

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

HELOÍSA ATHAYDES SEABRA FERREIRA

**EMPREGO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA
CONTENDO CISPLATINA E PACLITAXEL COMO ALTERNATIVA PARA O
TRATAMENTO DE TUMORES DE MAMA**

BELO HORIZONTE – MG

2018

HELOÍSA ATHAYDES SEABRA FERREIRA

**EMPREGO DE LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA
CONTENDO CISPLATINA E PACLITAXEL COMO ALTERNATIVA PARA O
TRATAMENTO DE TUMORES DE MAMA**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Coorientadoras: Profa. Dra. Elaine Amaral
Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva

Belo Horizonte – MG

2018

F383e Ferreira, Heloísa Athaydes Seabra.
Emprego de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina e paclitaxel como alternativa para o tratamento de tumores de mama / Heloísa Athaydes Seabra Ferreira. – 2018.
116 f. : il.

Orientador: André Luís Branco de Barros.
Coorientadoras: Elaine Amaral Leite e Izabella Thaís da Silva.

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

1. Câncer de mama – Teses. 2. Lipossomas – Teses. 3. Cisplatina – Teses. 4. Paclitaxel – Teses. I. Barros, André Luís Branco de. II. Leite, Elaine Amaral. III. Silva, Izabella Thaís da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.994



FOLHA DE APROVAÇÃO

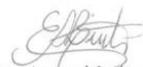
Emprego de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo cisplatina e paclitaxel como alternativa para o tratamento de tumores de mama

HELOÍSA ATHAYDES SEABRA FERREIRA

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

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. André Luís Branco de Barros - Orientador
UFMG


Profa. Elaine Amaral Leite - Coorientadora
UFMG


Profa. Izabella Thais da Silva - Coorientadora
UFMG


Prof. Adriano de Paula Sabino
UFMG


Prof. Daniel Cristian Ferreira Soares
UNIFEI

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer à minha família por dividir comigo os momentos de angústia e dificuldades. Vocês são fonte constante de dedicação, apoio e alegria.

À minha mãe, Silvani, por ser meu maior exemplo de força, superação, amor e pelo apoio incondicional. Ao meu pai por me apoiar e compreender minhas ausências. Ao meu irmão pelo companheirismo e por se orgulhar de mim.

Ao Renato, por ser meu companheiro diário, ouvir minhas reclamações pacientemente e por sempre me dar força para continuar. Você é um grande exemplo de paciência e perseverança.

Ao Prof. André pela confiança em meu trabalho e pela orientação. Obrigada pela ajuda com os animais, por todos os conselhos e amizade.

À Profa. Elaine, pela oportunidade, por ter me recebido com carinho, confiado em mim para a execução desse trabalho e pela coorientação.

À Profa. Izabella, por ter aceitado participar deste projeto, mesmo com ele em andamento, e ter me ajudado enormemente na cultura celular e pela coorientação.

A vocês, meu orientador e coorientadoras, muito obrigada pelos ensinamentos, pela disponibilidade em discutir o andamento do projeto, por contribuírem com o meu crescimento acadêmico e profissional e por me mostrarem que tudo tem seu tempo.

À Profa. Mônica por me receber com simpatia no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

À Profa. Josianne e à Mirna do Laboratório de Toxicologia Ocupacional por terem aceitado colaborar com esse trabalho, abrindo as portas de seu laboratório para mim.

À colaboração do Professor Geovanni Dantas Cassali do departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG por toda a ajuda com as análises histopatológicas dos tecidos dos animais.

Às grandes amizades feitas no LTF, obrigada pela convivência diária, pelos conselhos, dicas e risadas e por tornarem o trabalho mais leve. Agradeço especialmente a Aline, Ana Luiza, Juliana e Marina por terem me ajudado de maneira mais próxima, contribuindo imensamente para meu aprendizado.

À aluna de TCC, Eliza, por me ajudar na execução desse trabalho.

Ao apoio técnico, especialmente Vinícius do LTF e Vanderli do Laboratório de Radioisótopos, pela disponibilidade no que fosse preciso.

Ao Batista e à Adelaide pela gentileza e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq que através da concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro possibilitaram o desenvolvimento do objetivo a que nos propusemos.

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia com maior incidência e mortalidade na população feminina em todo o mundo, sendo o câncer de mama triplo negativo o subtipo mais agressivo e de prognóstico mais complexo. O paclitaxel (PTX) e a cisplatina (CDDP) apresentam elevada atividade antitumoral contra células desse tipo de tumor. Estudos têm demonstrado que a coadministração desses fármacos em nanossistemas alcança efeitos sinérgicos contra células neoplásicas além de reduzir a ocorrência de efeitos indesejáveis decorrentes da sua utilização. A proposta desse estudo consistiu na avaliação *in vitro* e *in vivo* de PTX e CDDP encapsulados em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL), na razão molar PTX:CDDP 1:3, buscando melhor atividade antitumoral e redução dos efeitos adversos. Formulações lipossomais contendo PTX e CDDP, previamente desenvolvidas, foram otimizadas com relação ao método de preparo e teor de encapsulação. As formulações tiveram sua atividade citotóxica avaliada frente às linhagens de câncer de mama triplo negativo humano (células MDA-MB-231) e murino (células 4T1). O estudo de sinergismo realizado com a linhagem 4T1 demonstrou efeito antagônico quando as células foram tratadas com os fármacos PTX e CDDP livres (razão molar 1:3), enquanto o tratamento das células com as formulações lipossomais resultou em um efeito sinérgico. Para o estudo da atividade antitumoral e toxicidade, camundongos BALB/c fêmeas portadores de tumor da linhagem 4T1 receberam, por via intravenosa, SpHL-PTX e SpHL-CDDP ou PTX e CDDP livres nas respectivas doses 7,5 mg/Kg e 8,0 mg/Kg (razão molar 1:3). O tratamento com uma única dose reduziu significativamente o crescimento tumoral em ambos os grupos tratados comparado ao grupo controle. Não foi observada variação significativa do peso dos animais ao longo do período de avaliação. Uma taxa de mortalidade de 28% foi observada no grupo que recebeu os fármacos livres, enquanto 100% de sobrevivência foi detectada no grupo que recebeu as formulações lipossomais. Focos metastáticos no pulmão foram observados apenas no grupo controle. Toxicidade hematológica caracterizada por leucopenia e plaquetopenia foi evidente apenas nos animais que receberam os fármacos livres. Além disso, um aumento da relação ureia/creatinina, sugestivo de toxicidade renal na fase inicial, foi detectado nesse grupo. Por outro lado, todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos, dos animais tratados com as formulações lipossomais, foram semelhantes ao grupo controle. Os resultados indicaram potencialização de efeito antitumoral e redução da toxicidade quando CDDP e PTX foram administrados em lipossomas, demonstrando a potencialidade da coadministração desses sistemas para o tratamento de tumores de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Lipossomas pH sensíveis de circulação prolongada. Cisplatina. Paclitaxel.

ABSTRACT

Breast cancer is a neoplasia that presents the highest incidence and mortality rate in women worldwide, among them the triple negative breast cancer is the most aggressive showing a worse prognosis. Paclitaxel (PTX) and cisplatin (CDDP) have shown high antitumor activity against triple negative breast tumor cells. Studies have shown that co-administration of PTX and CDDP in nanosystems can generate synergistic effects against neoplastic cells in addition to reducing the occurrence of side effects. The purpose of this study was to evaluate, by *in vitro* and *in vivo* assays, the PTX and CDDP encapsulated into pH-sensitive and long-circulating liposomes (SpHL), at a molar ratio PTX:CDDP of 1:3, aiming to improve antitumor activity and reduce adverse effects. Liposomal formulations content PTX and CDDP, previously developed, were optimized with respect to the preparation method and encapsulation content. The formulations had their cytotoxic activity evaluated against human (MDA-MB-231 cells) and murine (4T1 cells) triple-negative breast cancer. The synergism study was conducted with the 4T1 cell line demonstrating antagonistic effect when the cells were treated with free PTX and CDDP drugs (1:3 molar ratio, respectively), while treatment with the liposomal formulations resulted in a synergistic effect. For the study of antitumor activity and toxicity, 4T1 tumor-bearing female BALB/c mice received, intravenously, the SpHL-PTX and SpHL-CDDP or PTX and CDDP free at respective doses 7.5 mg/kg and 8.0 mg/kg (molar ratio 1:3). Treatment with a single dose significantly reduced tumor growth in both treated groups compared to the control group. No significant variation in the body weight was observed during the experimental period. A mortality rate of 28% was observed in the group that received the free drugs, while 100% survival was detected in the group treated with the liposomal formulations. Metastatic sites in the lung were observed only in the control group. Hematological toxicity characterized by leukopenia and thrombocytopenia was evident only in animals receiving the free drugs. In addition, an increase in urea/creatinine ratio, suggestive of early-stage renal toxicity, was detected in this group. On the other hand, all hematological and biochemical parameters of the animals treated with the liposomal formulations were similar to the control group. These results indicated a potentiation of antitumor effect and reduction of toxicity when CDDP and PTX were administered in liposomes, demonstrating the potential of coadministration of these systems for the treatment of breast tumors.

