial

vantagem para essa formulação. Dados de análise histológica, sugerem que a formulação contendo AH é segura e, se usada em associação com hipertermia, poderia apresentar muitas vantagens em relação ao fármaco livre, no entanto, essa confirmação somente poderá ser feita após testes de atividade antitumoral em modelos experimentais de tumor. Esses achados são de extrema importância, uma vez que a nefrotoxicidade é o efeito adverso mais limitante do uso clínico da CDDP (Alam et al., 2015; Miller et al., 2010). Além disso, no estudo de morfologia nuclear, foi possível observar que, com o uso de hipertermia foi observado maior ocorrência de apoptose com o uso das formulações LTS-CDDP e LTS-CDDP-AH-1.

O esquema da Figura 1 destaca os principais resultados obtidos nesse trabalho:

- 1- Foi possível desenvolver uma formulação termossensível contendo vesículas com distribuição de tamanho homogêneo e adequados para administração intravenosa;
- 2- Os lipossomas são realmente termossensíveis e a Tc obtida por microcalorimetria foi compatível com uso de hipertermia moderada (42°C);
- 3- Por meio de SAXS foi possível observar uma conformação lamelar independente da temperatura e que o uso de AH e CDDP não alteraram a conformação do lipossoma e conseqüentemente sua Tc;
- 4- A liberação de CDDP foi modulada pelo uso de AH;
- 5- Uso de hipertermia aumenta a formação de núcleos com apoptose;
- 6- A formulação contendo AH trouxe benefícios quanto a eliminação da nefrotoxicidade, não apresentando nenhuma alteração histológica em nenhum dos órgãos estudados, podendo ser mais segura *in vivo*, quando comparada a CDDP e LTS-CDDP.

Figura 1: Resumo dos principais resultados obtidos nesse estudo



CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho apresenta um estudo de caracterização aprofundado, bem como estudos biológicos de uma nova formulação termossensível de CDDP funcionalizada com AH, a qual apresentou propriedades físicas e biológicas vantajosas em relação ao uso do fármaco livre. Sendo assim, conseguimos apresentar informações de extrema importância para compreender as principais características dessa nova formulação, bem como nortear as perspectivas para otimização desse tipo de nanosistema, que se mostrou promissor como alternativa para veiculação de CDDP.

PERSPECTIVAS

A partir do estudo realizado foi possível propor as seguintes perspectivas:

- Realizar um estudo de captação celular usando a linhagem de células tumorais MDA-MB-231, a fim de avaliar o potencial de internalização dessas formulações;
- Realizar um estudo de toxicidade *in vivo*, em camundongos Swiss sadios, em doses acima de 10 mg/kg a fim de avaliar a redução da toxicidade pelo uso da formulação LTS-CDDP-AH-1;
- Realizar estudos de atividade antitumoral *in vivo*, em camundongos portadores de tumor de mama, utilizando hipertermia moderada para comparação com um grupo sem uso de aquecimento;
- Realizar um estudo de estabilidade da formulação, a fim de uma possível viabilização comercial.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, K., & Zaidi, S. F. (2013). Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *Journal of Pakistan Medical Association*, 63(4), 504–508. <http://web.a.ebscohost.com.buproxy.bastyr.edu:2048/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=2669286b-bb44-43c9-9947-ba674b9b6264%40sessionmgr4002&vid=1&hid=4109>
- Ait-Oudhia, S., Mager, D. E., & Straubinger, R. M. (2014). Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology. *Pharmaceutics*, 6(1), 137–174. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6010137>
- Al-Ahmady, Z. S., Chaloin, O., & Kostarelou, K. (2014). Monoclonal antibody-targeted, temperature-sensitive liposomes: In vivo tumor chemotherapeutics in combination with mild hyperthermia. *Journal of Controlled Release*, 196, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.013>
- Alam, N., Dubey, R. D., Kumar, A., Koul, M., Sharma, N., Sharma, P. R., Chandan, B. K., Singh, S. K., Singh, G., & Gupta, P. N. (2015). Reduced toxicological manifestations of cisplatin following encapsulation in folate grafted albumin nanoparticles. *Life Sciences*, 142, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.019>
- Alavizadeh, S. H., Gheybi, F., Nikpoor, A. R., Badiie, A., Golmohammadzadeh, S., & Jaafari, M. R. (2017). Therapeutic Efficacy of Cisplatin Thermosensitive Liposomes upon Mild Hyperthermia in C26 Tumor Bearing BALB / c Mice. *American Chemical Society*, 14, 712–721. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01006>
- Almalik, A., Karimi, S., Ouasti, S., Donno, R., Wandrey, C., Day, P. J., & Tirelli, N. (2013). Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles. *Biomaterials*, 34(21), 5369–5380. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.065>
- Amidi, A., Hosseini, S. M. H., Leemans, A., Kesler, S. R., Agerbæk, M., Wu, L. M., & Zachariae, R. (2017). Changes in Brain Structural Networks and Cognitive Functions in Testicular Cancer Patients Receiving Cisplatin-Based Chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(12), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx085>
- Arpicco, S., Lerda, C., Dalla Pozza, E., Costanzo, C., Tsapis, N., Stella, B., Donadelli, M., Dando, I., Fattal, E., Cattel, L., & Palmieri, M. (2013). Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.003>
- Assanhou, A. G., Li, W., Zhang, L., Xue, L., Kong, L., Sun, H., Mo, R., & Zhang, C. (2015). Biomaterials Reversal of multidrug resistance by co-delivery of paclitaxel and lonidamine using a TPGS and hyaluronic acid dual-functionalized liposome for cancer treatment. *Biomaterials*, 73, 284–295. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.022>
- Bae, K. H., Tan, S., Yamashita, A., Ang, W. X., Gao, S. J., Wang, S., Chung, J. E., & Kurisawa, M. (2017). Hyaluronic acid-green tea catechin micellar nanocomplexes: Fail-safe cisplatin nanomedicine for the treatment of ovarian cancer without off-target toxicity. *Biomaterials*, 148, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.09.027>
- Bangham, A. D. (1993). Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64, 275–285. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90071-A](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90071-A)
- Batista, C. M., De Carvalho, C. M. B., & Magalhães, N. S. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(2), 167–179. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>
- Behrouzki, Z., Joveini, Z., Keshavarzi, B., Eyvazzadeh, N., & Aghdam, R. Z. (2016). Hyperthermia: How can it be used? *Oman Medical Journal*, 31(2), 89–97. <https://doi.org/10.5001/omj.2016.19>

- Bhattacharya, D., Svechkarev, D., Soucek, J. J., Hill, T. K., Taylor, M. A., Natarajan, A., Mohs, A. M., Diseases, A., & Buffett, P. (2018). Impact of structurally modifying hyaluronic acid on CD44 interaction. *Journal of Materials Chemistry B*, *5*(41), 8183–8192. <https://doi.org/10.1039/C7TB01895A>.Impact
- Biltonen, R. L., & Lichtenberg, D. (1993). The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids*, *64*, 129–142. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90062-8](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90062-8)
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal formulations in clinical use: An updated review. *Pharmaceutics*, *9*(2), 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- Caldeira, S., Lopes, D. A., Ferreira, S., Leite, E. A., & Oliveira, M. C. (2013). Liposomes as Carriers of Anticancer Drugs. *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*, *4*, 85–124.
- Carvalho, A. D., Vieira, F. P., De Melo, V. J., Lopes, M. T. P., Silveira, J. N., Ramaldes, G. A., Garnier-Suillerot, A., Pereira-Maia, E. C., & De Oliveira, M. C. (2007). Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *40*(8), 1149–1157. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006005000125>
- Chatterjee, D. K., Diagaradjane, P., & Krishnan, S. (2011). Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Therapeutic Delivery*, *2*(8), 1001–1014. <https://doi.org/10.4155/tde.11.72>
- Chen, J., Cheng, D., Li, J., Wang, Y., Guo, J. X., Chen, Z. P., Cai, B. C., & Yang, T. (2013). Influence of lipid composition on the phase transition temperature of liposomes composed of both DPPC and HSPC. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *39*(2), 197–204. <https://doi.org/10.3109/03639045.2012.668912>
- Chi, Y., Yin, X., Sun, K., Feng, S., Liu, J., Chen, D., Guo, C., & Wu, Z. (2017). Redox-sensitive and hyaluronic acid functionalized liposomes for cytoplasmic drug delivery to osteosarcoma in animal models. *Journal of Controlled Release*, *261*, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.027>
- Chunling, W., Cheng, X., Su, Y., Pei, Y., Song, Y., Jiao, J., Huang, Z., Ma, Y., Dong, Y., Yao, Y., Fan, J., Ta, H., Liu, X., Xu, H., & Deng, Y. (2015). Accelerated blood clearance phenomenon upon cross-administration of PEGylated nanocarriers in beagle dogs. *International Journal of Nanomedicine*, *10*, 3533–3545. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82481>
- da Silva Tinoco, L. M., da Silva, F. L. O., Ferreira, L. A. M., Leite, E. A., & Carneiro, G. (2018). Hyaluronic acid-coated nanoemulsions loaded with a hydrophobic ion pair of all-trans retinoic acid for improving the anticancer activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *54*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000417361>
- Dabbagh, N., Soroosh, A., Khorgami, Z., Shojaeifard, A., Jafari, M., Abdehgah, A. G., & Mahmudzade, H. (2015). Single-incision laparoscopic cholecystectomy versus mini-laparoscopic cholecystectomy: A randomized clinical trial study. *Journal of Research in Medical Sciences*, *20*(12), 1153–1159. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.172982>
- Daraee, H., Etemadi, A., Kouhi, M., Alimirzalu, S., & Akbarzadeh, A. (2016). Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, *44*(1), 381–391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>
- Dasari, S., & Paul Bernard, T. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*(0), 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.Cisplatin
- De Oliveira, M. C., Fattal, E., Couvreur, P., Lesieur, P., Bourgaux, C., Ollivon, M., & Dubernet,

- C. (1998). pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: A physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1372(2), 301–310. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00067-4)
- De Oliveira, M. C., Rosilio, V., Lesieur, P., Bourgaux, C., Couvreur, P., Ollivon, M., & Dubernet, C. (2000). pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: A physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. *Biophysical Chemistry*, 87(2–3), 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(00\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00180-0)
- Dou, Y., Dunne, M., Huang, H., Mckee, T., Chang, M. C., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2016). Thermosensitive liposomal cisplatin in combination with local hyperthermia results in tumor growth delay and changes in tumor microenvironment in xenograft models of lung carcinoma. *Journal of Drug Targeting*, 24(9), 865–877. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1191079>
- Dou, Y., Hynynen, K., & Allen, C. (2017). To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes. *Journal of Controlled Release*, 249, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.01.025>
- Dou, Y. N., Chaudary, N., Chang, M. C., Dunne, M., Huang, H., Jaffray, D. A., Milosevic, M., & Allen, C. (2017). Tumor microenvironment determines response to a heat-activated thermosensitive liposome formulation of cisplatin in cervical carcinoma. *Journal of Controlled Release*, 262, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.039>
- Dou, Y., Zheng, J., Foltz, W. D., Weersink, R., Chaudary, N., Jaffray, D. A., & Allen, C. (2014). Heat-activated thermosensitive liposomal cisplatin (HTLC) results in effective growth delay of cervical carcinoma in mice. *Journal of Controlled Release*, 178, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.01.009>
- Dufaÿ Wojcicki, A., Hillaireau, H., Nascimento, T. L., Arpicco, S., Taverna, M., Ribes, S., Bourge, M., Nicolas, V., Bochot, A., Vauthier, C., Tsapis, N., & Fattal, E. (2012). Hyaluronic acid-bearing lipoplexes: Physico-chemical characterization and in vitro targeting of the CD44 receptor. *Journal of Controlled Release*, 162(3), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.07.015>
- El Kechai, N., Geiger, S., Fallacara, A., Cañero Infante, I., Nicolas, V., Ferrary, E., Huang, N., Bochot, A., & Agnely, F. (2017). Mixtures of hyaluronic acid and liposomes for drug delivery: Phase behavior, microstructure and mobility of liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.029>
- Filion, M. C., & Phillips, N. C. (1997). Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1329(2), 345–356. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00126-0)
- Filippi-Chiela, E. C., Oliveira, M. M., Jurkovski, B., Callegari-Jacques, S. M., da Silva, V. D., & Lenz, G. (2012). Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *Public Library of Science*, 7(8), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042522>
- Frézard, F., Schettini, D. A., Rocha, O. G. F., & Demicheli, C. (2005). Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, 28(3), 511–518.
- Gasperini, A. A. M., Puentes-martinez, X. E., Balbino, T. A., Rigoletto, T. D. P., Sa, G. De, Corre, C., Cassago, A., Gaziola, L., Torre, D. La, & Cavalcanti, L. P. (2015). Association between Cationic Liposomes and Low Molecular Weight Hyaluronic Acid. *American Chemical Society* 3308, 31, 3308–3317. <https://doi.org/10.1021/la5045865>
- Giovanna Esposito, Simonetta Geninatti Crich, S. A. (2008). Contrast Agents. *ChemMedChem*,