Key words: Breast cancer. pH-sensitive and long-circulating liposomes. Cisplatin. Paclitaxel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Crescimento desordenado das células tumorais no tecido sadio.....	19
Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto câncer de pele do tipo não melanoma.....	21
Figura 3 – Anatomia da mama feminina.....	23
Figura 4 – Estrutura química da cisplatina	29
Figura 5 – Hidrólise da cisplatina	29
Figura 6 – Formação dos adutos de cisplatina.....	30
Figura 7 – Vias de morte celular induzidas pela cisplatina.....	30
Figura 8 – Estrutura química do paclitaxel	33
Figura 9 – Representação da polimerização dos microtúbulos e da ligação do paclitaxel	34
Figura 10 – Representação esquemática de um lipossoma.....	40
Figura 11 – Representação do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) e direcionamento ativo.....	44
Figura 12 – Representação das mudanças de fase desencadeadas pelo pH nos lipossomas constituídos por DOPE e CHEMS	46
Figura 13 – Efeito dos fármacos livres (linha cheia) e dos fármacos encapsulados (linha tracejada) na citotoxicidade frente à células de diferentes linhagens pelo ensaio com SRB.....	68
Figura 14 – Variação da viabilidade celular da linhagem 4T1 observada após 48 horas de tratamento com CDDP (barra branca), PTX (barra cinza) e a mistura (barra preta). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão	71
Figura 15 – Efeito antitumoral em camundongos BALB/c observados até 6 dias após a administração IV de SpHL (barra branca), CDDP + PTX (barra cinza) e SpHL-PTX + SpHL-CDDP (barra preta). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão	75

Figura 16 – Cortes histológicos de tumor de camundongos BALB/c fêmeas inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (c) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 200x. As setas pretas representam o parênquima tumoral. As cabeças de seta indicam áreas de infiltrado inflamatório	77
Figura 17 – Corte histológico do tecido pulmonar de fêmeas de camundongos BALB/c controle inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200x. As setas pretas representam focos metastáticos	78
Figura 18 – Variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas observados durante 6 dias após a administração IV de SpHL (barra branca), PTX + CDDP (barra cinza) e SpHL-PTX + SpHL-CDDP (barra preta). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão	80
Figura 19 – Cortes histológicos representativos dos rins de camundongos fêmeas BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 400x	86
Figura 20 – Cortes histológicos de fígado de fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 400x. As setas pretas demonstram focos metastáticos de tumor de células 4T1	88
Figura 21 – Cortes histológicos de intestino de fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 200x	89
Figura 22 – Cortes histológicos de baço de fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 200x	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Incidência e mortalidade do câncer de mama estratificada por idade para o ano de 2012 nos países desenvolvidos	22
Tabela 2 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular do câncer de mama por IHQ dos tumores de mama	25
Tabela 3 – Formulações lipossomais para o tratamento do câncer aprovadas pela agência regulatória americana (FDA).....	41
Tabela 4 – Condições analíticas para determinação de platina em lipossomas contendo cisplatina, empregando GF AAS	56
Tabela 5 – Representação do esquema de tratamento do sinergismo	59
Tabela 6 – Concentração de paclitaxel determinada após incubação com cisplatina	63
Tabela 7 – Características físico-químicas dos SpHL-PTX e SpHL-CDDP.....	64
Tabela 8 – Média dos valores de CI_{50} para as células tratadas com os fármacos PTX e CDDP livres e encapsulados.....	66
Tabela 9 – Comparação de citotoxicidade dos tratamentos com PTX e CDDP livres e encapsulados frente à célula saudável (fibroblasto) e tumorais (4T1 e MDA-MB-231)	69
Tabela 10 – Determinação da razão molar adequada entre os fármacos livres.....	70
Tabela 11 – Efeito antagônico e sinérgico do tratamento realizado com os fármacos livres e encapsulados, respectivamente.....	72
Tabela 12 – Resultados de mortalidade para camundongos BALB/c após o tratamento com SpHL, combinação de PTX + CDDP e combinação dos SpHL-PTX + SpHL-CDDP	81
Tabela 13 – Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c fêmeas tratados com SpHL, combinação de PTX + CDDP e combinação dos SpHL-CDDP + SpHL-PTX	81
Tabela 14 - Parâmetros leucocitários de camundongos BALB/c tratados com SpHL, combinação de PTX + CDDP e SpHL-CDDP + SpHL-PTX	83

Tabela 15 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal avaliados em camundongos BALB/c sete dias após a administração dos tratamentos84

Tabela 16 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos BALB/c sete dias após a administração dos tratamentos87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs/s	Absorbâncias integradas
ALT	Alanina amino tranferase
AST	Aspartato amino tranferase
BRCA	Gene supressor de tumor
CDDP	Cisplatina
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CHEMS	Hemisuccinato de colesterila
CI₅₀	Concentração capaz de inibir 50% de crescimento das células
CK5	Citoqueratina 5
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dose máxima tolerada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina
DOXO	Doxorrubicina
DP	Desvio padrão
DSPE-PEG₂₀₀₀	Distearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 2000
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico 1
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
ER	Receptor hormonal de estrógeno
Gama GT	Gama glutamil transpeptidase
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2
HR	Receptores hormonais
IC	Índice de combinação
IHQ	Imunohistoquímica
IS	Índice de seletividade
LRA	Lesão renal aguda

NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PR	Receptor de progesterona
Pt	Platina
PTX	Paclitaxel
REV	Evaporação em fase reversa
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute Medium
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SpHL	Lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada
SpHL-CDDP	Lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada contendo cisplatina
SpHL-PTX	Lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada contendo paclitaxel
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Teor de encapsulação
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
VR	Valores de referência
VRT	Volume relativo do tumor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Aspectos gerais do câncer.....	19
2.2	O câncer de mama	21
2.2.1	<i>Carcinogênese Mamária</i>	22
2.2.2	<i>Os subtipos de câncer de mama</i>	24
2.3	Tratamentos utilizados no câncer de mama.....	26
2.4	Cisplatina.....	28
2.4.1	<i>Efeitos tóxicos relacionados à administração de CDDP</i>	31
2.5	Paclitaxel	32
2.5.1	<i>Efeitos tóxicos relacionados à administração do PTX</i>	34
2.6	Combinação de fármacos no tratamento do câncer.....	35
2.6.1	<i>Combinação de cisplatina e paclitaxel no tratamento do câncer</i>	36
2.7	Lipossomas	39
2.7.1	<i>Tamanho e características da superfície de nanopartículas</i>	42
2.7.2	<i>Direcionamento Passivo</i>	42
2.7.3	<i>Direcionamento ativo</i>	43
2.10	A evolução dos lipossomas como carreadores de quimioterápicos	44
2.10.1	<i>Lipossomas peguilados</i>	45
2.10.2	<i>Lipossomas pH-sensíveis</i>	45
3	OBJETIVOS	49
3.1	Objetivo Geral.....	49
3.2	Objetivos específicos	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1	Material	50
4.2	Avaliação da reatividade entre PTX e CDDP.....	51
4.3	Preparo da solução de CDDP.....	51
4.4	Preparo da solução e dispersão micelar de PTX	51
4.5	Preparação dos lipossomas pH sensíveis de circulação prolongada	52
4.5.1	<i>Preparo dos SpHL-branco</i>	52
4.5.2	<i>Preparo dos SpHL-PTX</i>	53
4.5.3	<i>Preparo dos SpHL-CDDP</i>	54

4.6 Caracterização química e físico-química dos lipossomas	54
4.6.1 <i>Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta</i>	54
4.6.2 <i>Determinação do teor de encapsulação de PTX em SpHL-PTX</i>	54
4.6.3 <i>Determinação do teor de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP.....</i>	55
4.6.3.1 <i>Doseamento da CDDP por GF AAS</i>	56
4.6.3.2 <i>Preparo do padrão intermediário de Pt 350 µg/L.....</i>	56
4.6.3.3 <i>Preparo das amostras de SpHL-CDDP</i>	57
4.7 Cultivo Celular.....	57
4.7.1 <i>Avaliação da viabilidade celular.....</i>	57
4.7.2 <i>Análise de sinergismo entre os fármacos</i>	58
4.8 Experimentação <i>in vivo</i>.....	59
4.8.1 <i>Animais do estudo</i>	60
4.8.2 <i>Obtenção do modelo de tumor de mama 4T1 em camundongos BALB/c .</i>	60
4.8.3 <i>Delineamento experimental</i>	60
4.8.4 <i>Avaliação da atividade antitumoral</i>	60
4.8.5 <i>Avaliação de toxicidade</i>	61
4.8.5.1 <i>Investigação hematológica e bioquímica</i>	61
4.8.5.2 <i>Avaliação histopatológica</i>	62
4.9 Análise estatística.....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1 Compatibilidade entre os fármacos	63
5.2 Caracterização química e físico-química das formulações.....	63
5.2.1 <i>SpHL-CDDP e SpHL-PTX</i>	63
5.3 Estudo de viabilidade celular.....	65
5.4 Análise de sinergismo	70
5.5 Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i>.....	74
5.5.1 <i>Avaliação da atividade antitumoral mensurada a partir da capacidade de metastatização do tumor.....</i>	78
5.6 Avaliação da toxicidade geral de PTX + CDDP e dos SpHL-PTX + SpHL-CDDP	79
5.6.1 <i>Avaliação de peso, sinais clínicos e mortalidade dos animais.....</i>	79
5.6.2 <i>Investigação hematológica</i>	81
5.6.3 <i>Investigação bioquímica</i>	84