- 3, 1858–1862. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200800234>
- Gomes, I. P., Duarte, J. A., Maia, A. L. C., Rubello, D., Townsend, D. M., de Barros, A. L. B., & Leite, E. A. (2019). Thermosensitive nanosystems associated with hyperthermia for cancer treatment. *Pharmaceuticals*, *12*(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ph12040171>
- Grüll, H., & Langereis, S. (2012). Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound. *Journal of Controlled Release*, *161*(2), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.041>
- Guo, F., Yu, M., Wang, J., Tan, F., & Li, N. (2015). Smart IR780 Theranostic Nanocarrier for Tumor-Specific Therapy: Hyperthermia-Mediated Bubble-Generating and Folate-Targeted Liposomes. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *7*(37), 20556–20567. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06552>
- Habash, R. W. Y., Bansal, R., Krewski, D., & Alhafid, H. T. (2006). Thermal Therapy , Part 2 : Hyperthermia Techniques. *Biomedical Engineering*, *34*(6), 491–542. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v34.i6.30>
- Han, W., Song, L., Wang, Y., Lv, Y., Chen, X., & Zhao, X. (2019). Preparation, characterization, and inhibition of hyaluronic acid oligosaccharides in triple-negative breast cancer. *Biomolecules*, *9*(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom9090436>
- Hatakeyama, H. (2017). Stimuli-Responsive Systems of Therapeutics Recent Advances in Endogenous and Exogenous Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug Delivery and Therapeutics. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *65*(7), 612–617.
- Hijnen, N., Kneepkens, E., Smet, M. De, Langereis, S., Heijman, E., & Grüll, H. (2017). Thermal combination therapies for local drug delivery by magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(24), 4802–4811. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700790114>
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R., & Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, *43*(1), 33–56. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00179-2](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00179-2)
- Hill, D. P., Harper, A., Malcolm, J., McAndrews, M. S., Mockus, S. M., Patterson, S. E., Reynolds, T., Baker, E. J., Bult, C. J., Chesler, E. J., & Blake, J. A. (2019). Cisplatin-resistant triple-negative breast cancer subtypes: Multiple mechanisms of resistance. *BMC Cancer*, *19*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6278-9>
- Hornof, M., & Urtti, A. (2008). Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA / PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. *The Journal of Gene Medicin*, *10*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1002/jgm.1125>
- Huang, X., Li, M., Bruni, R., Messa, P., & Cellesi, F. (2017). The effect of thermosensitive liposomal formulations on loading and release of high molecular weight biomolecules. *International Journal of Pharmaceutics*, *524*(1–2), 279,289. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.090>
- Hwa Lee, R., Mi Song, J., Young Park, M., Kyung Kang, S., Keun Kim, Y., & Sup Jung, J. (2001). Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochemical Pharmacology*, *62*(8), 1013–1023. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00748-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00748-1)
- INCA. (2020). *Câncer*. <https://www.inca.gov.br/>
- Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure , Recognition , and Processing of Cisplatin – DNA Adducts. *Chemical Reviews*, *99*(9), 2467–2498.
- Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(16), 9357–9360. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9357>
- Januszewski, A., & Stebbing, J. (2014). Hyperthermia in cancer: Is it coming of age? *The Lancet Oncology*, *15*(6), 565–566. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70207-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70207-4)

- Jiang, T., Mo, R., Bellotti, A., Zhou, J., & Gu, Z. (2014). Gel-liposome-mediated co-delivery of anticancer membrane-associated proteins and small-molecule drugs for enhanced therapeutic efficacy. *Advanced Functional Materials*, 24(16), 2295–2304. <https://doi.org/10.1002/adfm.201303222>
- Jing, L., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- Jung, M. (2000). *Polymerisation in Bilayers* (T. U. Eindhoven. (ed.); 1st ed., Issue 2000). <https://doi.org/10.6100/IR531044>
- Júnior, Á. D. C., Mota, L. G., Nunan, E. A., Wainstein, A. J. A., Wainstein, A. P. D. L., Leal, A. S., Cardoso, V. N., & De Oliveira, M. C. (2007). Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. *Life Sciences*, 80(7), 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.10.011>
- Kim, K. Y. (2007). Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.002>
- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P., & Huang, L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *Federation of European Biochemical Societies*, 268(1), 235–237. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81016-H](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81016-H)
- Kneidl, B., Peller, M., Winter, G., Lindner, L. H., & Hossann, M. (2014). Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4387–4398. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49297>
- Kong, G., Anyarambhatla, G., Petros, W. P., Braun, R. D., Colvin, O. M., Needham, D., & Dewhirst, M. W. (2000). Efficacy of Liposomes and Hyperthermia in a Human Tumor Xenograft Model: Importance of Triggered Drug Release. *Cancer Research*, 60(24), 6950–6957.
- Koning, G. A., Eggermont, A. M. M., Lindner, L. H., & Ten Hagen, T. L. M. (2010). Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors. *Pharmaceutical Research*, 27(8), 1750–1754. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0154-2>
- Kuo, J. W. (2005). Practical aspects of hyaluronan based medical products. In CRC Press (Ed.), *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products* (1st ed.). Taylor and Francis. <https://doi.org/10.1201/9781420037647>
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307–321. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01220-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01220-7)
- Leite, E. A., Lana, Á. M. Q., Junior, Á. D. C., Coelho, L. G. V., & Oliveira, M. C. De. (2012). Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8(2), 229–239. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1388>
- Leite, E. A., Souza, C. M., Carvalho-Júnior, Á. D., Coelho, L. G. V., Lana, Á. M. Q., Cassali, G. D., & Oliveira, M. C. (2012). Encapsulation of cisplatin in long-circulating and pH-sensitive liposomes improves its antitumor effect and reduces acute toxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5259–5269. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34652>
- Li, L., Ten Hagen, T. L. M., Haeri, A., Soullié, T., Scholten, C., Seynhaeve, A. L. B., Eggermont, A. M. M., & Koning, G. A. (2014). A novel two-step mild hyperthermia for advanced liposomal chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 174(1), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.11.012>
- Lieberthal, W., Triaca, V., & Levine, J. (1996). Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: Apoptosis vs. necrosis. *American Journal of Physiology*,

- 270, 700–708. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.270.4.f700>
- Limmer, S., Hahn, J., Schmidt, R., Wachholz, K., Zengerle, A., Lechner, K., Eibl, H., Issels, R. D., Hossann, M., & Lindner, L. H. (2014). Gemcitabine Treatment of Rat Soft Tissue Sarcoma with Phosphatidylglycerol-Based Thermosensitive Liposomes. *Pharmaceutical Research*, *31*(9), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1322-6>
- Lin, W., Xie, X., Yang, Y., Fu, X., Liu, H., Yang, Y., & Deng, J. (2016). Thermosensitive magnetic liposomes with doxorubicin cell-penetrating peptides conjugate for enhanced and targeted cancer therapy. *Drug Delivery*, *23*(9), 3436–3443. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1189983>
- Liu, H., Zhang, Y., Han, Y., Zhao, S., Wang, L., Zhang, Z., Wang, J., & Cheng, J. (2015). Biointerfaces Characterization and cytotoxicity studies of DPPC : M 2 + novel delivery system for cisplatin thermosensitivity liposome with improving loading efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *131*, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.029>
- Liu, X. L., & Fan, H. M. (2014). ScienceDirect Innovative magnetic nanoparticle platform for magnetic resonance imaging and magnetic fluid hyperthermia applications. *Current Opinion in Chemical Engineering*, *4*, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2013.12.010>
- Lokerse, W. J. M., Bolkestein, M., Dalm, S. U., Eggermont, A. M. M., Jong, M. De, Grüll, H., & Koning, G. A. (2017). Comparing the therapeutic potential of thermosensitive liposomes and hyperthermia in two distinct subtypes of breast cancer. *Journal of Controlled Release*, *258*, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.05.005>
- Lv, Y., Xu, C., Zhao, X., Lin, C., Yang, X., Xin, X., Zhang, L., Qin, C., Han, X., Yang, L., He, W., & Yin, L. (2018). Nanoplatfrom Assembled from a CD44-Targeted Prodrug and Smart Liposomes for Dual Targeting of Tumor Microenvironment and Cancer Cells. *ACS Nano*, *12*(2), 1519–1536. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08051>
- Maia, Chaves, A. L., e Silva, A. T. M., César, A. L. A., Giuberti, C. S., Evangelista, F. C. G., Lemos, J. A., Sabino, A. P., Malachias, A., Fernandes, C., de Barros, A. L. B., Soares, D. C. F., & Ramaldes, G. A. (2021). Preparation and characterization of gadolinium-based thermosensitive liposomes: A potential nanosystem for selective drug delivery to cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *65*(July). <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102686>
- Maia, A. L. C., Fernandes, C., Silva, T. D., Pereira De Oliveira, C. N., Silveira, J. N., & Ramaldes, G. A. (2015). Development and validation of high performance liquid chromatographic and derivative spectrophotometric methods for determination of gadodiamide in liposomal formulations. *Analytical Methods*, *7*(19), 8315–8325. <https://doi.org/10.1039/c5ay01709b>
- Mattheolabakis, G., Nie, T., Constantinides, P. P., & Rigas, B. (2012). Sterically stabilized liposomes incorporating the novel anticancer agent phospho-ibuprofen (MDC-917): Preparation, characterization, and in vitro/in vivo evaluation. *Pharmaceutical Research*, *29*(6), 1435–1443. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0619-y>
- May, J. P., & Li, S. (2013). Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *10*(4), 511–527. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.758631>
- Milczarek, M. (2020). The premature senescence in breast cancer treatment strategy. *Cancers*, *12*(7), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers12071815>
- Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G., & Reeves, W. B. (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*, *2*(11), 2490–2518. <https://doi.org/10.3390/toxins2112490>
- Mitrus, I., Bryndza, E., & Sochanik, A. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biology*, *33*, 911–917. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0389-0>
- Monteiro, L. O. F., Malachias, A., Pound-Lana, G., Magalhães-Paniago, R., Mosqueira, V. C. F., Oliveira, M. C., De Barros, A. L. B., & Leite, E. A. (2018). Paclitaxel-Loaded pH-

- Sensitive Liposome: New Insights on Structural and Physicochemical Characterization. *Langmuir*, 34(20), 5728–5737. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00411>
- National Cancer Institute. (2018). *Hyperthermia in Cancer Treatment*. What Is Hyperthermia? <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/type>
- Neunert, G., Tomaszewska-Gras, J., Siejak, P., Pietralik, Z., Kozak, M., & Polewski, K. (2018). Disruptive effect of tocopherol oxalate on DPPC liposome structure: DSC, SAXS, and fluorescence anisotropy studies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 216, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.10.001>
- New, R. R. C. (1990). *Introduction In: Liposomes a practical approach*. (U. Oxford, England: Press (ed.); 1st ed.).
- Nguyen, P. T., Abbosh, A., Member, S., & Crozier, S. (2017). Three-Dimensional Microwave Hyperthermia for Breast Cancer Treatment in a Realistic Environment Using Particle Swarm Optimization. *Biomedical Engineering*, 64(6), 1335–1344. <https://doi.org/10.1109/TBME.2016.2602233>
- Nurgali, K., Jagoe, R. T., & Abalo, R. (2018). Editorial: Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–3. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00245>
- O'Connell, K. E., Mikkola, A. M., Stepanek, A. M., Vernet, A., Hall, C. D., Sun, C. C., Yildirim, E., Staropoli, J. F., Lee, J. T., & Brown, D. E. (2015). Practical murine hematopathology: A comparative review and implications for research. *Comparative Medicine*, 65(2), 96–113.
- Oncoguia. (2018). *Estimativas no Mundo*. <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/>
- Pabla, N., Murphy, R. F., Liu, K., & Dong, Z. (2009). The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 296, 505–511. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90545.2008>
- Pandey, M. S., Harris, E. N., Weigel, J. A., & Weigel, P. H. (2008). The cytoplasmic domain of the hyaluronan receptor for endocytosis (hare) contains multiple endocytic motifs targeting coated pit-mediated internalization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21453–21461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800886200>
- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., & Isac, I. (1973). Phase transitions in phospholipid vesicles Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *BBA - Biomembranes*, 311(3), 330–348. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90314-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90314-3)
- Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., & Vyvyan, J. (2010). *Introdução à Espectroscopia* (Cengage Learning (ed.); 1st ed.).
- Peeken, J. C., Vaupel, P., Combs, S. E., & Combs, S. E. (2017). Integrating Hyperthermia into Modern Radiation Oncology: What Evidence Is Necessary? *Frontiers in Oncology*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00132>
- Peller, M., Willerding, L., Limmer, S., Hossann, M., Dietrich, O., Ingrisich, M., Sroka, R., & Lindner, L. H. (2016). Surrogate MRI markers for hyperthermia-induced release of doxorubicin from thermosensitive liposomes in tumors. *Journal of Controlled Release*, 237, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.035>
- Pradhan, P., Giri, J., Rieken, F., Koch, C., Mykhaylyk, O., Döblinger, M., Banerjee, R., Bahadur, D., & Plank, C. (2010). Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 142, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.002>
- Qhattal, H. S. S., Hye, T., Alali, A., & Liu, X. (2014). Hyaluronan polymer length, grafting density, and surface poly(ethylene glycol) coating influence in vivo circulation and tumor

- targeting of hyaluronan-grafted liposomes. *ACS Nano*, 8(6), 5423–5440. <https://doi.org/10.1021/nn405839n>
- Qian, W., Nishikawa, M., Haque, A. M., Hirose, M., Mashimo, M., Sato, E., & Inoue, M. (2005). Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 289, 1466–1475. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00265.2005>
- Qun, L., Tian, Y., Li, D., Sun, J., Shi, D., Fang, L., Gao, Y., & Liu, H. (2014). The effect of lipocisplatin on cisplatin efficacy and nephrotoxicity in malignant breast cancer treatment. *Biomaterials*, 35(24), 6462–6472. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.023>
- Ravar, F., Saadat, E., Gholami, M., Dehghankelishadi, P., Mahdavi, M., Azami, S., & Dorkoosh, F. A. (2016). Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 229, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.012>
- Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., Zhang, G., Lu, A., & Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>
- Ruano, L., Cardenas, G., & Nogueira, J. J. (2020). Electrostatic Interactions with Choline and Phosphate Groups Regulate Cisplatin Permeation through a Dioleoylphosphocholine Bilayer. *ChemRxiv*, 1–28. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12917957.v1>
- Saad, S. Y., Najjar, T. A. O., & Alashari, M. (2004). Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 12, 862–867. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04127.x>
- Sadeghi, N., Deckers, R., Ozbakir, B., Akthar, S., Kok, R. J., Lammers, T., & Storm, G. (2018). Influence of cholesterol inclusion on the doxorubicin release characteristics of lysolipid-based thermosensitive liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(2), 778–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.002>
- Santos Giuberti, C. Dos, De Oliveira Reis, E. C., Ribeiro Rocha, T. G., Leite, E. A., Lacerda, R. G., Ramaldes, G. A., & De Oliveira, M. C. (2011). Study of the pilot production process of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. *Journal of Liposome Research*, 21(1), 60–69. <https://doi.org/10.3109/08982101003754377>
- Saraste, A. (1999). Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*, 24(3), 189–195. <https://doi.org/10.1007/BF03044961>
- Sengupta, P., Basu, S., Soni, S., Pandey, A., Roy, B., Oh, M. S., Chin, K. T., Paraskar, A. S., Sarangi, S., Connor, Y., Sabbisetti, V. S., Kopparam, J., Kulkarni, A., Muto, K., Amarasiriwardena, C., Jayawardene, I., Lupoli, N., Dinulescu, D. M., Bonventre, J. V., ... Sengupta, S. (2012). Cholesterol-tethered platinum II-based supramolecular nanoparticle increases antitumor efficacy and reduces nephrotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(28), 11294–11299. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203129109>
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(286), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R. K., Mehrotra, S., Bhat-Nakshatri, P., Turner, C. H., Goulet, R., Badve, S., & Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24-Breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: An early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Research*, 8(5), 1–13. <https://doi.org/10.1186/bcr1610>
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20–37.