5.6.3.1	Investigação da toxicidade renal	84
5.6.3.2	Investigação da toxicidade hepática	87
5.6.3.3	Investigação da toxicidade intestinal	89
5.6.3.4	Investigação da toxicidade esplênica	90
5.7	Considerações finais	91
6	CONCLUSÃO.....	92
7	PERSPECTIVAS.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA EM SERES HUMANOS (CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS)	111
	ANEXO B – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS....	112

1 INTRODUÇÃO

O câncer corresponde a um grupo de doenças que acontece quando células normais adquirem características evolutivas vantajosas e que complementarmente promovem a transformação de células fenotipicamente normais em malignas e promove a progressão destas enquanto explora o tecido hospedeiro (FOUAD & AANEI, 2017).

Devido à elevada incidência, prevalência e mortalidade, o câncer se tornou um conjunto de doenças extensivamente estudado uma vez que há a necessidade de se entender os mecanismos de iniciação, promoção e progressão da neoplasia, bem como possíveis tratamentos para os pacientes. No mundo, foi estimado 14 milhões de casos novos de câncer e 8,8 milhões de mortes para o ano de 2015 (WHO, 2017). No Brasil, as estimativas também não são favoráveis, uma vez que para o biênio 2018-2019 são previstos 600 mil novos casos de câncer dos quais 170 mil correspondem ao câncer de pele do tipo não melanoma. O perfil epidemiológico para os 420 mil novos casos coloca o câncer de próstata como o mais frequente entre os homens e o câncer de mama entre as mulheres. Essa realidade torna relevante a busca por alternativas terapêuticas para o câncer de mama, foco do presente estudo (INCA, 2018).

O aparecimento do câncer de mama está condicionado ao crescimento descontrolado de determinadas células em diferentes partes do seio (ACS, 2017), sendo a principal causa de óbitos por câncer em mulheres com uma taxa de mortalidade em clara ascensão (BRASIL, 2015). Múltiplos fatores estão envolvidos na sua etiologia, por exemplo, o gênero, idade, história familiar, fatores endócrinos e reprodutivos, dentre outros. O câncer de mama é considerado uma doença de relativo bom prognóstico desde que diagnosticado e tratado em estágios iniciais (BABA & CÂTOI, 2007).

A cirurgia e a radioterapia são formas de tratamento valiosas para câncer primário, mas são ineficientes quando o câncer já se apresenta disseminado. O uso de medicamentos oncológicos (quimioterapia, hormonioterapia e terapia biológica) é a escolha atual para o tratamento de câncer refratário e metastático, uma vez que eles

são capazes de atingir todos os órgãos do corpo por meio da circulação sanguínea. (PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

Nos últimos anos, o paclitaxel (PTX) e a cisplatina (CDDP) têm recebido grande interesse no tratamento de diversos tipos de câncer (CAI *et al.*, 2015). A CDDP e o PTX são agentes quimioterápicos convencionais largamente empregados na clínica atual devido à sua excelente eficácia antitumoral contra vários tumores sólidos, incluindo o câncer de mama metastático. Esses dois fármacos possuem propriedades físico-químicas diferentes, farmacocinética e mecanismos distintos de ação, assim como diferentes toxicidades (KHOSRAVI-SHAHI, CANEZÓN-GUTIÉRREZ & CUSTODIO-CABELLO, 2017; SIKOV, 2015).

A combinação de fármacos quimioterápicos é um método promissor para melhorar a eficácia de tratamento antitumoral, pois visa atingir alvos diferentes nas células tumorais o que pode potencializar o efeito terapêutico, reduzir a dose e, conseqüentemente, a toxicidade e minimizar ou retardar os casos de resistência aos medicamentos (GRECO & VICENT, 2009). Na clínica, a combinação de PTX e CDDP é um protocolo bem estabelecido para o carcinoma cervical e câncer de ovário (JUDSON *et al.*, 1999; SIKOV, 2015).

A associação desses fármacos também representa uma tendência de tratamento para tumores de mama mais agressivos. Ensaios clínicos estão sendo realizados para comprovar a superioridade dessa combinação frente à monoterapia no tratamento do câncer de mama metastático (DUKE UNIVERSITY, 2014; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2008; NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY HOSPITAL, 2010). Evidências mais recentes sugerem que a administração semanal de PTX em uma dose muito menor (40 a 50 mg/m²) pode ser tão eficaz quanto as doses convencionais de paclitaxel (80 a 90 mg/m²), principalmente quando há a associação desse regime com CDDP, também em doses mais baixas, 24 mg/m² (FAR EASTERN MEMORIAL HOSPITAL, 2009). Devido a elevada taxa de resposta e maior sobrevida, a associação de PTX e CDDP tem sido estudada em outros tipos de tumores como, adenocarcinoma pancreático (RENI *et al.*, 2016), câncer esofágico (SUNTHARALINGAM *et al.*, 2017), cabeça e pescoço (BOSSI *et al.*, 2017), dentre outros.

Dentre várias estratégias para reduzir a toxicidade e aumentar a especificidade de agentes quimioterápicos, a entrega direcionada de fármacos por meio de nanocarreadores, incluindo lipossomas, é a mais promissora. Os lipossomas foram as primeiras nanopartículas utilizadas na oncologia clínica para carrear medicamentos para o tratamento do câncer. Esses nanossistemas podem entregar fármacos de maneira mais seletiva para tumores sólidos em função do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (efeito EPR), podendo levar a melhora nos perfis farmacocinéticos e de biodisponibilidade. Desse modo, é possível reduzir os efeitos adversos e aumentar a eficácia antitumoral (CHO *et al.*, 2008; HO, PFEFFER & SINGH, 2017; MARANHÃO *et al.*, 2017).

Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a coadministração de PTX e CDDP em nanossistemas alcança efeitos sinérgicos contra células neoplásicas além de reduzir a ocorrência de efeitos adversos decorrentes da utilização destes fármacos, uma vez que a dose a ser administrada normalmente é reduzida (SUN *et al.*, 2014). O regime de doses baixas de PTX e CDDP pode melhorar significativamente a adesão dos pacientes ao tratamento, levando a uma melhor resposta da terapia. Dessa maneira, a encapsulação desses fármacos é uma excelente ferramenta para reduzir toxicidade, dose e resistência adquirida e alcançar múltiplos alvos, e, com isso, conseguir uma maior atividade anticancerígena (GRECO & VICENT, 2009).

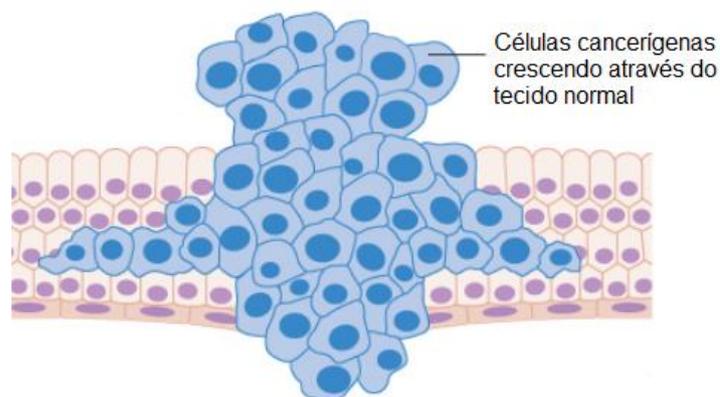
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do câncer

O corpo humano é formado por mais de 100 trilhões de células as quais estão presentes em número predeterminado para cada tipo celular. A divisão e a diferenciação morfológica e funcional são processos essenciais para os seres vivos, uma vez que são controlados por sinais intracelulares que indicam quanto e com que frequência devem se dividir. Em determinadas situações, alterações nesse sistema regulador podem ocorrer e resultam em distúrbios do crescimento e/ou da diferenciação celular e sua principal consequência são as neoplasias. As neoplasias podem ser classificadas em benignas ou malignas. Nesse último caso, também recebe o nome de câncer (BRASILEIRO FILHO, 2016; WHO, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2017), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças em que se observa o aparecimento rápido de células anormais que crescem além de seus limites habituais de maneira desorganizada. O crescimento descontrolado provoca a formação de um nódulo denominado tumor (FIGURA 1). Se não tratado, este pode expandir-se para tecidos vizinhos provocando um tumor secundário ou espalhar-se, podendo, eventualmente, atingir vasos sanguíneos e linfáticos em um processo denominado de metástase. As metástases são as principais causas de morte por câncer (WHO, 2017).

Figura 1 – Crescimento desordenado das células tumorais no tecido sadio



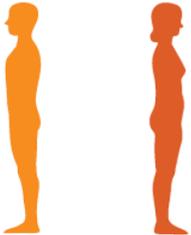
Para que um câncer se inicie, certas mutações ocorrem no DNA dos genes de uma célula, o que significa que o gene pode ter sido danificado, perdido ou foi copiado erroneamente. Essas mutações podem ocorrer em genes específicos, denominados genes supressores de tumor e proto-oncogenes. Os proto-oncogenes, a princípio, são inativos em células normais, mas quando ativados, transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização, uma vez que podem induzir a produção de proteínas que desencadeiam a divisão celular; ou inibir a produção de proteínas que sinalizam a parada da divisão celular (CANCER RESEARCH UK, 2017; INCA, 2018). Genes supressores de tumor, em condições normais, funcionam como freios de emergência para evitar a proliferação celular inapropriada. A mutação nesse gene promove sua inativação, tornando-o incapaz de parar a proliferação celular quando necessário e assim, promovendo o desenvolvimento do câncer (IARC, 2008; IURLARO, LEÓN-ANNICCHIARICO & MUÑOZ-PINEDO, 2014).

As causas do câncer estão inter-relacionadas, apesar de serem multifatoriais. Estendem-se desde fatores externos ou ambientais a fatores internos e até mesmo ao próprio envelhecimento. Este, por si só, aumenta a suscetibilidade à transformação maligna, uma vez que as células foram expostas com mais frequência a agentes cancerígenos e, também, por possuírem mecanismos de reparação celular menos efetivos. Os principais fatores de risco externos são: alimentação inadequada, obesidade, falta de exercícios físicos, tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, vírus, determinados medicamentos, exposição solar e às radiações. Dentre os fatores internos figuram: sistema imunológico comprometido, hormônios e predisposição genética. Normalmente, as causas internas estão relacionadas à capacidade de defesa do organismo frente às agressões externas (INCA, 2018; WHO, 2017).

O câncer é uma doença que apresenta elevada incidência e alta taxa de mortalidade, sendo a segunda causa de morte no mundo, responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015 (WHO, 2017). A estimativa do projeto Globocan/Iarc de 2012 mostrou que dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para o biênio 2018-2019 foram previstos 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Desses, estimava-se que 170 mil casos fossem de câncer de pele do tipo não melanoma. O perfil epidemiológico para os

420 mil novos casos coloca o câncer de próstata (68 mil) como o mais frequente entre os homens e o câncer de mama (60 mil) entre as mulheres (FIGURA 2) (INCA, 2018). Sendo assim, é inquestionável que o câncer é um problema de saúde pública (LODI *et al.*, 2017). Essa realidade torna relevante a busca por alternativas terapêuticas para o câncer de mama, foco do presente estudo.

Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto câncer de pele do tipo não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Os números foram arredondados para múltiplo de 10

Adaptado de INCA, 2018

2.2 O câncer de mama

No Brasil, o câncer de mama é a neoplasia com a maior incidência na população feminina com aproximadamente 59.700 casos novos estimados para 2018 (um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres) e com uma taxa de sobrevivência aproximada de 80%. O câncer de mama tem um risco estimado que varia entre 74,3 a 22,3 casos a cada 100 mil mulheres na região Sul e Norte do Brasil, respectivamente. Paralelamente, é a principal causa de óbitos por câncer em mulheres com uma taxa de mortalidade em clara ascensão (BRASIL, 2015; INCA, 2015; SBOC, 2011).

A incidência do câncer de mama tem aumentado nas duas últimas décadas, no entanto, a complexidade dessa doença heterogênea não permite estabelecer uma explicação clara. Ao identificar os fatores de risco que contribuem para o aparecimento do câncer de mama pode-se listar: o gênero (100 a 200 vezes mais comum em mulheres); etnia (mais comum em europeus); história familiar

(aproximadamente um terço das mulheres com câncer de mama tem um ou mais parentes de primeiro grau com histórico da doença); fatores endócrino e reprodutivo (idade precoce para menarca, nuliparidade, primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal); alta densidade do tecido mamário; obesidade; urbanização; elevação do *status* socioeconômico e idade (as taxas aumentam rapidamente até os 50 anos, e posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta) (BABA & CÂTOI, 2007; BRASIL, 2015). Em revisão sistemática de Lodi e colaboradores (2017) foi evidenciado que o envelhecimento está notavelmente associado a um risco elevado de câncer de mama e de mortalidade conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Incidência e mortalidade do câncer de mama estratificada por idade para o ano de 2012 nos países desenvolvidos

Idade (anos)	Incidência [n (%)]	Mortalidade [n (%)]
Abaixo de 40	45,91 (6,1)	3992 (2,4)
40-49	114,23 (15,3)	13.925 (8,2)
50-59	173,55 (23,2)	28.256 (16,7)
60-69	188,43 (25,2)	36.366 (21,5)
Acima de 69	225,08 (30,1)	86,592 (51,2)
Total	747,20 (100)	169.131 (100)

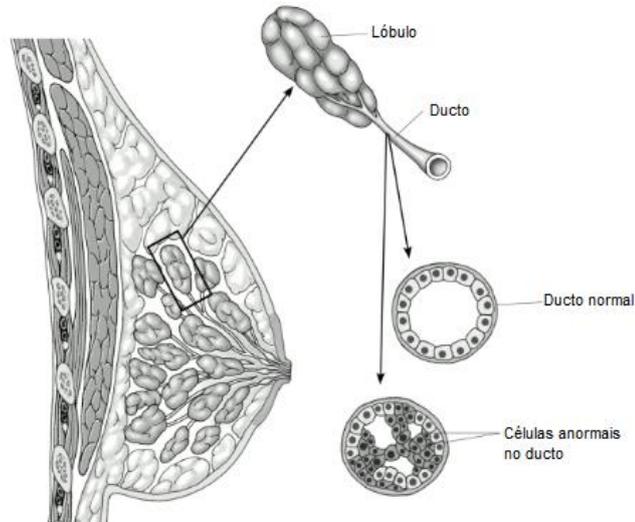
Incidência em números absolutos (n) e em porcentagem, entre parênteses.

Adaptado de LODI *et al.*, 2017

2.2.1 Carcinogênese Mamária

Os tumores de mama podem começar em diferentes partes do seio. A maioria deles inicia-se nos ductos que transportam o leite até o mamilo e por isso são denominados câncer ductal (FIGURA 3). Aqueles que começam nas glândulas que produzem o leite materno são conhecidos por câncer lobular. Há também outros tipos de câncer menos comuns, como o câncer de mama inflamatório, doença de Paget do mamilo, tumor de filóide e angiosarcoma (ACS, 2017).

Figura 3 – Anatomia da mama feminina



Adaptado de ACS, 2017

O processo de carcinogênese mamária pode ser descrito como um modelo em múltiplas etapas em que se acredita que cada uma delas esteja correlacionada com uma ou mais mutações distintas em genes reguladores. Nesse processo de múltiplas etapas, uma célula epitelial normal se desenvolve em uma célula pré-maligna atípica e após expansão clonal torna-se uma lesão pré-maligna. A etapa seguinte consiste no desenvolvimento do carcinoma *in situ*, ductal ou lobular (KENEMANS, VERSTRAETEN & VERHEIJEN, 2004).

O carcinoma ductal *in situ* também é chamado de câncer de mama no estágio 0 e caracteriza-se por ser não-invasivo ou pré-invasivo. É definido como uma proliferação de células com características citológicas de malignidade, mas sem invasão através das paredes dos ductos para o tecido adjacente. A maioria dos tumores de mama tem início como carcinoma *in situ*, sendo que, cerca de um em cada cinco novos casos de cânceres de mama serão desse tipo e quase todas as mulheres com esta fase inicial de câncer de mama podem ser curadas (ABREU & KOIFMAN, 2002; ACS, 2017). Se não tratado, pode ultrapassar a parede do ducto e crescer nos tecidos mamários adjacentes, transformando-se em carcinoma ductal invasivo o qual é o tipo mais comum de câncer de mama (respondendo por cerca de 90% dos casos). Neste ponto pode ser capaz de se espalhar (metastatizar) para outras partes do corpo através do sistema linfático e circulação sanguínea (GANNON, COTTER & QUINN, 2013).