- <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Silva, R., Letícia, A., Silveira, M., Lorenna, É., Sales, D., Horta, R., Maria, C., Souza, D., Carlos, D., Rocha, B., Costa, C., Amantéa, M., Nicácio, J., Martins, S., Dantas, G., Isaura, J., Leite, A., Pires, L., Versiani, A., ... Nascimento, V. (2017). European Journal of Pharmaceutical Sciences Intestinal toxicity evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes loaded with cisplatin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *106*(January), 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.046>
- Silva, S. M. L., Coelho, L. N., Malachias, Â., Perez, C. A., Pesquero, J. L., Magalhães-Paniago, R., & De Oliveira, M. C. (2011). Study of the structural organization of cyclodextrin-DNA complex loaded anionic and pH-sensitive liposomes. *Chemical Physics Letters*, *506*(1–3), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.02.050>
- Sledge, G. W., Loehrer, P. J., Roth, B. J., & Einhorn, L. H. (1988). Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *6*(12), 1811–1814. <https://doi.org/10.1200/JCO.1988.6.12.1811>
- Smet, M. De, Heijman, E., Langereis, S., Hijnen, N. M., & Grüll, H. (2011). Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An in vivo proof-of-concept study. *Journal of Controlled Release*, *150*(1), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.10.036>
- Snee, M. (2018). Quality of life comparing carboplatin with cisplatin in the treatment of non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*, *91*(167), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.11.019>
- Staruch, R. M., Hynynen, K., & Chopra, R. (2015). Hyperthermia-mediated doxorubicin release from thermosensitive liposomes using MR-HIFU: Therapeutic effect in rabbit Vx2 tumours. *International Journal of Hyperthermia*, *31*(2), 118–133. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.992483>
- Stevens, F. E., Beamish, H., Warrenner, R., & Gabrielli, B. (2008). Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage. *Oncogene*, *27*(10), 1345–1350. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210779>
- Ta, T., & Porter, T. M. (2013). Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, *169*, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.036>
- Tezcan, S., Özdemir, F., Turhal, S., & Izzettin, F. V. (2013). High performance liquid chromatographic determination of free cisplatin in different cancer types. *Der Pharma Chemica*, *5*(5), 169–174.
- Torchilin, V. P. (2014). Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*, 813–827. <https://doi.org/10.1038/nrd4333>
- Toriyabe, N., Hayashi, Y., Hyodo, M., & Harashima, H. (2011). Synthesis and evaluation of stearylated hyaluronic acid for the active delivery of liposomes to liver endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *34*(7), 1084–1089. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1084>
- Toro-Córdova, A., Ledezma-Gallegos, F., Mondragon-Fuentes, L., Jurado, R., Medina, L. A., Perez-Rojas, J. M., & Garcia-Lopez, P. (2016). Determination of Liposomal Cisplatin by High-Performance Liquid Chromatography and Its Application in Pharmacokinetic Studies. *Journal of Chromatographic Science*, *54*(6), 1016–1021. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw039>
- Torrezine, T., & Athanazio, D. A. (2008). Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. *Revista Brasileira de Cancerologia*, *54*(1), 63–77.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., He, L., King, J. B., & Hanigan, M. H. (2009). Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*,

- 63, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2008.08.004>
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, 22(2), 129–150. <https://doi.org/10.1023/A:1020178304031>
- Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>
- Vaupel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology*, 14(3), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2004.04.008>
- Vaupel, P., & Horsman, M. R. (2010). Editorial: Tumour perfusion and associated physiology: Characterization and significance for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 26(3), 209–210. <https://doi.org/10.3109/02656731003636436>
- Vaupel, P., Rallinoâ, F., & Okunieff, P. (1989). Blood Flow , Oxygen and Nutrient Supply , and Metabolic Microenvironment Human Tumors : A Review. *Cancer Research*, 49(23), 6449–6465. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(99\)00362-4](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(99)00362-4)
- Vemuri, S., & Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70(2), 95–111. [https://doi.org/10.1016/0031-6865\(95\)00010-7](https://doi.org/10.1016/0031-6865(95)00010-7)
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Cancer Immun surveillance and Immunoediting*, 29, 235–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Wakiuchi, J., Marcon, S. S., Oliveira, D. C. De, & Sales, C. A. (2019). A Quimioterapia Sob a Ótica Da Pessoa Com Câncer : Uma Análise. *Texto & Contexto Enfermagem*, 28, 1–13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1980-265X-TCE-2018-0025>
- Wang, Z., Zhang, H., Yang, Y., Xie, X., Yang, Y., Li, Z., Li, Y., Gong, W., Yu, F., Yang, Z., Li, M., & Mei, G. (2016a). Preparation , characterization , and efficacy of thermosensitive liposomes containing paclitaxel Preparation , characterization , and efficacy of thermosensitive liposomes. *Drug Delivery*, 23(4), 1222–1231. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1122674>
- Wang, Zhang, H., Yang, Y., Xie, X. Y., Yang, Y. F., Li, Z., Li, Y., Gong, W., Yu, F. L., Yang, Z., Li, M. Y., & Mei, X. G. (2016b). Preparation, characterization, and efficacy of thermosensitive liposomes containing paclitaxel. *Drug Delivery*, 23(4), 1222–1231. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1122674>
- Westermarck, F. (1898). Über die Behandlung des ulcerirenden Cervix carcinoma mittels Knonstanter Wärme. *Zentralblatt Für Gynäkologie*, 1335–1339.
- White, S. C., Lorigan, P., Margison, G. P., Margison, J. M., Martin, F., Thatcher, N., Anderson, H., & Ranson, M. (2006). Phase II study of SPI-77 (sterically stabilised liposomal cisplatin) in advanced non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 95(7), 822–828. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603345>
- WHO. (2020). *WHO Report on Cancer*.
- Willerding, L., Limmer, S., Hossann, M., Zengerle, A., Wachholz, K., Timo, L. M., Koning, G. A., Sroka, R., Lindner, L. H., & Peller, M. (2016). Method of hyperthermia and tumor size in fl uence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors. *Journal of Controlled Release*, 222, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.004>
- Wu, P. C., Wang, Q., Grobman, L., Chu, E., & Wu, D. Y. (2012). Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Experimental Oncology*, 34(3), 298–305.
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R., & Schlag, P. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *The Lancet Oncology*, 3(8), 487–497. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5)





- Yatvin, M., Weinstein, J., Dennis, W., & Blumenthal, R. (1978). Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science*, 202(4374), 1290–1293. <https://doi.org/10.1126/science.364652>
- Zhang, K., Liu, M., Tong, X., Sun, N., Zhou, L., Cao, Y., Wang, J., Zhang, H., & Pei, R. (2015). Aptamer-modified temperature-sensitive liposomal contrast agent for magnetic resonance imaging. *Biomacromolecules*, 16, 2618–2623. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00250>

ANEXO I

ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO DURANTE O PERÍODO DO DOUTORADO

Review

Thermosensitive Nanosystems Associated with Hyperthermia for Cancer Treatment

Isabela Pereira Gomes ^{1,†} , Jaqueline Aparecida Duarte ^{1,†} , Ana Luiza Chaves Maia ¹,
Domenico Rubello ^{2,*}, Danyelle M. Townsend ³, André Luís Branco de Barros ¹  and
Elaine Amaral Leite ^{1,*} 

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 31279-901 Belo Horizonte, Brazil; isabelasje@hotmail.com (I.P.G.); jack84duarte@hotmail.com (J.A.D.); anafarmaciaufof@yahoo.com.br (A.L.C.M.); brancodebarros@yahoo.com.br (A.L.B.d.B.)

² Department of Nuclear Medicine, Radiology, Neuroradiology, Medical Physics, Clinical Laboratory, Microbiology, Pathology, Trasfusional Medicine, Santa Maria della Misericordia Hospital, 45100 Rovigo, Italy

³ Department of Drug Discovery and Pharmaceutical Sciences, Medical University of South Carolina, Charleston, SC 29425, USA; danyelle.m.townsend@gmail.com

* Correspondence: domenico.rubello@libero.it (D.R.); leite_elaine@hotmail.com (E.A.L.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 9 October 2019; Accepted: 21 November 2019; Published: 25 November 2019



Abstract: Conventional chemotherapy regimens have limitations due to serious adverse effects. Targeted drug delivery systems to reduce systemic toxicity are a powerful drug development platform. Encapsulation of antitumor drug(s) in thermosensitive nanocarriers is an emerging approach with a promise to improve uptake and increase therapeutic efficacy, as they can be activated by hyperthermia selectively at the tumor site. In this review, we focus on thermosensitive nanosystems associated with hyperthermia for the treatment of cancer, in preclinical and clinical use.

Keywords: hyperthermia; thermosensitive systems; cancer treatment

1. Introduction

Cancer is considered a public health problem due to the high incidence and mortality. The World Health Organization (WHO) estimates 27 million cases of cancer and 17 million deaths from this disease for the year 2030 [1]. Currently, conventional chemotherapy regimens have limitations, such as low specificity, which generates adverse effects that compromise the treatment and the health of the patient. Targeted drug delivery systems are emerging as a powerful strategy to overcome the toxicity that can limit the successful treatment of cancer patients. Specifically, thermosensitive nanomaterials are promising in the treatment of cancer because of their ability to act at specific sites when associated with hyperthermia [2–4]. Thermosensitive carrier systems are composed of lipids or polymers that transition from the gel phase to the crystalline liquid phase in response to heat, thus allowing drug release specifically in the heated region [5]. Hyperthermia is a method used to treat tumors by raising local or regional temperature through the use of controlled heat sources. The treatment might be applied in combination with other approaches in order to allow greater accumulation of drugs in the heated region and may increase efficacy and decrease side effects [6,7]. Therefore, the purpose of this review was to describe the most common thermosensitive nanocarriers used for tumor-specific drug release. In addition, we reviewed the most recent preclinical studies (2009–2019) involving thermosensitive systems associated with hyperthermia for the treatment of cancer.

2. Hyperthermia

Hyperthermia is a highly controlled method of heating of tumors, tissues, or systems to temperatures above the physiological temperature (37 °C) [8]. Heat induces physiological alterations in cells in a time-dependent and temperature-dependent manner [8]. Hyperthermia treatment in oncology was first described in 1898 by Frans Westermarck, a gynecologist who obtained an excellent response in advanced cervical carcinomas by running hot water into an intracavitary spiral tube [9]. It has subsequently been shown that there is a tumor-selective effect of hyperthermia at temperatures between 40 °C and 43 °C [9]. There are three zones impacted by hyperthermia: Central, peripheral, and outer [10]. The central zone is the direct and immediate site of heat transfer and cells generally die of necrosis. As the heat disseminates to the peripheral and outer zones, the impacts are more indirect and associated with apoptotic pathways and influenced by altered microenvironment. Hyperthermia leads to membrane fluidity and dysfunction through alterations in transport proteins, ion channels, receptors, and lipids [10]. Within the cell, hyperthermia denatures proteins, altering their structure and function. This process can be reversible if proteins recover through refolding pathways. Hypoxia in the core of tumors has shown to be a clinical challenge due to the low pH levels and poor blood supply [11]. The tumor region is known to have acidic pH, altered vasculature, and poor lymphatic drainage. These features can be used in favor of cancer treatment through enhanced permeability and retention (EPR) effect [12]. In combination with warming, hypoxia conditions render tumors more sensitive to hyperthermia, especially in areas with low perfusion. Thus, hyperthermia may induce direct cytotoxicity, as well as lead to selective destruction of tumor cells in hypoxic and, consequently, acidic parts of solid tumors [6,10,13].

Ablation and mild hyperthermia are two standard methods to achieve hyperthermia clinically (Figure 1). Ablation refers to a short burst of high temperatures (> 50 °C, for 10 min), whereas mild hyperthermia is achieved by applying lower temperatures for long periods (39–42 °C, for approximately 60 min) [11,14]. The physiological response to these strategies is distinct. During ablation, hyperthermia may provoke denaturation and coagulation of cellular proteins, rapidly destroying the cells inside the target tissue [15]. Although thermal ablation can effectively destroy tumor tissue, a major limitation is the difficulty of heating large tumors, since the entire tumor cannot reach an adequate temperature for coagulation and necrosis [16].

In contrast, a mild heat treatment may induce numerous changes in cellular and molecular physiology, and it has not been associated with any toxicity. Several targets within the cell may be affected due to an increase in temperatures, including membranes, cytoskeleton, and synthesis of macromolecules [17,18]. Mild hyperthermia may also trigger changes in perfusion and oxygenation, along with inhibition of DNA repair mechanisms. Additionally, there is evidence of immune stimulation and the development of systemic immune responses [19]. Hyperthermia causes biochemical changes due to a thermal shock within the cell, including a reduction in cell division and an increase in sensitivity to ionizing radiation therapy. It can also improve blood flow to the heated area, doubling the perfusion in the tumors [11], which intensifies drug delivery and prevents cells from repairing the damage induced during the radiation session [15,17,20].

There have also been reports of increased blood flow in most human tumors under conditions of hyperthermia, even hours after treatment induction. This increase in blood perfusion occurs preferentially at the onset of tumor warming, through an improvement of the microcirculation [13,21]. This may play a pivotal role in altering hypoxic conditions which are known to contribute to radioresistance. Specifically, hypothermia treatment coupled with radiation leads to radiosensitization [19]. Thermal damage can alter the protein structure of non-histone nuclear proteins, which are especially sensitive to heat, causing their unfolding and aggregation due to the exposure of hydrophobic groups, and subsequent association with the nuclear matrix. Consequently, functions dependent on the nuclear matrix, such as transcription, replication, or DNA repair, are compromised [22].