O carcinoma lobular também pode ser classificado em *in situ* ou invasivo. Nessa modalidade as células cancerosas crescem nas glândulas produtoras de leite. O carcinoma *in situ* pode ser chamado, também, de neoplasia lobular. Esse tipo de neoplasia não é considerado câncer, mas é precursor do câncer de mama invasivo, se não tratado. A partir do momento que as células cancerosas começam a crescer para fora do lóbulo mamário, o carcinoma passa a ser denominado invasivo, podendo metastatizar para outras partes do corpo. Cerca de 5% a 10% dos casos de câncer de mama invasivo é do tipo carcinoma lobular invasivo o qual é mais difícil de detectar no exame físico, bem como na imagem (mamografias) (ABREU & KOIFMAN, 2002; ACS, 2017).

2.2.2 Os subtipos de câncer de mama

Tumores de mama são tecidos complexos por possuírem uma variedade de tipos celulares e apresentam uma diversificada resposta frente aos tratamentos. A variação nos programas de transcrição explica grande parte da diversidade biológica de células e tumores humanos. Em cada célula, a transdução de sinais e os sistemas reguladores transportam informações da identidade da célula para o seu microambiente, controlando assim o nível de expressão de cada gene. O perfil de expressão de genes pode ser usado para classificar os cânceres de mama em subtipos moleculares distintos com significância prognóstica (PEROU *et al.*, 2000; VODUC *et al.*, 2010; VUONG *et al.*, 2014).

A classificação molecular do câncer de mama pode ser realizada no material histopatológico por análise genética e, mais comumente, por imuno-histoquímica (IHQ) (GAO & SWAIN, 2018). Apesar de o perfil de expressão gênica ser considerado o teste padrão-ouro para subtipagem molecular do câncer de mama, a técnica tecidual *in situ* IHQ é muito válida e amplamente utilizada na determinação do perfil de expressão proteica (CIRQUEIRA, *et al.*, 2011).

Atualmente é descrito na literatura cinco subtipos moleculares que são: (1) luminal A; (2) luminal B; (3) superexpressão de HER2; (4) basaloide; e (5) triplo negativo conforme detalhado na Tabela 2. Contudo, na prática clínica, utiliza-se

principalmente o *status* dos receptores hormonais de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e a avaliação do *status* do HER-2 para classificar o câncer de mama dentro dos seguintes subgrupos: receptor hormonal positivo, HER2-positivo e aqueles que são negativos tanto para HR quanto para HER2, os quais são denominados câncer de mama triplo negativo (TNBC) (PEROU *et al.*, 2000; SARAIVA *et al.*, 2017; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003; TARTARI *et al.*, 2017).

Tabela 2 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular do câncer de mama por IHQ dos tumores de mama

Subtipo molecular	Classificação com o índice de Ki-67 de 14%
	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e baixo Ki-67
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e alto Ki-67
Superexpressão de HER2	RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Basaloide	RE-, RP-, HER2+ e alto Ki-67
Triplo negativo	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+ e alto Ki-67
	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

+: positivo; -: negativo; HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CK5: citoqueratina 5; Ki-67: índice de proliferação.

Tumores positivos para HR compreendem entre 75% a 80% de todos os pacientes com câncer de mama. Nesse perfil predominam os tumores positivos para ER os quais, em sua maioria, aparecem em pacientes acima de 50 anos (BRUFISKY, 2017). Tumores ER+ ou PR+ são considerados endócrino-sensíveis e, portanto, são responsivos ao tratamento hormonal (LUCANUS & YIP, 2018).

O câncer de mama também é classificado de acordo com a expressão do HER2. Aproximadamente 20% de todos os cânceres de mama superexpressam a proteína HER2 na superfície celular. Clinicamente, o câncer HER2 positivo incorpora um fenótipo mais agressivo e os pacientes apresentam um pior prognóstico quanto à recorrência e sobrevivência em comparação com câncer de mama HER2 negativo (PARAKH *et al.*, 2017; ZHU & JOY, 2017).

Há ainda o tumor de mama triplo negativo que é baseado na redução ou falta de expressão de ER, PR e HER2 e que representa 10% a 15% dos casos de câncer de mama recém-diagnosticados (DAWOOD, 2010). O TNBC é uma doença heterogênea com subtipos moleculares distintos que respondem de maneira diferente à quimioterapia e aos agentes direcionadores (STRAS *et al.*, 2016). A maioria dos TNBC possui instabilidade genômica sendo que a mutação ou perda de TP53 é uma alteração frequente. Mutações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 também são muito presentes, totalizando 11% (KHOSRAVI-SHAHI, CABEZÓN-GUTIÉRREZ & CUSTODIO-CABELLO, 2017; LIN *et al.*, 2017).

Em estágios iniciais, o TNBC está associado a maior probabilidade de recidiva e acompanhado de redução da sobrevida geral quando comparado a outros tipos de câncer de mama. Observa-se um aumento no número de mortes relacionadas ao TNBC nos primeiros cinco anos após o diagnóstico. A detecção precoce por mamografia é difícil, visto que sua ocorrência é predominante em mulheres jovens e, também, pelo tumor apresentar crescimento rápido. TNBC metastático está associado a um curso clínico mais agressivo em comparação com outros tipos de câncer de mama e por isso, o objetivo do tratamento é apenas melhorar a qualidade de vida da paciente. Apesar de sua alta sensibilidade à quimioterapia, o TNBC avançado tem resultados ruins com regimes convencionais de quimioterapia. Os principais sítios de metástase consistem em vísceras (pulmão e cérebro) e não nos ossos, como ocorre para outros tumores de mama (ANDERS & CAREY, 2008). O TNBC metastático representa um desafio contínuo porque, quando comparado a outros subtipos de câncer de mama, ele está associado com o aumento da frequência de progressão, menor sobrevida livre de progressão e sobrevida geral menor. A média da sobrevida é cerca de 9-12 meses com agentes citotóxicos convencionais (KHOSRAVI-SHAHI, CABEZÓN-GUTIÉRREZ & CUSTODIO-CABELLO, 2017; LOCATELLI, CURIGLIANO & ENIU, 2017; STRAS *et al.*, 2016).

2.3 Tratamentos utilizados no câncer de mama

O câncer de mama é considerado uma doença de relativo bom prognóstico desde que diagnosticado e tratado em estágios iniciais (ABREU & KOIFMAN, 2002). O tratamento para o câncer de mama é complexo, pois depende da extensão da

doença, sítios metastáticos, características biológicas do tumor, duração da resposta esperada, comorbidade ou sintoma geral relacionado ao tumor, preferências do paciente e qualidade de vida (ACOG, 2017; BRUFISKY, 2017).

As opções terapêuticas do câncer de mama incluem tratamentos locais ou sistêmicos. Os tratamentos locais são conhecidos por tratar o tumor sem afetar outras partes do corpo e compreendem a cirurgia para retirada do tumor primário, avaliação do acometimento axilar e a radioterapia. A terapia medicamentosa sistêmica (quimioterapia e hormonioterapia) representa a alternativa para o tratamento da doença não localizada. O tratamento sistêmico pode ser pré-cirurgia (neoadjuvante) ou pós-cirurgia e radioterapia (adjuvante) (ACS, 2017; BRASIL, 2015;). Todas essas intervenções têm como objetivo a cura ou a melhora da qualidade de vida do paciente, e conseqüentemente, a redução da mortalidade (CARDOSO *et al.*, 2014).

A cirurgia é o principal tratamento do câncer de mama, incluindo a intervenção cirúrgica na mama e axila. A cirurgia pode ser não conservadora (mastectomia) ou parcial/conservadora, dependendo do estadiamento clínico e do tipo histológico. A mastectomia é um tratamento curativo em 98% dos casos de carcinoma ductal *in situ*, mas certamente representa um procedimento excessivamente mutilante (BRASIL, 2015).

A radioterapia compreende na emissão de raios-x ou gama de alta frequência para matar as células cancerosas. Frequentemente ela é combinada com a cirurgia a fim de aumentar a eficiência do tratamento, que pode durar entre três e cinco semanas, sendo muito importante para evitar recidiva após a cirurgia (Cancer Research UK, 2017). Entretanto, em aproximadamente dois terços dos pacientes, a neoplasia se caracteriza por micrometástases e torna-se necessário uma terapia sistêmica que pode ser efetuada com o tratamento quimioterápico (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Na prática clínica o tratamento sistêmico pode ser dividido em três grupos terapêuticos: (1) o grupo positivo para ER, o qual apresenta um melhor prognóstico, pois inclui moduladores seletivos de receptores de estrogênio (tamoxifeno), inibidores da aromatase e um degradador seletivo de receptor de estrogênio

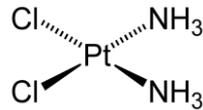
(fulvestrant) (BRUFISKY, 2017); (2) o grupo HER2, cujas terapias apresentam bons resultados devido à possibilidade de agentes terapêuticos direcionados a esse receptor, como o anticorpo monoclonal trastuzumab (PARAKH *et al.*, 2017; TARTARI *et al.*, 2017); e (3) TNBC, o de pior prognóstico, pois, com a ausência de ER, PR e HER2 resta como alternativa terapêutica a quimioterapia convencional (KHOSRAVI-SHAHI, CABEZÓN-GUTIÉRREZ & CUSTODIO-CABELLO, 2017).