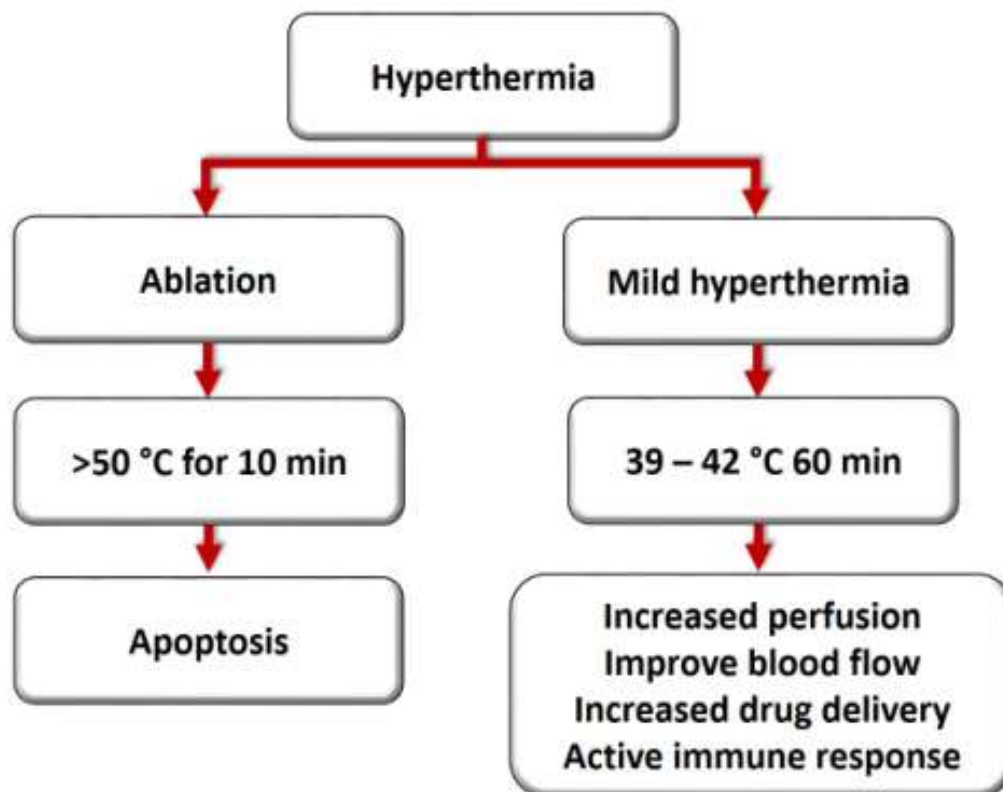


Figure 1. Ablation and mild hyperthermia induce distinct cell injury based on the intensity and duration.

Issels and co-workers proposed six important characteristics as “hyperthermia marks”: (1) block cell survival, (2) induce a cellular response to stress (3) modulate the immune response, (4) prevent DNA repair, (5) alter tumor microenvironment, and (6) radiation and chemotherapy sensitization [23]. Specifically, the use of extreme hyperthermia (≥ 50 °C) causes endothelial damage, diminishing blood flow, and enhances hypoxia and acidosis, while moderate hyperthermia (≤ 42 °C) improves the blood flow of the tumor and can therefore act as a radiosensitizer, enhancing oxygenation, and as a chemosensitizer in the tumor environment [8].

Leveraging hyperthermia treatment strategies combined with radiation and chemotherapy is an emerging therapeutic platform with promising traction [24,25]. Combinations of hyperthermia with conventional therapies have the significant advantage of yielding lower doses of chemotherapy and radiation, leading to more effective treatment with fewer side effects and reduced resistance of cancer cells [7,17]. Some studies have shown a synergistic effect when hyperthermia and radiation are coupled, which is called “thermal radiosensitization”. This effect induces an increase in cell death even at lower temperatures and seems more pronounced at the S-phase of cell division, whose cells are normally resistant to the isolated radiation [26]. Furthermore, other studies show that heat modifies the cytotoxicity of many chemotherapeutic agents, and this process is known as “thermal chemosensitization” [6,11,17,27,28]. It has been demonstrated that alkylating agents (cyclophosphamide and ifosfamide), platinum compounds (cisplatin), and nitrosoureas (carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU)) have a more potent cytotoxic effect if the temperature is increased from 37 to 40 °C [29]. Doxorubicin (DOX) or bleomycin was shown to induce enhanced cell death at higher temperatures, 42.5 °C [11,29]. Table 1 shows some clinical trials using the combination of hyperthermia and chemotherapy or radiotherapy.

Table 1. Clinical studies using hyperthermia associated with radiotherapy or chemotherapy.

Hyperthermia and Chemotherapy				
Drug	Target	Clinical Trial	Response	Reference
Etoposide, ifosfamide, and doxorubicin	High-risk soft tissue sarcoma	Randomized phase III multicenter study	Local control, overall survival and response rate were better with HT+CT	[30]
Cisplatin and gemcitabine	Pancreatic carcinoma	Retrospective clinical study	HT+CT was well tolerated, and had an acceptable survival profile	[31]
Cisplatin and irinotecan	Malignant mesothelioma of the pleura	Case report	Increase in survival without any disease for more than 7 years	[32]
Nimustine	High-grade glioma	Phase I clinical study	HT+CT was tolerable in patients with relapse of high-grade gliomas	[33]
Trabectedin	Soft tissue sarcoma	Randomized clinical trial	High feasibility, no uncommon side effects, did not increase toxicity, and progression-free survival	[23]
Hyperthermia and Radiotherapy				
Drug	Target	Clinical Trial	Response	Reference
-	Cervical carcinoma	Long-term result after the 12-year segment	Local control and survival were better with HT+RT	[34]
-	Bladder, cervix, and rectum	Prospective, randomized, multicenter study	Complete response rates, local control, and survival were better with HT+RT	[26]
-	Breast cancer	Toxicity study	HT+RT was more effective for locally advanced or recurrent breast cancer than RT alone	[35]

HT: Hyperthermia; RT: Radiotherapy; CT: Chemotherapy.

Types of Hyperthermia Treatments

Achieving temperatures above the physiological temperature of 37.5 °C at a defined target is a great challenge and depends on the size of the tumor and depth of target tissues [36]. In general, elevated temperatures are achieved using external devices, which transfer the energy to the tissue, resulting in clinically effective thermal doses without provoking intolerable tissue temperatures [15]. There are two basic strategies to achieve hyperthermia; the first uses high energy waves from an external machine, and the second uses a thin needle or probe inserted directly into the target tissue guided by ultrasound, magnetic resonance imaging (MRI), or computed tomography (CT). According to the National Cancer Institute, hyperthermia can be applied locally, regionally, or systemically.

Local hyperthermia is appropriate for relatively small tumors (≤ 3 to 5–6 cm), located superficially or inside a body cavity, such as the rectum or esophagus [6]. Using a probe, heat is applied to a small area and there are a variety of approaches depending on the location of the tumor: External, endocavitary, and interstitial. External measures are used to treat more superficial tumors. External applicators are positioned around the region, and energy is specifically directed to the tumor [37]. This heating process can be performed by using applicators, which emit mainly microwaves or radio waves [36]. The endocavitary method can be used to treat tumors within or near body cavities. The probes are placed into the cavity and inserted into the tumor in order to provide energy, heating the area directly [37]. Interstitial techniques allow higher temperatures than external techniques. They are performed under anesthesia and can be used to treat deeper tumors, such as brain tumors. Imaging techniques can also be implemented to ensure that the probe is correctly positioned within the tumor. Various types of applicators are available, including microwave antennas, radiofrequency electrodes, ultrasonic transducers, and laser fibers [36].

In regional or isolated perfusion hyperthermia, some of the patient's blood is removed, heated, and then pumped (perfused) back into the limb or organ, and anticancer drugs are commonly given during this treatment [6]. Thus, large areas of the body undergo heating, such as tissues, body cavities, organs, or limbs [37], in order to reach deeper tumors such as the pelvis or abdomen. Treatment monitoring can be performed by MRI by indicating temperature and perfusion [36]. However, regional hyperthermia is more complicated than local heating, due to variability in the physical and physiological properties of different tissues. Thus, further refinement, temperature measurement, and quality assurance are required. This method has been approved in phase III studies using slightly invasive thermometry catheters with no significant side effects [6].

Finally, whole body hyperthermia is commonly applied, isolated or in combination with chemotherapy, for the treatment of metastatic disease [19]. The principal behind whole body hyperthermia is to achieve "fever range" (107 °F or 41 °C) as an effective means to activate immune cells. It can be performed by several techniques that increase body temperature, including the use of thermal chambers (similar to large incubators), warm water immersion tanks, or warming blankets [37]. These procedures can only be executed with deep analgesia and sedation or general anesthesia. Currently, only radiation systems are in clinical use, with preheating times of 60–90 min (above 37.5 °C) [36,38].

3. Heating Modalities Used to Induce Hyperthermia

Different types of energy can be used to apply heat, including ultrasound, radiofrequency, and microwave [8,17]. Ultrasound involves the propagation of sound waves at a frequency of 2 to 20 MHz through the tissue that leads to their absorption and results in regional elevated temperatures [38,39]. The high-intensity focused ultrasound (HIFU) technique allows both ablation and moderate hyperthermia of the tumor. This technique concentrates ultrasound waves from outside the body into a target deep beneath the intact skin, without affecting nearby tissue [40]. The latter also allows the targeted delivery of drugs. Thermometry is the use of MRI to measure changes of temperature within a magnetic field. Mapping of temperature change *in vivo*, induced by HIFU, is possible employing MRI–HIFU, providing, therefore, accurate tissue heating over an extended time [16]. One advantage of this modality is that multiple exposures side-by-side allow more effective treatments to larger volume tumors. This methodology is clinically approved for the treatment of non-malignant tumors of the uterus and bone metastasis and is under current investigation for the treatment of prostate cancer and various other cancer indications [40].

In order to heat large tumors in depth, radiofrequency (RF) fields in the range of 10 to 120 MHz are generally used with long wavelengths, compared to body dimensions, and thus depositing energy over a considerable region [38]. They consist of pairs of dipole antennas around the patient. Each pair of antennas can be controlled in phase, amplitude, frequency, and electric field to focus the heat on the tumor area with an accuracy of a few centimeters. This method generates high frequency alternating currents that cause rapid oscillations to nearby cells to yield frictional heat. Treatment monitoring can be achieved with MRI, which may characterize temperature change as well as perfusion [40]. In the types of equipment used in the RF technique, the radiofrequency is emitted by a generator and passes through the tumor tissue from the tip of a needle-like probe (active electrode) that is inserted into the tumor. The radiofrequency current transmitted by the active electrode traverses the tumor toward a dispersive electrode, which is usually firmly attached behind the patient's right shoulder or thigh. Active and dispersive electrodes have different dimensions, which results in a difference in current density between them. This situation contributes so that the energy generated at the tip of the active electrode causes agitation of the ions present in the tumor tissue. The tissue ions are agitated as they attempt to follow the changes in direction of alternating electric current. Finally, this agitation is transformed into heat that causes the destruction of tumor tissue by induction of necrosis [41]. Several clinical trials support the viability and efficacy of this method in combination with standard chemotherapy or radiotherapy for the treatment of solid tumors [26,31]. These studies provide

preliminary evidence that hyperthermia, in addition to standard radiotherapy, may be especially useful in locally advanced cervical tumors. However, studies of larger numbers of patients are needed.

Another non-invasive technique and effective strategy for heating tumors utilizes microwave energy, which predominantly use antennas that run at 434, 915, and 2450 MHz [38]. A microwave system includes the antenna and a non-contact temperature sensor that sweeps a predetermined path over the surface of the tissue to be treated. Since the body tissues contain a high-water content, when they are irradiated with microwave energy, the temperature rises in the tissue due to the transfer of microwave energy into heat. This method generates an oscillating electromagnetic field that uses ions and dipoles to align and rotate, causing friction that heats the tissue within an effective range of 3 cm. It has been widely used in patients suffering from prostate or breast cancer [38,42]. In conclusion, the results validate the capability of the proposed technique in focusing power at the exact location and volume of the tumor, but there is still room for further technological improvements.

Laser-induced hyperthermia is a promising method for the treatment of superficial malignant tumors [43]. During this procedure, light energy is absorbed into the tissue, starting from the surface of the skin. Consequently, the maximum thermal energy produced is set in the skin and in the layers immediately below its surface (dermis and subcutaneous layers). The epidermis contains melanin, which is characterized by high light absorption, allowing thermal laser [43,44]. In conclusion, the correct choice of the parameters used for treatment and planning should be studied. As a result, this technique is recommended for (and limited to) soft thermal treatment of superficial tumors.

The use of magnetic fluid hyperthermia destroys cancer cells by heating tissue impregnated with ferrofluid and a magnetic field, causing minimal damage to the surrounding healthy tissue [45]. While the potency of the magnetic field should be sufficient to induce hyperthermia, it is also limited by the human capacity to stand safely. The ferrofluid material used for hyperthermia should be non-toxic and also be able to provide adequate heating [45]. Magnetic nanoparticles (MNPs) have been extensively used as agents of magnetic fluid hyperthermia. Optimizing MNP-based nanoagents for early diagnosis and efficient therapeutics associated with hyperthermia is required. With a multidisciplinary approach leveraging chemistry, physics, biology, and pharmaceutical sciences, it can be postulated that MNP agents will achieve the high sensitivity and efficacy for clinical diagnostics and therapeutics in the future [46].

The development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for diagnosis and/or bimodal cancer therapy, using magnetic hyperthermia and radionuclides, has grown considerably over recent years [47–50]. Mokhodoeva and collaborators described the incorporation of ²²³Ra (radium-223), the first clinically approved alpha-emitter, into SPIONs. The authors highlighted that the application of these SPIONs for theranostic purposes would benefit effective targeting and dose-delivery to target regions [48]. Another study published in the same year reported the incorporation of three radionuclides, technetium-99 (^{99m}Tc), yttrium-90 (⁹⁰Y), and lutetium-177 (¹⁷⁷Lu), into SPIONs. It was postulated that the nanoparticles with high energy beta emitters ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu can be a promising system for magnetic hyperthermia and radionuclide therapy. On the other hand, SPIONs with ^{99m}Tc could be used for diagnostic imaging purposes [49]. Studies by Pospisilova and collaborators reported the incorporation of radionuclide ⁵⁹Fe (iron-59) into SPIONs [50]. Separate studies showed the incorporation of ⁵⁹Fe and ¹¹¹In (indium-111) into SPIONs [47]. This study was the first to describe the *in vivo* integrity of radiolabeled SPIONs intended for use with nuclear medical imaging technologies. It is well known that the application of external magnetic fields has the potential to influence SPION's physiological biodistribution and concentrate them to a specific body region [51]. In this context, a recent study demonstrated that the micro positron emission tomography (PET) and the micro CT were able to provide a multimodal three-dimensional (3D) data set, about biodistribution of SPIONs radiolabeled with ¹⁸F-2-fluoro-2-deoxyglucose (¹⁸FDG), following intravenous administration in a small animal model, with and without the application of a permanent magnet onto the skin [52].

4. Thermosensitive Systems for Cancer Treatment

Drug targeting systems have been developed specifically for the desired target, which may increase the effectiveness of therapeutic agents and delay the development of resistance. Given that the bioavailability of drugs at the cancer cells is very important, a nanocarrier system incorporated with temperature would be useful to overcome some of the systemic and intracellular delivery barriers. Therefore, the advancement in material science has led to the design of a variety of materials, which are used for the development of thermo-responsive nanocarrier systems [53]. Nanoparticle-based hyperthermia strategies have been considered promising nanocarriers for antitumoral drug delivery systems and their development has increased considerably in the last few decades [3,54].

These thermosensitive nanocarriers stand out for their stability at physiological temperature; however, they quickly release the drug into pre-selected sites in response to changes in the local temperature [4,55]. The use of these systems has assumed an important role as an alternative to improve the biodistribution profile of drugs, since they can increase the intratumoral drug accumulation and reduce systemic toxicity [56]. The literature is vast in advances in synthesis, characterization, and application of different thermosensitive nanoparticles. Although they can be composed of different kinds of materials, including biocompatible polymers, lipids, and self-assembling amphiphilic micelles, most of them have shown a polymeric composition [53,57]. In this review, we describe the most common nanocarriers used for a thermo-responsive antitumor drug release. In addition, we review the most recent preclinical studies (2009–2019) involving thermosensitive systems associated with hyperthermia for the treatment of cancer.

4.1. Polymeric Nanocarriers

The thermo-responsive propriety of polymers is based on their response to thermal stimuli due to chain modification [55]. In thermo-responsive nanosystems, a temperature-sensitive polymer is used as a fabrication material, which displays a critical solution temperature at which the polymer system undergoes a phase change within a temperature, thus allowing the delivery system to release the cargo upon the changes in temperatures [55]. The temperature is dependent on the interactions between polymer–polymer or polymer–solvent. At a critical solution temperature, the polymeric solution undergoes separation into two phases [58,59]. Many challenges are involved in the development of polymers with transition temperatures within the required temperature range of 38–40 °C, since the phase transition temperature is strongly influenced by polymer concentration, pH, ionic strength, as well as the presence of specific molecules or ions in solution [60,61]. These thermosensitive polymers are characterized by a reversible phase transition. At low temperatures, they are water-soluble, while above a critical transition temperature, they change their conformation and the hydrophilic/hydrophobic balance, which provokes phase separation and presence of aggregates [62,63]. Temperature-responsive amphiphilic polymers often have thermosensitive hydrophilic segments and a suitable hydrophobic segment in their structure. An example of this type of polymer is the family of poly-polymers (N-substituted acrylamide), as the poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAAm) [63,64]. Hruby and collaborators described systems based on pNIPAAms with isotopically labeled end groups (L-tyrosinamide or diethyltriaminepentaacetic acid) designed for local radiotherapy [65]. The binding capacity for radionuclides and chemical stability was demonstrated using iodine-125 (125I) and 90Y labeled polymers [65]. The same group performed the radiolabeling of a thermo-responsive system with copper-64 (64Cu) [66]. The system is based on the copolymers of N-isopropylmethacrylamide with three different monomers containing hydrophobic n-alkyls groups of different sizes bound to the methacrylamide unit by a hydrolytically labile hydrazone bond [66]. Another study from the same group described a new thermo-responsive polymeric system, based on pNIPAAms, for local chemoradiotherapy using DOX and the radionuclide 125I [67].

Thermo-responsive polymers used in the biomedical field can get in contact with ionizing radiation when used as carriers of radiopharmaceuticals or during radiation sterilization procedures. In this context, a recent review described the effect of ionizing radiation on the physicochemical

and phase separation properties of some thermo-responsive polymers [68]. In this study, the poly(2-isopropyl-2-oxazoline-co-2-n-butyl-2-oxazoline) (POX) was presented as the most suitable polymer for the development of delivery systems that can be exposed to radiation. On the other hand, the polymer poly(N-vinylcaprolactam) (PVCL) was considered the least suitable for this purpose. PNIPAAms and poly[N-(2,2-difluoroethyl)acrylamide (DFP)] are considered suitable only for low radiation exposures [68].

It has been also reported that the copolymerization causes alteration of the phase transition temperature [61]. Thus, an increase in hydrophobic monomers or an increase in molecular weight may result in a decrease of the critical solution temperature [69]. On the other hand, the incorporation of hydrophilic monomers forms hydrogen bonds with thermosensitive monomers, increasing the critical solution temperature point [69,70].

Another class of thermosensitive polymers is Pluronic. They are triblock copolymers of polypropylene oxide (PPO) middle blocks flanked by polyethylene glycol (PEG) blocks (PEG-b-PPO-b-PEG) [71]. Pluronic F-127 or poloxamer 407 (Pluronic®, St. Louis, MO, USA) is a commercially available polyoxyethylene-propylene copolymer, which contains around 70% ethylene oxide, responsible for its hydrophilicity [72]. It has been widely used due to its thermosensitive character, low toxicity, and high solubilizing capacity of poorly water-soluble drugs, such as the various chemotherapeutic drugs, and newly developed anticancer compounds have high lipophilicity [71,72].

Among the wide variety of thermosensitive nanosystems, micelles, polymer nanoparticles, and polymersomes are the most frequently studied.

4.1.1. Polymer Micelles

Thermo-responsive polymeric micelles are formulated through a self-assembly process using amphiphilic block copolymers that spontaneously assemble into a core-shell structure in an aqueous environment above the critical micelle concentration (CMC) [55]. A low CMC is required to guarantee the stability of micelles after injection, since the bloodstream dilution might result in the disruption of self-assembled particles [55]. The hydrophobic core of micelles allows carrying cargo of a chemotherapeutic agent, normally a water-insoluble drug, while the temperature-responsive hydrophilic shell polymer favors the delivering of the drug at a specific site [73].

Many thermosensitive polymer-based micelles have been described in the literature, among which pNIPAAm, Pluronics, and poly(hydroxypropyl methacrylamide-lactate) (p(HPMAm-Lacn)) are the most frequently studied, and some drug-loaded formulations based on thermosensitive polymers have reached clinical trials [74]. They are water-soluble polymers below these phase transition temperatures and water-insoluble polymers above this temperature. Although PNIPAM-based systems were the focus of various studies as drug nanocarriers, many did not present satisfactory release results, because pNIPAAm is not suitable for *in vivo* applications as its phase transition temperature is below body temperature [73]. Polymers synthesized using oligoethyleneglycol (OEG) monomers are attractive alternatives to PNIPAAm, with several advantages; the polymers can be synthesized by controlled radical polymerization, they have reversible phase transitions, and they form effective shields against protein adsorption [75]. However, it remains a challenge due to the molecular weight and the slow degradation profile of the polymers exhibiting the phase transition in the desired range. One strategy to overcome these limitations would be the development of thermosensitive nanostructures formed by phospholipids [75].

The preclinical study by Liu et al. is an example of a novel docetaxel-loaded micelle based on the biodegradable thermosensitive copolymer poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)-b-poly(DL-lactide) that demonstrated that hyperthermia increased the antitumor efficacy of these thermosensitive micelles [76]. This formulation was extended to evaluate the efficacy in BGC (human gastric carcinoma xenograft models). These studies showed that at the same dose level of docetaxel/paclitaxel, hyperthermia greatly enhanced the antitumor effect through growth inhibition of more than 80%. The present results suggest that poly(IPAAm-co-AAm)-b-PDLLA micelles could be a clinically

useful chemotherapeutic formulation and merit further research to evaluate the feasibility of clinical application [77].

In another preclinical study, Chen et al. investigated thermosensitive folate micelles composed of P(FAA-NIPA-co-AAm-co-ODA) and P(FPA-NIPA-co-AAm-co-ODA) containing paclitaxel associated with hyperthermia in the treatment of lung cancer [75]. The encapsulation in P-NIPAm micelles and local heating drastically increased the accumulation of paclitaxel at tumor sites, local drug concentration was greatly enhanced, and thus the treatment effect improved, demonstrating that these micelles are a promising candidate for high treatment efficacy in tumor therapy [75]. Table 2 summarizes the most recent preclinical studies using hyperthermia and thermosensitive micelles.

Table 2. Recent preclinical studies using hyperthermia and thermosensitive micelles.

Composition	Thermosensitive Micelles		Target	Response	Ref.
	HT	Drug			
Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)-b-poly(DL-lactide)	Water bath	Docetaxel	Lung cancer	Higher antitumor efficacy in mice treated with docetaxel-loaded micelles accompanied by hyperthermia	[76]
Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)-b-poly(DL-lactide)	Water bath	Docetaxel and Paclitaxel	Gastric Cancer	Weight growth percentage inhibition of more than 80%	[77]
P(FAA-NIPA-co-AAm-co-ODA) and P(FPA-NIPA-co-AAm-co-ODA)	Water bath	Paclitaxel	Lung cancer	Increased accumulation of paclitaxel at tumor sites, local drug concentration was greatly enhanced	[75]

HT: Hyperthermia; P(FAA-NIPA-co-AAm-co-ODA): Poly(folate acrylic acid-N-Isopropylacrylamide-co-octadecyl acrylate); P(FPA-NIPA-co-AAm-co-ODA): Poly(folate-PEG acrylic acid-N-isopropylacrylamide-co-octadecyl acrylate).

4.1.2. Core–Shell Nanoparticles

Nanoparticles with inorganic cores and thermosensitive polymer shells are an interesting class of composite materials. They combine the properties of both the core and the shell [58]. Thermo-responsive core–shell nanoparticles are also studied for drug delivery applications [58]. In general, the thermo-responsive molecule is located on the surface and the core can be constituted by either a hard metallic (gold, magnetic) or a soft (dendrimers, chitosan, silica, nanogels) nanoparticle [2,75]. The rationale is to combine polymers and superparamagnetic nanoparticles to trigger drug release. Their incorporation into biopolymer coatings enables the preparation of magnetic field-responsive, biocompatible nanoparticles that are well dispersed in aqueous media [78]. Therefore, thermo-responsive nanomaterials of greater interest are those that respond to other stimuli besides temperature. With this, additional stimuli-responsive characteristics (magnetic field, ultrasound, light, and heat) can be added to the thermal response [53]. In order for the nanomaterials to exhibit such a response, either iron oxide or gold can be incorporated in the form of nanoparticles to the polymer matrix [79]. Iron oxide-based magnetic nanoparticles are extensively investigated in nanomedicine for their biocompatibility, their contrast agent properties, and their ability to generate heat when submitted to an alternating magnetic field [80,81]. Wang et al. designed a multiple magnetic hyperthermia-mediated release system for combination therapy using an injectable, biodegradable, and thermosensitive polymeric hydrogel [82]. Wang et al. noted that the therapeutic effect of the combination therapy in vivo significantly reduced the tumors and was dependent on the number of cycles of hyperthermia [82].

Li et al. synthesized magnetothermal responsive nanocarriers of DOX with targeting molecules, which allows the antitumor drug to locate tumor sites efficiently [83]. Magnetic nanoparticles composed of manganese–zinc (Mn–Zn) could target hepatoma cells actively and improved the drug concentration in the tumor sites. The shell of the nanoparticles was composed of an amphiphilic and thermosensitive copolymer to which DOX was associated. Therefore, an external alternating magnetic field elevated the temperature of the thermomagnetic particles, resulting in structural changes in the thermosensitive copolymer, thereby releasing DOX [83]. In another study, Shen et al. synthesized a thermo-responsive system, which encapsulated magnetic iron oxide nanoparticles and 5-fluorouracil using PNIPAM polymer. The results showed great potential in drug delivery and cancer therapy [84]. Other applications of hyperthermia-associated magnetic nanoparticles are described in Section 5 of this article.

Hydrogels have a cross-linked three-dimensional structure and are composed of hydrophilic polymers. The presence of hydrophilic groups such as amino (–NH₂), carboxylic (–COOH), and sulfate (–SO₃H) groups provides the ability to mimic natural living tissues [85]. Moderate temperature increases alter the interaction between the hydrophilic and hydrophobic segments in the polymer, inducing a change in network solubility, causing the sol–gel phase transition. Thus, the polymer is soluble below a certain critical temperature and insoluble when it is above this temperature [86]. The most common release mechanism of thermosensitive hydrogels occurs through passive diffusion, and different biotherapeutic molecules which are entrapped in the gel matrix can diffuse freely depending on the size of the mesh of this matrix. The hydrogels most studied are also based on pNiPAAm [87]. Copolymerization of pNiPAAm with more hydrophilic monomers increases polymer hydrophilicity, and stronger polymer–water interactions allow changes in the critical system temperature value. [88,89]. This copolymerization can be performed with polysaccharides, such as cellulose or chitosan, which are biodegradable and non-toxic compared to other natural polymers [90]. Turabbe and collaborators designed a thermosensitive hydrogel from pluronic F127 (PF127) and N,N,N-trimethyl chitosan in order to deliver DOX for glioblastoma multiforme [91]. This hydrogel showed a sustained release of tumor-suppressed DOX, suggesting it as a potential candidate for an anticancer chemotherapeutic delivery system for brain tumors [91]. In the same year, Pesoa and co-workers prepared paclitaxel-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles contained in a chitosan-sensitive gelling solution. This system allowed a more sustained and controlled administration

of paclitaxel, leading to a long-term effect at the site of action. The formulation showed a tumor volume inhibition of 63.0% compared to the control group [92].

4.2. Liposomes

Liposomes are spherical vesicles composed of a lipid bilayer, usually consisting of phospholipids, which involve an aqueous core [2,93]. These systems allow encapsulating the hydrophilic or lipophilic drugs into the aqueous core or the lipid membrane, respectively [93]. The first paper on the concept of using temperature-sensitive liposomes to achieve enhanced delivery of anticancer agents was published in 1978. After decades of research, several types of thermosensitive liposomes were constructed, including the commercially available liposome known as ThermoDox[®] [29]. Thermosensitive liposomes are designed to provide the drug release at mild temperatures due to the phase transition temperature (T_c) of the lipid composition [94]. T_c is defined as the temperature required to induce a change in the lipid physical state from the ordered gel phase, where the hydrocarbon chains are fully extended and closely packed, to the disordered liquid crystalline phase, where the hydrocarbon chains are randomly oriented and fluid. This parameter consists of altering of the hydrocarbon chain from a gel phase to a liquid crystal phase (Figure 2), which results in the disorganization of the bilayer and consequent drug release. In the gel phase, the chains are ordered allowing the formation of nanostructures. In the liquid crystal phase, the mobility of the molecules in the bilayer increases gradually and they become more disordered, and cannot maintain the liposomal structure. Thus, it is important to choose a phospholipid mixture with a suitable phase transition temperature within a hyperthermia range recommended for clinical application [24,95].