Na terapia antitumoral, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de maneira não seletiva, lesando células tumorais e também as células normais, particularmente, as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, as capilares e as do sistema imunológico, causando assim, uma série de efeitos adversos deletérios para o organismo (NUSSBAUMER *et al.*, 2011). Nesse contexto, um dos grandes desafios enfrentados na terapia do câncer é o desenvolvimento de agentes antineoplásicos que apresentem baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral.

2.4 Cisplatina

A [*cis*-diamino-dicloro-platina(II)], mais conhecida como cisplatina (CDDP) (FIGURA 4) representa um marco importante na história de fármacos antitumorais desde a sua introdução em ensaios clínicos em 1971 (YU *et al.*, 2017). A CDDP é um dos agentes quimioterápicos mais potentes e comumente empregados no tratamento de tumores sólidos devido a sua eficácia frente às células tumorais humanas (ARMSTRONG *et al.*, 2006; MARZO *et al.*, 2015; ROSENBERG *et al.*, 1969). O uso clínico de CDDP assegurou que muitos pacientes com diferentes tipos de câncer fossem tratados com sucesso. Ela compõe a primeira linha de tratamento para o câncer de ovário, testículo, cervical, endometrial, pulmão, cabeça e pescoço, bexiga e gastroesofágico; e a segunda ou terceira linha de tratamento para câncer de próstata e pancreático, metástase de mama e para melanomas e gliomas (ISHIDA *et al.*, 2010; KWOK *et al.*, 2010; PARK, MORLEY & SCHERER, 2013; YUAN *et al.*, 2011).

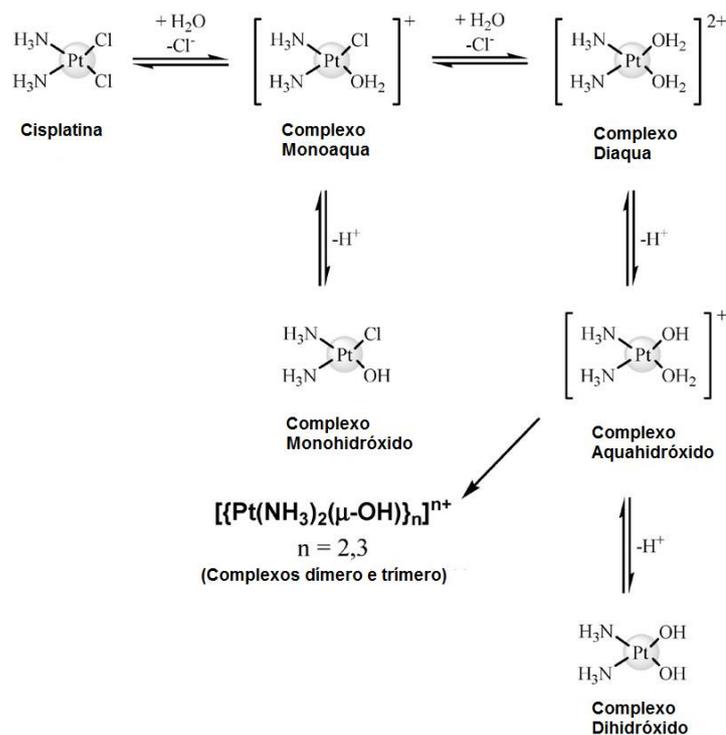
Figura 4 – Estrutura química da cisplatina



Adaptado de JOHNSTONE, PARK & LIPPARD, 2014

O mecanismo de ação da CDDP está relacionado com a inibição seletiva da síntese do DNA. Uma vez transportada para dentro da célula, um ou ambos os grupos *cis*-cloro são deslocados pela água, produzindo uma molécula carregada positivamente e altamente reativa como pode ser visualizada na Figura 5 (WANG & LIPPARD, 2005).

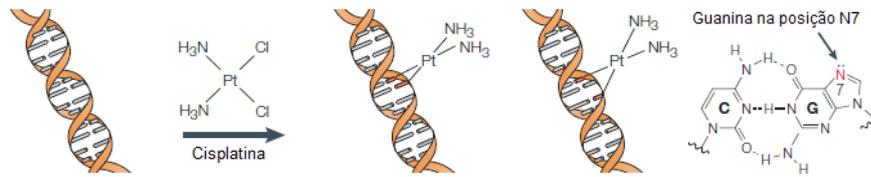
Figura 5 – Hidrólise da cisplatina



Adaptado de ESTEBAN-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010

Os análogos de platina carregados positivamente interagem com moléculas nucleofílicas tais como DNA, RNA e proteínas (FIGURA 6). Sabe-se que a interação com o DNA é a preferencial, especialmente o N7 da guanina. Isso desencadeia a formação de complexos proteína-DNA e ligações cruzadas intrafita e, com menor frequência, interfitas (WANG & LIPPARD, 2005).

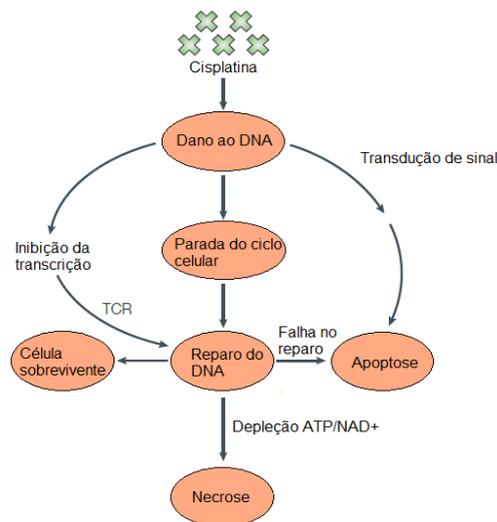
Figura 6 – Formação dos adutos de cisplatina



Adaptado de WANG & LIPPARD, 2005

A mudança na conformação do DNA inibe sua síntese, replicação e transcrição, o que pode levar a erros de codificação e ruptura nas fitas. O reconhecimento desse dano pelas vias de reparação paralisa o ciclo celular em G₁ ou G₂, o que leva a ativação de vias apoptóticas e posteriormente a morte da célula tumoral por apoptose. Sabe-se que a CDDP é capaz de induzir outro modo diferente de morte celular, a necrose, conforme verificado na Figura 7. Embora amplamente utilizada na terapia adjuvante, a CDDP apresenta efeitos adversos moderados a graves que limitam a dose a ser administrada. Além disso, também é relatado na literatura o aparecimento de resistência clínica (GALLUZZI *et al.*, 2012; NEJDL *et al.*, 2017; SIKOV, 2015).

Figura 7 – Vias de morte celular induzidas pela cisplatina



CDDP induz necrose e apoptose – dois modos diferentes de morte celular. O dano ao DNA interrompe o ciclo celular, inibe a transcrição e inicia a apoptose. O excesso de dano ao DNA induz a hiperativação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). PARP cliva NAD⁺ e transfere as porções de ADP-ribose (ADPR) para grupos carboxílicos de proteínas nucleares. Isso provoca a depleção de NAD⁺/ATP, resultando em morte por necrose, se a depleção de ATP atingir os níveis de indução letal. TCR, reparação acoplada à transcrição.

Adaptado de WANG & LIPPARD, 2005

A principal limitação do uso clínico da CDDP, como um medicamento quimioterápico, é a alta incidência de resistência, o que explica sua falha terapêutica. Há duas formas de resistência: (1) resistência adquirida, em que o fármaco inicialmente é eficiente, mas torna-se ineficaz ao longo do tratamento; e (2) resistência intrínseca, que ocorre quando o fármaco é ineficaz desde o início do tratamento. A quimiorresistência aumenta as chances de recidiva e metástase da doença. Os mecanismos celulares de resistência à CDDP são multifatoriais e resultam em limitações severas no uso clínico. Em células resistentes, as moléculas responsáveis tanto pelo mecanismo de resistência aos medicamentos quanto pela resposta celular ao estresse genotóxico são superexpressadas. Tais mecanismos incluem: diminuição da captação intracelular e/ou aumento do efluxo dos compostos de platina via bombas transportadoras de metais pesados; inativação do fármaco por níveis aumentados de tióis; conjugação com glutatona ou metalotioneína; oncogenes; alteração mitocondrial; reparo aumentado no DNA; tolerância aumentada aos danos causados ao mesmo e evasão da apoptose (FLOREA & BÜSSELBERG, 2011; GALLUZZI *et al.*, 2012; ZHENG, 2017).