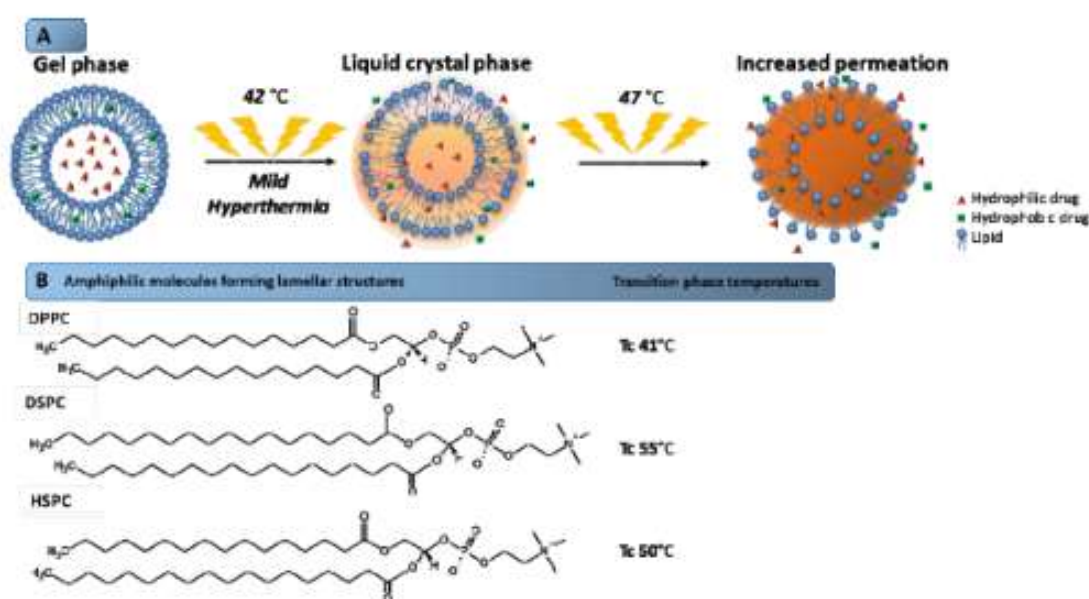


Figure 2. Mechanism of drug release from thermosensitive liposomes. (A) Schematic illustration of the mechanism of phase transition of the lipids that form the liposome bilayer. The increase of the temperature above the transition phase temperature ($47\text{ }^{\circ}\text{C}$) leads to higher bilayer permeability, and consequently, the drug release is favored. (B) Amphiphilic molecules forming lamellar structures and their transition phase temperatures. T_c : Phase transition temperature.

Traditional thermosensitive liposomes are based on dipalmitoyl phosphocholine (DPPC), a phospholipid with 16-carbon saturated fatty acid chains and a phase transition temperature of about $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ [96]. Supplementation of DPPC with other lipids, predominantly distearoyl phosphocholine (DSPC) and hydrogenated soy phosphocholine (HSPC), has an effect of improving the rate of drugs released [97]. Although the DPPC supplementation with other lipids can increase the permeability of

the membrane, the inclusion of lipids with carbon chains longer than DPPC may have undesirable effects on the phase transition behavior [29,96,97]. In 1999, Anyarambhatla and Needham launched the idea of incorporating lysolipids into PEGylated DPPC membranes of traditional thermosensitive liposomes in order to reduce the phase transition temperature and promote rapid drug release [29]. The incorporation of the lysolipid monopalmitoyl phosphocholine (MPPC) reduced the phase transition of traditional thermosensitive formulations from 43 to 39–40 °C and provided a rapid release upon heating. This formulation, composed of DPPC, 1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (MSPC), and DSPE-PEG (in the molar ratio of 86:10:4) and containing encapsulated DOX, was marketed under the name ThermoDox[®]. This thermosensitive liposome exhibits a phase transition temperature of 41.5 °C and is the most advanced and effective temperature-activated nanocarrier available [29,94,96].

Thermosensitive liposomes composed of lysophospholipids constitute an important class of these nanosystems responsive to temperature, since the incorporation of a small quantity of lipids results in changes in the curvature of the phospholipids and leads to reduction in the membrane's ability to act as a barrier [98]. However, further destabilization of the bilayer may cause premature drug leakage at physiological temperature, invalidating the clinical success of thermosensitive vesicles containing lysophospholipids [99].

Some studies have focused on the design of the generation of thermosensitive liposome that combines targeting and triggered drug release [94]. Various ligands such as folate, antibodies, receptors, and peptides have been conjugated to thermosensitive liposome [94]. Another approach is to sensitize non-thermosensitive liposomes by functionalizing them with temperature-responsive polymers that disrupt the membrane in response to heating [97].

There have recently been many preclinical studies involving this type of formulation. A DPPG2 liposome developed by Limeier et al. showed a higher release of gemcitabine above 40 °C. The plasma half-life of the drug was greatly increased from 0.07 to 2.59 h by using the thermosensitive liposome. Treatment of tumor BN175 with encapsulated gemcitabine associated with hyperthermia showed significant improvement in tumor growth inhibition compared to free gemcitabine [100]. Peller et al. intravenously administered doxorubicin thermosensitive liposome (DOX-TSL) associated with tumor heating above 40 °C for 1 h using laser light [101]. The result was a highly selective uptake of DOX, and the concentration of DOX in the heated tumor tissue compared to the unheated tumor showed an almost 10-fold increase [101]. Willerding et al. performed another study involving the encapsulation of DOX [102]. This group used different methods of hyperthermia and showed through preclinical studies that, regardless of the hyperthermia methods used, higher levels of DOX were found in tumors. This shows the increase in the concentration of drugs in the tumor after application of hyperthermia [102].

In vivo studies by Wang and co-workers, after three injections of a thermosensitive liposome containing paclitaxel in the lung tumor model, showed suppression of tumor growth compared to non-temperature-sensitive liposome and free drug [82]. Lokerse et al., in 2017, examined the potency of the combined therapy of a thermosensitive liposome with hyperthermia in two experimental models of human breast cancer-bearing mice [103]. Both cell lines showed improved in vitro chemosensitivity and increased uptake of DOX in the presence of hyperthermia [103]. Table 3 summarizes other examples of the most recent preclinical studies using hyperthermia and liposomes.

Table 3. Recent preclinical studies using hyperthermia and thermosensitive liposomes.

Thermosensitive Liposomes					
Composition	HT	Drug	Target	Response	Ref.
DPPC/DSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ 70/25/5	Water bath	DOX	Breast cancer	Significant increase in tumor response to liposome and HT treatment	[103]
DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	Laser light	DOX	Soft tissue sarcoma	High selective DOX uptake and increase of DOX concentration in the heated tumor tissue	[101]
DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	Laser light	DOX	Soft tissue sarcoma	Effective DOX delivery by liposome found in the heated tumors in comparison with the non-heated tumors	[102]
DPPC/DSPC/DPPG ₂ 50/20/30	HIFU	Gemcitabine	Soft tissue sarcoma	Significant improvement in tumor growth delay	[100]
DPPC/MSPC/DSPE-PEG ₂₀₀₀ /DSPG 83/3/10/4	Water bath	Paclitaxel	Lung cancer	Tumor growth suppression, compared with non-temperature-sensitive liposome and free drug	[82]

HT: Hyperthermia; DPPC: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DSPC: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DSPE: 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DPPG₂: 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-glycerol; MSPC: 1-Myristoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; PEG: Polyethylene glycol.

5. MRI-Guided Thermometry: A Strategy for Real-Time Monitoring and Control of Drug Release

Recently, there has been an increase in interest in exploring the synergy between imaging and drug delivery. This interest increased in vivo studies reporting the release of a drug from nanocarrier [104,105]. Among the available imaging modalities, MRI is an excellent candidate because of the excellent space-time resolution, the possibility of obtaining deep tissue/organ images, and the vast portfolio of available probes and contrast generation modalities [104]. A practical approach to visualize the release of the drug from liposomes is to encapsulate a hydrophilic paramagnetic agent (based on Gd^{3+} or Mn^{2+} ions) in the aqueous nanovesicle interior. After entrapment, the MR contrast is "silenced" and its activity is recovered when the agent is released [105].

A thermosensitive liposome formulation co-encapsulating DOX and a contrast agent was developed by Negussie et al. [106]. The stability of the technique, visualization ability, and content monitoring by magnetic resonance imaging associated with high-intensity focused ultrasound (MRI-HIFU) suggested that this technique combined with thermosensitive liposome could enable real-time monitoring and spatial control of drug release [106]. Temperature-sensitive liposomes (TSLs) co-encapsulating DOX and 250 mM Gadolinium [Gd (HPDO3A) (H₂O)], a clinically approved T₁-weighted MRI contrast agent, were also evaluated for delivering HIFU-mediated drugs under MRI [107]. A good correlation between the uptake of DOX and the concentration of gadolinium in the tumor was found, implying that the in vivo release of DOX from TSLs can be probed in situ with the time of longitudinal relaxation of the co-encapsulated MRI contrast agent. Anatomical MRI images of the tumor and surrounding mouse muscle were acquired before the administration of TSLs and directly after the first and second local hyperthermia treatment (Figure 3). It was possible to observe the difference of the tumors with MRI, before the administration of the TSLs and after the administration of TSLs in combination with mild hyperthermia, which induced significant changes in the tumor [107].

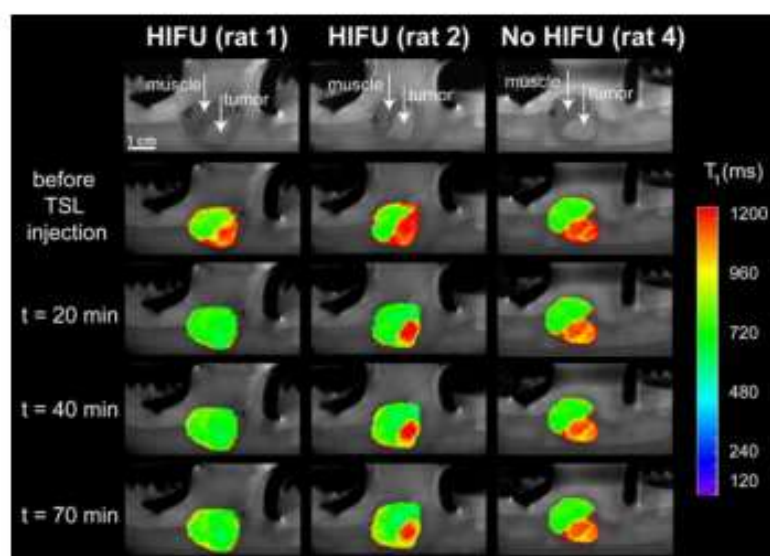


Figure 3. Anatomical MRI of tumor-bearing rats in the small animal HIFU setup (upper row) and T₁ maps of the tumor and leg overlaid on the anatomical images at different time points: Before the TSL injection, after the first hyperthermia period ($t = 20$ min), after the second hyperthermia period ($t = 40$ min), and 70 min after TSL injection. Left: HIFU-treated tumor showing a large T₁ response (rat 1); middle: HIFU-treated tumor showing a less sensitive response (rat 2); right: Untreated tumor (no HIFU, rat 4). Reproduced with permission from [107].

Staruch in 2015 evaluated the efficacy of DOX encapsulated in a thermosensitive liposome in combination with mild hyperthermia produced by high-intensity focused magnetic resonance-guided ultrasound (Figure 4) [108]. The authors concluded that tumors treated with a single thermosensitive

liposome infusion during MRI–HIFU light hyperthermia reduced tumor growth compared to tumors treated with liposome without hyperthermia [108].

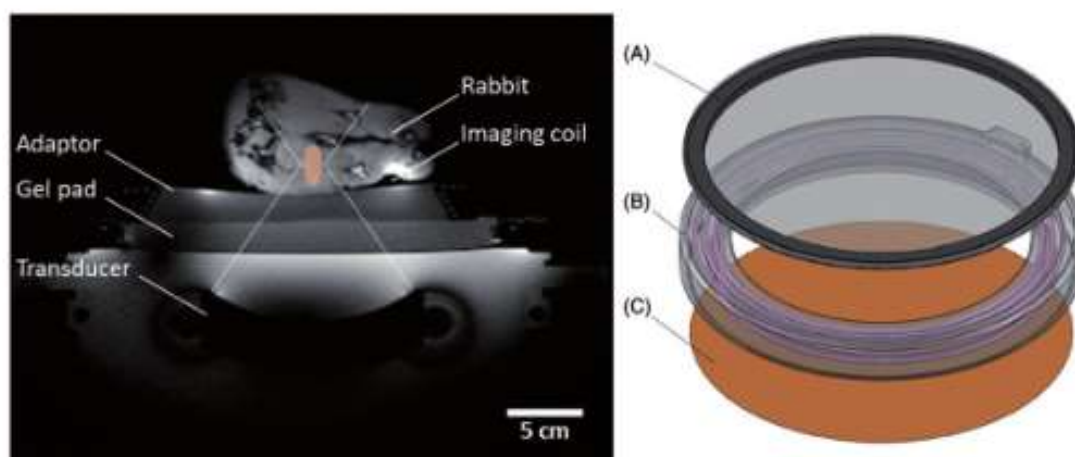


Figure 4. Experimental set-up for mild hyperthermia in rabbit V × 2 tumors using a clinical MRI–HIFU system. Axial survey image of a rabbit on top of a water-filled animal adaptor. A waterproofed receive-only imaging coil is fitted around the lower leg. The bottom film of the animal adaptor is coupled to the window of the clinical HIFU system by a gel pad; the HIFU transducer is in the oil bath below. Overlays indicate the relative size of the ultrasound beam path (dashed) and treatment cell (shaded). Right: Rendering of the animal adaptor designed for the clinical HIFU system. The detachable lid (A) is a polyimide film glued to an acrylic ring. The cylindrical water bath (B) is a 3D-printed shell that holds a volume of degassed water, which is heated by water pumped through a coiled channel printed into the walls of the cylinder. Polyimide film (C) forms the base. Reproduced with permission from [108].

Hijnen et al., also investigated the use of MRI–HIFU with the intravascular release of DOX encapsulated in TSLs in a preclinical setting using a rhabdomyosarcoma mouse tumor model [109]. All HIFU heating strategies combined with TSL resulted in increased DOX cell uptake in the interstitial space and a significant increase in drug concentrations in the tumor compared to a free DOX treatment [109].