2.4.1 Efeitos tóxicos relacionados à administração de CDDP

Infelizmente, nem a citotoxicidade e nem a apoptose são induzidas exclusivamente em células tumorais. A CDDP liga-se às proteínas em poucos minutos após a sua administração, acumulando-se nos rins, fígado e outros órgãos, diminuindo a excreção renal e contribuindo para o seu perfil de toxicidade sistêmica, que, na maioria das vezes, é dose-dependente (SIKOV, 2015). Os efeitos adversos da terapia com CDDP abrangem efeitos gerais tais como náuseas e vômitos, mielossupressão (trombocitopenia, leucopenia, neutropenia e anemia) e imunossupressão (diminuição da resposta à infecção). Os eventos adversos mais específicos incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade (perda auditiva e zumbido). Aproximadamente 75% dos pacientes que recebem CDDP desenvolvem algum nível de ototoxicidade, que é cumulativo e pode ser irreversível (COHEN *et al.*, 2011; FLOREA & BÜSSELBERG, 2011). Há relatos também de neuropatia periférica (os sintomas incluem formigamento nos dedos das mãos e dos pés), hipomagnesemia e anafilaxia (EGGER *et al.*, 2017; IMAI *et al.*, 2017).

O efeito tóxico mais relevante da CDDP é a nefrotoxicidade. Quase 20% dos pacientes que recebem altas doses de CDDP desenvolvem lesão renal aguda (LRA). Um terço dos casos de LRA ocorre dentro de alguns dias após a administração, mesmo quando as medidas preventivas adequadas são realizadas, como hidratação adequada, ajustes de dose (Gi-Su et al., 2014; Ozkok & Edelstein, 2014). Estudo realizado por Assayag e colaboradores (2017) mostrou que a lesão histológica mais frequente causada pela toxicidade da CDDP é a necrose tubular aguda, no entanto, a redução ou descontinuação total desse medicamento geralmente permite a recuperação renal em algumas semanas (KARASAWA & STEYGER, 2015).

Com a finalidade de reduzir a toxicidade da CDDP, já são utilizados na clínica protocolos referentes à poliquimioterapia, em que se tem a associação de determinados medicamentos, por exemplo, os taxanos, com o objetivo de melhorar a tolerância ao tratamento, promover a adequada adesão e alcançar respostas de tratamento mais efetivas e eficazes (HUANG *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2017).

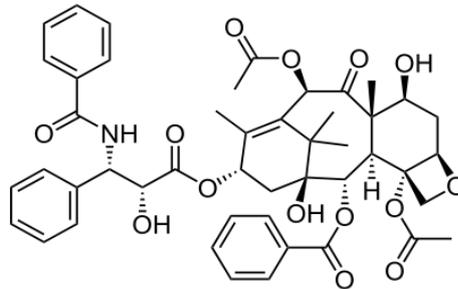
2.5 Paclitaxel

O paclitaxel (PTX) é um agente antitumoral que pertence à classe dos taxanos. Foi descoberto na década de 1960 durante uma iniciativa do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos para identificar novas substâncias com atividade citotóxica. Ele foi inicialmente isolado da casca do teixo do pacífico, o *Taxus brevifolia*. Atualmente ele é produzido por uma rota semissintética mediante acilação de um componente presente nas folhas de outra espécie do gênero (*Taxus baccata*) (BERNABEU, 2017).

Tornou-se um importante alvo de interesse entre pesquisadores devido a sua complexa estrutura molecular (FIGURA 8). É um diterpeno tricíclico que contém um complexo anel “taxano” e uma função amida, assim, ocasionalmente, é considerado como um pseudoalcaloide (BERNABEU *et al.*, 2017). É um fármaco de alto peso

molecular (853,9 g/mol) e com solubilidade muito baixa em água. É metabolizado principalmente pelo citocromo P450 (STAGE, BERGMANN & KROETZ, 2017).

Figura 8 – Estrutura química do paclitaxel



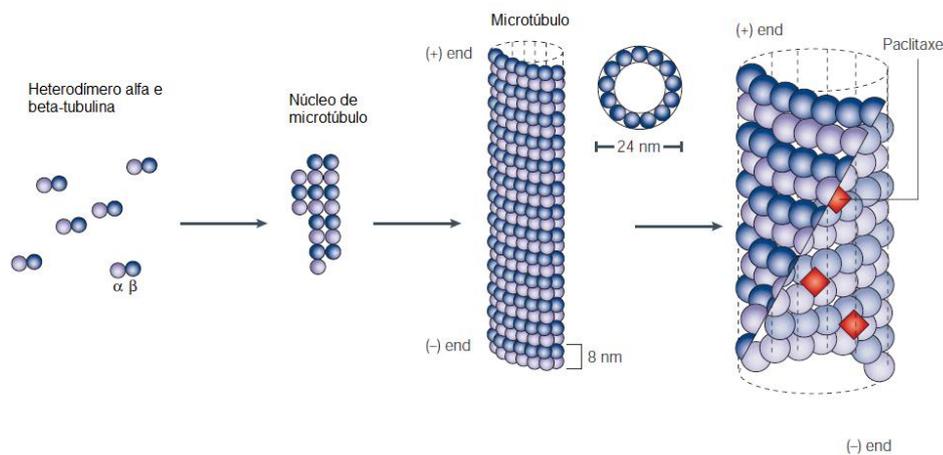
Adaptado de BERNABEU *et al.*, 2017

PTX é um dos agentes antineoplásicos mais comuns e tem um perfil bem estabelecido de eficácia e segurança no tratamento de tumor avançado e refratário (SONG *et al.*, 2017). Seu sucesso é atribuído ao amplo espectro de atividade antitumoral, eficácia em tumores sólidos e disseminados e um único mecanismo de ação. O PTX é amplamente usado na terapia do câncer de mama (metastático ou não metastático), ovário e pulmão, sendo utilizado também, como segunda linha para tratamento de sarcoma de Kaposi. Como o PTX exibe uma potente atividade antineoplásica, é frequente seu uso *off-label* para tratar câncer esofágico, gástrico, cervical, de bexiga, de próstata, cabeça e pescoço (BERNABEU *et al.*, 2017).

Os taxanos são fármacos estabilizadores de microtúbulos que levam à interrupção da dinâmica destes, enrijecendo-os. Os microtúbulos são extremamente importantes no processo de mitose, durante o qual os cromossomos duplicados são separados em dois conjuntos idênticos antes da clivagem da célula em duas células filhas. Sua importância na mitose e na divisão celular torna-os um alvo farmacológico interessante para a terapia do câncer (JORDAN & WILSON, 2004). O PTX atua como agente quimioterápico ao ligar-se seletivamente à subunidade beta (β) da tubulina nos microtúbulos, promovendo sua polimerização e montagem, e assim, estabilizando a formação dos microtúbulos (FIGURA 9). Este efeito desencadeia a formação do fuso mitótico disfuncional, o que leva a segregação cromossômica em fusos multipolares com consequente parada mitótica na fase G₂/M e, eventualmente,

resulta em morte celular por apoptose. Sabe-se, também, que o PTX restringe a angiogênese tumoral e induz a expressão de genes e citocinas que levam à inibição do crescimento celular, resultando em apoptose. A combinação de propriedades antiproliferativas e citotóxicas contribui para a eficácia antitumoral do PTX (BERNABEU *et al.*, 2017; MUKHTAR, ADHAMI & HUKHTAR, 2014; STAGE, BERGMANN & KROETZ, 2017; ZHANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Figura 9 – Representação da polimerização dos microtúbulos e da ligação do paclitaxel



Heterodímeros α - e β -tubulina se montam para formar um pequeno núcleo de microtúbulos. Este processo é seguido pelo alongamento do microtúbulo em ambas as extremidades para formar um cilindro. Na presença de PTX, o fármaco se liga ao longo da porção interior do microtúbulo, suprimindo sua dinâmica.