6. Clinical Trials

The first thermosensitive formulation of liposomes in the clinical trial phase is ThermoDox® (Lawrenceville, GA, USA) [24]. This formulation is composed of DPPC/MSPC/DSPE-PEG₂₀₀₀ (86.5/9.7/3.8) with a concentration of 2 mg/mL Doxorubicin. DPPC presents a phase transition temperature of DPPC near 42 °C and the presence of MSPC provokes a reduction in this temperature. Thus, phase changes are easily reached by the use of mild hyperthermia [75]. ThermoDox® is administered by the intravenous route in combination with radiofrequency ablation (RFA) for treatment of primary liver cancer, as well as recurring chest wall breast cancer. As the Phase I results in patients with hepatocellular carcinoma were promising, this combination of treatment was directly evaluated in Phase III. The initial Phase III results did not show any progression of survival with the combination (ThermoDox® plus RFA, Lawrenceville, GA, USA) compared to RFA alone. The reasons for the failure of the heating test were related to problems with the clinical trial design, few preclinical supportive data, and required improvements in heating control. However, an analysis of the patients' subgroup who received RFA for at least 45 min showed an improvement in overall survival [24].

Another thermosensitive nanosystem under clinical investigation is a core–shell, a gold nanoparticle coated by polyethylene glycol (PEG), AuroLase™ (Houston, TX, USA) [110]. The multicenter, single-dose pilot study of AuroLase™ therapy was applied in the treatment

of patients with refractory and/or recurrent tumors of the head and neck. Three treatment groups of five patients each were enrolled and observed for six months following treatment. Each group received a single dose of this nanoparticle, followed by one or more interstitial illuminations with an 808 nm laser. This gold nanoparticle consists of a non-conducting silica core and acts as the exogenous absorber of the near-infrared laser energy delivered by the probe. A currently active trial uses AuroLase™ as an imaging technology during focal ablation of prostate tissue using nanoparticle-directed laser irradiation. Since no active drug is used in this approach, AuroLase™ is activated externally at the target site, thus avoiding any toxicity towards the normal cells [110,111].

7. Conclusions

In conclusion, mild hyperthermia is not associated with toxicity in contrast to radiotherapy and chemotherapy. However, hyperthermia has not been widely used in the clinic. The major hurdles in the clinical translation and widespread use of hyperthermia are largely centered on technical challenges and infrastructure. Contrary to most other nanoparticle approaches, thermosensitive liposomes can be easily employed for image-guided drug delivery, where the goal is to deliver the drug to a region identified by medical imaging. Based on the studies carried out in recent years, therapy with thermosensitive nanosystems associated with hyperthermia has been shown to overcome challenges faced by therapies based on free drugs or non-thermosensitive nanosystems. A large number of available approaches to generate these smart nanocarriers illustrates the versatility of the system and the great potential to be explored for future applications.

The key to future research and development of nanosystems associated with hyperthermia relies on the development of valid and non-invasive ways to promote and measure temperature, as well as to understand the variability in the individual physiological responses and extrapolating laboratory studies to field settings. Thus, more advanced preclinical studies are required, in addition to clinical studies, to prove the efficacy of these systems.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support and fellowships.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Oncoguia Estimativas No Mundo. Available online: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-mundo/1706/1/> (accessed on 25 September 2018).
2. Nardecchia, S.; Sánchez-Moreno, P.; De Vicente, J.; Marchal, J.A.; Boulaiz, H. Clinical Trials of Thermosensitive Nanomaterials: An Overview. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Shao, P.; Wang, B.; Wang, Y.; Li, J.; Zhang, Y. The Application of Thermosensitive Nanocarriers in Controlled Drug Delivery. *J. Nanomater.* **2011**, *2011*, 17. [[CrossRef](#)]
4. Lopes, C.M.; Barata, P.; Oliveira, R. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*; Grumezescu, A.M., Ed.; Elsevier: Porto, Portugal, 2018; ISBN 978-0-12-813689-8.
5. Ta, T.; Porter, T.M. Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. *J. Control. Release* **2013**, *169*, 112–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Behrouzkhia, Z.; Joveini, Z.; Keshavarzi, B.; Eyvazzadeh, N.; Aghdam, R.Z. Hyperthermia: How can it be used? *Oman Med. J.* **2016**, *31*, 89–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sánchez-Moreno, P.; De Vicente, J.; Nardecchia, S.; Marchal, J.A.; Boulaiz, H. Thermo-Sensitive Nanomaterials: Recent Advance in Synthesis and Biomedical Applications. *Nanomaterials* **2018**, *11*, 935. [[CrossRef](#)]
8. Januszewski, A.; Stebbing, J. Hyperthermia in cancer: Is it coming of age? *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 565–566. [[CrossRef](#)]
9. Westermarck, F. Über die Behandlung des ulcerirenden Cervix carcinoma mittels Knonstanter Wärme. *Zentralbl. Gynakol.* **1898**, 1335–1339.

10. Vaupel, P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* **2004**, *14*, 198–206. [[CrossRef](#)]
11. Hildebrandt, B.; Wust, P.; Ahlers, O.; Dieing, A.; Sreenivasa, G.; Kerner, T.; Felix, R.; Riess, H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *43*, 33–56. [[CrossRef](#)]
12. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Control. Release* **2016**, *244*, 108–121. [[CrossRef](#)]
13. Vaupel, P.; Rallinoã, F.; Okunieff, P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment Human Tumors: A Review. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6449–6465. [[PubMed](#)]
14. May, J.P.; Li, S. Hyperthermia-induced drug targeting. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10*, 511–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hegyi, G.; Szigeti, G.P.; Szász, A. Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 672873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Vaupel, P.; Horsman, M.R. Tumour perfusion and associated physiology: Characterization and significance for hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **2010**, *26*, 209–210. [[CrossRef](#)]
17. Ahmed, K.; Zaidi, S.F. Treating cancer with heat: Hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *J. Pak. Med. Assoc.* **2013**, *63*, 504–508.
18. Roti Roti, J.; Kampinga, H.; Malyapa, R.; Wright, W.; VanderWaal, R.; Xu, M. Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells. *Cell Stress Chaperones* **1998**, *3*, 245–255. [[CrossRef](#)]
19. Peeken, J.C.; Vaupel, P.; Combs, S.E.; Combs, S.E. Integrating Hyperthermia into Modern Radiation Oncology: What Evidence Is Necessary? *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 132. [[CrossRef](#)]
20. Rau, B.; Wust, P.; Tilly, W.; Gellermann, J.; Harder, C.; Riess, H.; Budach, V.; Felix, R.; Schlag, P.M. Preoperative radiochemotherapy in locally advanced or recurrent rectal cancer: Regional radiofrequency hyperthermia correlates with clinical parameters. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2000**, *48*, 381–391. [[CrossRef](#)]
21. Vujaskovic, Z.; Poulson, J.M.; Gaskin, A.A.; Thrall, D.E.; Page, R.L.; Charles, H.C.; MacFall, J.R.; Brizel, D.M.; Meyer, R.E.; Prescott, D.M.; et al. Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2000**, *46*, 179–185. [[CrossRef](#)]
22. Lepock, J.R. Role of nuclear protein denaturation and aggregation in thermal radiosensitization. *Int. J. Hyperth.* **2009**, *20*, 115–130. [[CrossRef](#)]
23. Issels, R.; Kampmann, E.; Kanaar, R.; Lindner, L.H. Hallmarks of hyperthermia in driving the future of clinical hyperthermia as targeted therapy: Translation into clinical application. *Int. J. Hyperth.* **2016**, *32*, 89–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dou, Y.; Hynynen, K.; Allen, C. To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes. *J. Control. Release* **2017**, *249*, 63–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Koning, G.A.; Eggermont, A.M.M.; Lindner, L.H.; Ten Hagen, T.L.M. Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 1750–1754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Van Der Zee, J.; González González, D.; Van Rhoon, G.C.; Van Dijk, J.D.P.; Van Putten, W.L.J.; Hart, A.A.M. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: A prospective, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* **2000**, *355*, 1119–1125. [[CrossRef](#)]
27. Chatterjee, D.K.; Diagaradjane, P.; Krishnan, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Ther. Deliv.* **2011**, *2*, 1001–1014. [[CrossRef](#)]
28. Wessalowski, R.; Schneider, D.T.; Mils, O.; Friemann, V.; Kyrillopoulou, O.; Schaper, J.; Matuschek, C.; Rothe, K.; Leuschner, I.; Willers, R.; et al. Regional deep hyperthermia for salvage treatment of children and adolescents with refractory or recurrent non-testicular malignant germ-cell tumours: An open-label, non-randomised, single-institution, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **2013**, *14*, 843–852. [[CrossRef](#)]
29. Issels, R.D. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 2546–2554. [[CrossRef](#)]
30. Issels, R.D.; Lindner, L.H.; Verweij, J.; Wust, P.; Reichardt, P.; Schem, B.C.; Abdel-Rahman, S.; Daugaard, S.; Salat, C.; Wendtner, C.M.; et al. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: A randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.* **2010**, *11*, 561–570. [[CrossRef](#)]
31. Fan, Y.; Qin, Y.; Li, D.-G.; Kerr, D. Retrospective Clinical Study of Advanced Pancreatic Cancer Treated With Chemotherapy and Abdominal Hyperthermia. *J. Glob. Oncol.* **2017**, *4*, 1–4. [[CrossRef](#)]

32. Okonogi, N.; Ebara, T.; Ishikawa, H.; Yoshida, D.; Ueno, M.; Maeno, T. A seven-year disease-free survivor of malignant pleural mesothelioma treated with hyperthermia and chemotherapy: A case report. *J. Med. Case Rep.* **2012**, *6*, 427. [CrossRef]
33. Wismeth, C.; Dudel, C.; Pascher, C.; Ramm, P.; Ru, P. Transcranial electro-hyperthermia combined with alkylating chemotherapy in patients with relapsed high-grade gliomas: Phase I clinical results. *J. Neurooncol.* **2010**, *98*, 395–405. [CrossRef] [PubMed]
34. Franckena, M.; Stalpers, L.J.A.; Koper, P.C.M.; Wiggeraad, R.G.J.; Hoogenraad, W.J.; van Dijk, J.D.P.; Wárlám-Rodenhuis, C.C.; Jobsen, J.J.; van Rhoon, G.C.; van der Zee, J. Long-Term Improvement in Treatment Outcome After Radiotherapy and Hyperthermia in Locoregionally Advanced Cervix Cancer: An Update of the Dutch Deep Hyperthermia Trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2008**, *70*, 1176–1182. [CrossRef] [PubMed]
35. Refaat, T.; Sachdev, S.; Sathiseelan, V.; Helenowski, L.; Abdelmoneim, S.; Pierce, M.C.; Woloschak, G.; Small, W., Jr.; Mittal, B.; Kiel, K.D. Hyperthermia and radiation therapy for locally advanced or recurrent breast cancer. *Breast* **2016**, *24*, 418–425. [CrossRef] [PubMed]
36. Wust, P.; Hildebrandt, B.; Sreenivasa, G.; Rau, B.; Gellermann, J.; Riess, H.; Felix, R.; Schlag, P. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 487–497. [CrossRef]
37. National Cancer Institute. Hyperthermia in Cancer Treatment. Available online: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/type> (accessed on 9 September 2018).
38. Habash, R.W.Y.; Bansal, R.; Krewski, D.; Alhafid, H.T. Thermal Therapy, Part 2: Hyperthermia Techniques. *Biomed. Eng. (NY)* **2006**, *34*, 491–542. [CrossRef]
39. Dupré, A.; Melodelima, D.; Pflieger, H.; Chen, Y.; Vincenot, J.; Kocot, A.; Langonnet, S.; Rivoire, M. Thermal Ablation of the Pancreas With Intraoperative High-Intensity Focused Ultrasound Safety and Efficacy in a Porcine Model. *Pancreas J.* **2017**, *46*, 219–224. [CrossRef]
40. Thermosome Deep Regional Radiofrequency (RF) Hyperthermia. Available online: <http://www.thermosome.com/heating-technologies> (accessed on 7 March 2019).
41. Okhai, T.A.; Smith, C.J. *Principles and Application of RF System for Hyperthermia Therapy*; Huilgol, N., Ed.; Intech: Rijeka, Croatia, 2013; ISBN 978-0-7695-3453-4.
42. Nguyen, P.T.; Abbosh, A.; Member, S.; Crozier, S. Three-Dimensional Microwave Hyperthermia for Breast Cancer Treatment in a Realistic Environment Using Particle Swarm Optimization. *Biomed. Eng. (NY)* **2017**, *64*, 1335–1344. [CrossRef]
43. Dombrovsky, L.A.; Randrianalisoa, J.H.; Lipi, W.; Timchenko, V. Simplified approaches to radiative transfer simulations in laser-induced hyperthermia of superficial tumors. *Comput. Therm. Sci.* **2013**, *5*, 521–530. [CrossRef]
44. Singh, R.; Das, K.; Okajima, J.; Maruyama, S.; Mishra, S.C. Modeling skin cooling using optical windows and cryogenics during laser induced hyperthermia in a multilayer vascularized tissue. *Appl. Therm. Eng.* **2015**, *89*, 28–35. [CrossRef]
45. Kappiyoor, R.; Liangruksa, M.; Ganguly, R.; Puri, I.K. The effects of magnetic nanoparticle properties on magnetic fluid hyperthermia. *J. Appl. Phys.* **2010**, *108*, 094702. [CrossRef]
46. Liu, X.L.; Fan, H.M. Innovative magnetic nanoparticle platform for magnetic resonance imaging and magnetic fluid hyperthermia applications. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2014**, *4*, 38–46. [CrossRef]
47. Wang, H.; Kumar, R.; Nagesha, D.; Duclos, R.L.; Sridhar, S.; Gatley, S.J. Integrity of ¹¹¹In-radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the mouse. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42*, 65–70. [CrossRef] [PubMed]
48. Mokhodoeva, O.; Vlk, M.; Málková, E.; Kukleva, E.; Mičolová, P.; Štamberg, K.; Šlouf, M.; Dzhenloda, R.; Kozempel, J. Study of ²²³Ra uptake mechanism by Fe₃O₄ nanoparticles: Towards new prospective theranostic SPIONs. *J. Nanopart. Res.* **2016**, *18*, 301. [CrossRef]
49. Ognjanović, M.; Radović, M.; Mirković, M.; Prijović, Ž.; Del Puerto Morales, M.; Čeh, M.; Vranješ-Durić, S.; Antić, B. ^{99m}Tc-, ⁹⁰Y-, and ¹⁷⁷Lu-Labeled Iron Oxide Nanoflowers Designed for Potential Use in Dual Magnetic Hyperthermia/Radionuclide Cancer Therapy and Diagnosis. *Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *44*, 41109–41117. [CrossRef]
50. Pospisilova, M.; Zapotocky, V.; Nesporova, K.; Laznickek, M.; Laznickova, A.; Zidek, O.; Cepa, M.; Vagnerova, H.; Velebný, V. Preparation and biodistribution of ⁵⁹Fe-radiolabelled iron oxide nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2017**, *19*, 80. [CrossRef]

51. Jordan, A.; Wust, P.; Fähling, H.; John, W.; Hinz, A.; Felix, R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: Physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int. J. Hypertherm.* **1993**, *9*, 51–68. [[CrossRef](#)]
52. De Simone, M.; Panetta, D.; Bramanti, E.; Giordano, C.; Salvatici, M.C.; Gherardini, L.; Menciasci, A.; Burchielli, S.; Cinti, C.; Salvadori, P.A. Magnetically driven nanoparticles: 18FDC-radiolabelling and positron emission tomography biodistribution study. *Contrast Media Mol. Imaging* **2016**, *11*, 561–571. [[CrossRef](#)]
53. Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J. Control. Release* **2008**, *126*, 187–204. [[CrossRef](#)]
54. Xin, Y.; Yin, M.; Zhao, L.; Meng, F.; Luo, L. Recent progress on nanoparticle-based drug delivery systems Tumor targeting by nanoparticles. *Cancer Biol. Med.* **2017**, *14*, 228–241. [[CrossRef](#)]
55. Sánchez-moreno, P.; Ortega-vinuesa, J.L.; Peula-garcía, J.M. Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 1–22.
56. Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.G.; Shin, D.M. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310–1317. [[CrossRef](#)]
57. Seo, H.L.; Cheon, Y.A.; Chung, B.G. Graphene and Thermo-responsive Polymeric Nanocomposites for Therapeutic Applications. *Biomed. Eng. Lett.* **2016**, *6*, 10–15. [[CrossRef](#)]
58. Deshpande, S.; Sharma, S.; Koul, V.; Singh, N. Core-Shell Nanoparticles as an Efficient, Sustained, and Triggered Drug-Delivery System. *Am. Chem. Soc. Omega* **2017**, *2*, 6455–6463.
59. Torchilin, V.P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Sideratou, Z.; Agathokleous, M.; Theodossiou, T.A.; Tsiourvas, D. Functionalized Hyperbranched Polyethyleneimines as Thermosensitive Drug Delivery Nanocarriers with Controlled Transition Temperatures. *Biomacromolecules* **2018**, *2*, 315–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kumar, A.; Srivastava, A.; Yu, L.; Mattiasson, B. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1205–1237. [[CrossRef](#)]
62. Matanovic, M.R.; Kristl, J.; Grabnar, P.A. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int. J. Pharm.* **2014**, *472*, 262–275. [[CrossRef](#)]
63. Tu, X.; Meng, C.; Wang, Y.; Ma, L.; Wang, B.; He, J. Fabrication of Thermosensitive Cyclic Brush Copolymer with Enhanced Therapeutic Efficacy for Anticancer Drug Delivery. *Macromolecular* **2018**, *39*, 1700744. [[CrossRef](#)]
64. Yoshida, R.; Uchida, K.; Kaneko, Y.; Sakai, K.; Kikuchi, A.; Sakurai, Y.; Okano, T. Comb-type grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature changes. *Nature* **1995**, *374*, 240–242. [[CrossRef](#)]
65. Hrubý, M.; Šubr, V.; Kučka, J.; Kozempel, J.; Lebeda, O.; Sikora, A. Thermoresponsive polymers as promising new materials for local radiotherapy. *Appl. Radiat. Isot.* **2005**, *63*, 423–431. [[CrossRef](#)]
66. Hruby, M.; Kucka, J.; Lebeda, O.; Mackova, H.; Babic, M.; Konak, C.; Studenovský, M.; Sikora, A.; Kozempel, J.; Ulbrich, K. New bioerodable thermoresponsive polymers for possible radiotherapeutic applications. *J. Control. Release* **2007**, *119*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Hrubý, M.; Kucka, J.; Mackova, H.; Konak, C.; Vetrík, M.; Kozempel, J.; Lebeda, O. New binary thermoresponsive polymeric system for local chemoradiotherapy. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *111*, 2220–2228. [[CrossRef](#)]
68. Sedláček, O.; Čermoch, P.; Kučka, J.; Konefal, R.; Štěpánek, P.; Vetrík, M.; Lodge, T.P.; Hrubý, M. Thermoresponsive Polymers for Nuclear Medicine: Which Polymer Is the Best? *Langmuir* **2016**, *32*, 6115–6122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jeong, B.; Gutowska, A. Lessons from nature: Stimuli-responsive polymers and their biomedical applications. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 305–311. [[CrossRef](#)]
70. Kim, S.; Kim, J.-H.; Jeon, O.; Kwon, I.C.; Park, K. Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *71*, 420–430. [[CrossRef](#)]
71. Bodratti, A.M.; Alexandridis, P. Amphiphilic block copolymers in drug delivery: Advances in formulation structure and performance. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15*, 1085–1104. [[CrossRef](#)]
72. Liu, A.H.; Wang, K.; Yang, C.; Huang, S.; Wang, M. Multifunctional polymeric micelles loaded with doxorubicin and poly(dithienyl-diketopyrrolopyrrole) for near-infrared light-controlled chemo-phototherapy of cancer cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *157*, 398–406. [[CrossRef](#)]

73. Peralta, M.E.; Jadhav, S.A.; Magnacca, G.; Scalapone, D.; Mártire, D.O.; Parolo, M.E.; Carlos, L. Synthesis and in vitro testing of thermoresponsive polymer-grafted core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles for efficient controlled and targeted drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *544*, 198–205. [[CrossRef](#)]
74. Talelli, M.; Hennink, W.E. Thermosensitive polymeric micelles for targeted drug delivery R eview. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 1245–1255. [[CrossRef](#)]
75. Chen, C.; Kim, T.H.; Wu, W.; Huang, C.; Wei, H. pH-Dependent, Thermosensitive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery to Solid Tumors. *Biomaterials* **2014**, *34*, 4501–4509. [[CrossRef](#)]
76. Liu, B.; Yang, M.; Li, R.; Ding, Y.; Qian, X. The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 527–534. [[CrossRef](#)]
77. Liu, B.; Yang, M.L.; Li, X.; Qian, X.; Shen, Z.; Ding, Y.; Yu, L. Enhanced Efficiency of Thermally Targeted Taxanes Delivery in a Human Xenograft Model of Gastric Cancer. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 3170–3181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Reyes-ortega, F.; Delgado, A.V.; Scheneider, E.K.; Fernandez, B.L.C.; Iglesias, G.R. Magnetic Nanoparticles Coated with a Thermosensitive Polymer with Hyperthermia Properties. *Polymers (Basel)* **2018**, *10*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Schroffenegger, M.; Reimhult, E. Thermoresponsive Core-Shell Nanoparticles: Does Core size matter? *Materials (Basel)* **2018**, *11*, 1654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Cazares-cortes, E.; Nerantzaki, M.; Wilhelm, C.; Christine, M. Magnetic Nanoparticles Create Hot Spots in Polymer Matrix for Controlled Drug Release. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 850. [[CrossRef](#)]
81. Shin, T.; Choi, Y.; Kim, S.; Cheon, J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4501–4516. [[CrossRef](#)]
82. Wang, Z.; Zhang, H.; Yang, Y.; Xie, X.; Yang, Y.; Li, Z.; Li, Y.; Gong, W.; Yu, F.; Yang, Z.; et al. Preparation, characterization, and efficacy of thermosensitive liposomes containing paclitaxel Preparation, characterization, and efficacy of thermosensitive liposomes. *Drug Deliv. Rev.* **2016**, *23*, 1222–1231. [[CrossRef](#)]
83. Li, P.; Han, J. Synthetic Glycopolypeptide Micelle for Targeted Drug Delivery to Hepatic Carcinoma. *Polymers (Basel)* **2018**, *10*, 611. [[CrossRef](#)]
84. Shen, B.B.; Gao, X.C.; Yu, S.Y.; Ma, Y.; Ji, C.H. Fabrication and potential application of di-functional magnetic system: Magnetic hyperthermia therapy and drug delivery. *CrystEngComm* **2013**, *18*, 1133–1138. [[CrossRef](#)]
85. Hoffman, A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23. [[CrossRef](#)]
86. Bajpai, A.K.; Shukla, S.K.; Bhanu, S.; Kankane, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1088–1118. [[CrossRef](#)]
87. Yin, X.; Hoffman, A.S.; Stayton, P.S. Poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) copolymers that respond sharply to temperature and pH. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1381–1385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Canal, T.; Peppas, N.A. Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23*, 1183–1193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Huang, H.; Qi, X.; Chen, Y.; Wu, Z. Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review. *Saudi Pharm. J.* **2019**. [[CrossRef](#)]
90. Artech Pujana, M.; Pérez-Álvarez, L.; Cesteros Iturbe, L.C.; Katime, I. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 836–842. [[CrossRef](#)]
91. Turabee, M.H.; Jeong, T.H.; Ramalingam, P.; Kang, J.H.; Ko, Y.T. N,N,N-trimethyl chitosan embedded in situ Pluronic F127 hydrogel for the treatment of brain tumor. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *203*, 302–309. [[CrossRef](#)]
92. Poeso, J.I.; Rico, M.J.; Rozados, V.R.; Scharovsky, O.G.; Luna, J.A.; Mengatto, L.N. Paclitaxel delivery system based on poly(lactide-co-glycolide) microparticles and chitosan thermo-sensitive gel for mammary adenocarcinoma treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* **2018**, *70*, 1494–1502. [[CrossRef](#)]
93. Magin, R.L.; Wright, S.M.; Niesman, M.R.; Chan, H.C.; Swartz, H.M. Liposome Delivery of NMR Contrast Agents for Improved Tissue Imaging. *Magn. Resonance Med.* **1986**, *3*, 440–447. [[CrossRef](#)]
94. Needham, D.; Anyarambhatla, G.; Kong, G.; Dewhirst, M.W. A New Temperature-sensitive Liposome for Use with Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1197–1201.
95. Frézard, F.; Mg, B.H.; Rocha, O.G.F. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quim Nova* **2005**, *28*, 511–518. [[CrossRef](#)]
96. Yatvin, M.; Weinstein, J.; Dennis, W.; Blumenthal, R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* **1978**, *202*, 1290–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

97. Nibu, Y.; Inoue, T.; Motoda, I. Effect of headgroup type on the miscibility of homologous phospholipids with different acyl chain lengths in hydrated bilayer. *Biophys. Chem.* **1995**, *56*, 273–280. [CrossRef]
98. Arouri, A.; Mouritsen, O.G. Progress in Lipid Research Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 130–140. [CrossRef] [PubMed]
99. Sandstro, M.C.; Mayer, L.D.; Edwards, K. Effects of lipid segregation and lysolipid dissociation on drug release from thermosensitive liposomes. *J. Control. Release* **2005**, *107*, 131–142. [CrossRef]
100. Limmer, S.; Hahn, J.; Schmidt, R.; Wachholz, K.; Zengerle, A.; Lechner, K.; Eibl, H.; Issels, R.D.; Hossann, M.; Lindner, L.H. Gemcitabine Treatment of Rat Soft Tissue Sarcoma with Phosphatidylglycerol-Based Thermosensitive Liposomes. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 2276–2286. [CrossRef]
101. Peller, M.; Willerding, L.; Limmer, S.; Hossann, M.; Dietrich, O.; Ingrischi, M.; Sroka, R.; Lindner, L.H. Surrogate MRI markers for hyperthermia-induced release of doxorubicin from thermosensitive liposomes in tumors. *J. Control. Release* **2016**, *237*, 138–146. [CrossRef]
102. Willerding, L.; Limmer, S.; Hossann, M.; Zengerle, A.; Wachholz, K.; Timo, L.M.; Ten, H.; Koning, G.A.; Sroka, R.; Lindner, L.H.; et al. Method of hyperthermia and tumor size influence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors. *J. Control. Release* **2016**, *222*, 47–55. [CrossRef]
103. Lokerse, W.J.M.; Bolkestein, M.; Dalm, S.U.; Eggermont, A.M.M.; De Jong, M.; Grull, H.; Koning, G.A. Comparing the therapeutic potential of thermosensitive liposomes and hyperthermia in two distinct subtypes of breast cancer. *J. Control. Release* **2017**, *258*, 34–42. [CrossRef]
104. Rizzitelli, S.; Giustetto, P.; Faletto, D.; Castelli, D.D.; Aime, S.; Terreno, E. The release of Doxorubicin from liposomes monitored by MRI and triggered by a combination of US stimuli led to a complete tumor regression in a breast cancer mouse model. *J. Control. Release* **2016**, *230*, 57–63. [CrossRef]
105. Rizzitelli, S.; Giustetto, P.; Cutrin, J.C.; Castelli, D.D.; Boffa, C.; Ruzza, M.; Menchise, V.; Molinari, F.; Aime, S.; Terreno, E. Sonosensitive theranostic liposomes for preclinical in vivo MRI-guided visualization of doxorubicin release stimulated by pulsed low intensity non-focused ultrasound. *J. Control. Release* **2015**, *202*, 21–30. [CrossRef]
106. Negussie, A.H.; Yarmolenko, P.S.; Partanen, A.; Ranjan, A.; Jacobs, G.; Woods, D.; Bryant, H.; Thomasson, D.; Mark, W.; Wood, B.J.; et al. Formulation and characterisation of magnetic resonance imageable thermally sensitive liposomes for use with magnetic resonance-guided high intensity focused ultrasound. *Int. J. Hypertherm.* **2011**, *27*, 140–155. [CrossRef] [PubMed]
107. De Smet, M.; Heijman, E.; Langereis, S.; Hijnen, N.M.; Grull, H. Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An in vivo proof-of-concept study. *J. Control. Release* **2011**, *150*, 102–110. [CrossRef] [PubMed]
108. Staruch, R.M.; Hynynen, K.; Chopra, R. Hyperthermia-mediated doxorubicin release from thermosensitive liposomes using MR-HIFU: Therapeutic effect in rabbit Vx2 tumours. *Int. J. Hypertherm.* **2015**, *31*, 118–133. [CrossRef] [PubMed]
109. Hijnen, N.; Kneepkens, E.; De Smet, M.; Langereis, S.; Heijman, E.; Grull, H. Thermal combination therapies for local drug delivery by magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 4802–4811. [CrossRef]
110. Singh, P.; Pandit, S.; Mokkalapati, V.R.S.S.; Garg, A.; Ravikumar, V.; Mijakovic, I. Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1917. [CrossRef]
111. U.S. National Library of Medicine. Pilot Study of AuroLase(tm) Therapy in Refractory and/or Recurrent Tumors of the Head and Neck. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00848042?term=AuroLase&draw=2&rank=1> (accessed on 6 November 2019).