Adaptado de JORDAN & WILSON, 2004

2.5.1 Efeitos tóxicos relacionados à administração do PTX

Apesar da promissora atividade anticancerígena, o desenvolvimento da formulação intravenosa de PTX mostrou vários desafios, em especial, a sua baixa solubilidade em água (0,3 – 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Devido a sua natureza hidrofóbica, foi originalmente dissolvido num veículo composto pelo óleo de castor polioxietilado (Cremophor EL[®]) e etanol desidratado na proporção de 1:1 v/v, sendo comercializado com o nome Taxol[®]. Essa formulação solucionou o problema de solubilidade, mas, por outro lado, esse veículo está associado com uma variedade de efeitos adversos como: reações graves de hipersensibilidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Geralmente, a razão para descontinuar o tratamento com o PTX não é a falta de eficácia, e sim, a toxicidade causada pelo Cremophor EL[®] (TIJE *et al.*, 2003). A neuropatia periférica é

o efeito neurotóxico mais comumente relatado do PTX, afetando entre 57 a 83% dos pacientes. Os sintomas são dormência, parestesia e dor de queimadura, iniciando 24-72 horas após a administração e persistindo por longos períodos mesmo após a descontinuação do tratamento. Dentre as reações adversas inerentes ao fármaco pode-se listar fadiga, mialgia, artralgia, náuseas, neuropatia periférica sensorial simétrica e neutropenia (SIBAUD *et al.*, 2016). O efeito tóxico hematológico mais comum dependente da dose e do esquema posológico observado durante o tratamento é a mielodepressão, principalmente a neutropenia. De acordo com base de dados de 812 pacientes, 52% desses apresentaram neutropenia severa (< 500 células/cm³), fato que demonstra a variabilidade do tratamento entre os pacientes (BERNABEU *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2017; STAGE, BERGMANN & KROETZ, 2017).

Devido à complexidade molecular de várias doenças, a combinação de terapias está se tornando cada vez mais importante para melhorar o prognóstico em longo prazo e diminuir efeitos adversos. Ao contrário da monoterapia, a terapia com multiagentes pode modular diferentes vias de sinalização em células cancerosas, maximizando o efeito terapêutico e, possivelmente, superando mecanismos de resistência (GRECO & VICENT, 2009).

2.6 Combinação de fármacos no tratamento do câncer

A combinação de fármacos quimioterápicos é um método promissor para melhorar a eficácia do tratamento anticâncer, pois visa atingir alvos diferentes nas células tumorais o que pode potencializar o efeito terapêutico, reduzir a dose e, conseqüentemente, a toxicidade e minimizar ou retardar os casos de resistência aos medicamentos. Esses efeitos são obtidos principalmente quando fármacos com diferentes mecanismos de ação são combinados. Em curto prazo, a terapia combinada é mais cara do que a monoterapia, no entanto combinações adequadas de medicamentos podem produzir benefícios significativos que em longo prazo justificam sua prática (GRECO & VICENT, 2009).

O uso de múltiplos medicamentos pode atingir vários alvos, múltiplas subpopulações ou múltiplas doenças simultaneamente. Além disso, diferentes medicamentos com

distintos mecanismos ou modos de ação também podem direcionar o efeito contra um alvo único ou uma doença e tratá-los de forma mais eficaz (CHOU, 2006).

Em revisão sistemática publicada em 2005, em que se comparou a monoterapia com a terapia combinada, a combinação de agentes quimioterápicos foi associada a um aumento da taxa de resposta, aumento do tempo para progressão de doença e um pequeno benefício de sobrevida global, no entanto, com um aumento expressivo da toxicidade. O tratamento combinado deve ser utilizado em pacientes com doença rapidamente progressiva que necessitem de resposta objetiva rápida, a despeito da maior toxicidade proporcionada por esse tratamento (BRASIL, 2015).

A quimioterapia combinada também pode ser usada como tratamento paliativo, ou seja, para reduzir os sintomas e prolongar a expectativa de vida, ou como tratamento adjuvante pré-cirurgia para reduzir a massa tumoral antes do procedimento cirúrgico ou para remover metástases não ressecáveis, ou pós-cirurgia, a fim de tratar micrometástases indetectáveis (GRECO & VICENT, 2009).

Embora o desenvolvimento da combinação de fármacos direcionados para múltiplos alvos terapêuticos tenha potencial para melhorar drasticamente a resposta ao tratamento e as taxas de sobrevivência entre pacientes com doenças difíceis de tratar, isso introduz incertezas adicionais. O sucesso clínico da terapia combinada é limitado pela distinta farmacocinética e biodistribuição de fármacos combinados, o que leva à distribuição não uniforme após administração sistêmica (LIU *et al.*, 2014; WOODCOCK *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, há relatos na literatura de problemas com a biodisponibilidade dos fármacos, os quais são frequentemente removidos da circulação sanguínea por macrófagos ou outros componentes moleculares responsáveis pela depuração sanguínea. Uma vez administrados juntos na corrente sanguínea, os fármacos serão distribuídos e eliminados independentemente uns dos outros (MA *et al.*, 2014).

2.6.1 Combinação de cisplatina e paclitaxel no tratamento do câncer

Nos últimos anos a CDDP e o PTX foram os dois fármacos mais populares utilizados contra vários tumores (CAI *et al.*, 2015). Uma vez que o PTX demonstrou excelente

atividade antineoplásica em câncer de ovário e, ao mesmo tempo, os análogos de platina estão entre as classes de agentes mais ativas para o tratamento desse e de outros vários tipos de tumor, incluindo o câncer de mama, o desenvolvimento de quimioterapia combinada entre PTX e CDDP é bastante aplicável (ROWINSKY *et al.*, 1993). CDDP e PTX são altamente adequados para a quimioterapia combinada porque possuem mecanismos de ação distintos (ZHANG *et al.*, 2017). No entanto, o sinergismo entre esses fármacos é altamente dependente da sequência de administração, sugerindo uma competição entre os mecanismos de ação de ambos os medicamentos (JUDSON *et al.*, 1999).

Ambas as classes são conhecidas por induzir efeitos dependentes do ciclo celular e parada do ciclo celular em fases específicas, sendo assim estudos têm avaliado se a sequência de administração interfere nos resultados clínicos (ROWINSKY *et al.*, 1993). Em outro estudo de Rowinsky e colaboradores (1991) foi investigado a dependência de uma sequência de administração dos dois fármacos e os resultados encontrados evidenciaram que a administração de CDDP antes do PTX induziu neutropenia mais profunda do que quando a ordem foi inversa. Estudos farmacológicos indicaram que essa diferença provavelmente foi decorrente da redução das taxas de depuração de PTX em 25% quando a administração da CDDP precedeu o PTX. Sendo assim, recomenda-se a administração de PTX antes da CDDP. Esses achados corroboram o guia de protocolos e medicamentos para tratamento em oncologia e hematologia do Hospital Albert Einstein (2013).

Comparações entre monoterapia com CDDP e a combinação de PTX e CDDP em pacientes com carcinoma de células escamosas de colo uterino resultaram em maior taxa de resposta (19% *versus* 36%, $p=0,002$) e maior sobrevida livre de progressão (2,8 *versus* 4,8 meses, $p<0,001$) sem diferença significativa de qualidade de vida das pacientes e com sobrevida global semelhante (GARCES *et al.*, 2013).

Em outro estudo comparando a combinação de CDDP mais ciclofosfamida *versus* CDDP e PTX, a taxa de resposta para a segunda combinação foi 77% com média de sobrevida de 13,1 meses a mais do que com a primeira combinação (JUDSON *et al.*, 1999).

A combinação de PTX e CDDP é um protocolo bem estabelecido para o câncer de ovário e carcinoma cervical enquanto que para o câncer de mama, um regime de tratamento à base de platina mais PTX é indicado quando há a presença de mutação no gene BRCA (SIKOV 2015).

Embora esses agentes possam ser eficazes na terapia adjuvante, seus perfis de toxicidade moderada criam uma necessidade crítica de melhorar a segurança e tolerabilidade dos regimes combinados, além de melhorar sua eficácia. Uma estratégia de combinação mais eficaz com a capacidade de coordenar a farmacocinética e a biodistribuição de várias moléculas de fármacos é altamente desejável para maximizar os efeitos combinatórios. Dessa forma, a encapsulação de agentes quimioterápicos em nanopartículas pode fornecer um método inovador para permitir a administração dos fármacos, promovendo uma melhor entrega do medicamento com menor toxicidade sistêmica e manutenção dos níveis terapêuticos adequados (COHEN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014).

Nesse sentido, uma variedade de novas formulações lipídicas está sendo explorada para CDDP, oxaplatina e outros agentes derivados da platina (HIRAI *et al.*, 2010; STATHOPOULOS, 2010; ZISMAN *et al.*, 2011). Atualmente não existe nenhum lipossoma de platina aprovado pelo FDA, no entanto, quatro formulações estão na fase de ensaios clínicos: Lipoplatin (cisplatina), Lipoxal (oxaplatina) ambos desenvolvidos pela Regulon, LiPlaCis (cisplatina) e MBP-426 (oxaplatina) (HANG, COOPER & ZIORA, 2016; KIELER-FERGUSON *et al.*, 2017; NIH, 2018).

Passadas três décadas do início do desenvolvimento de lipossomas de PTX, surgiram algumas formulações com a finalidade de reduzir os efeitos adversos provocados pelo Taxol[®]. Em geral, tanto os modelos tumorais *in vivo* em camundongos quanto os ensaios clínicos em humanos demonstraram que as formulações lipossomais de PTX aumentam significativamente a dose máxima tolerada (DMT) de PTX que supera a do Taxol[®]. As formulações lipossomais de PTX estão em vários estágios de ensaios clínicos, por exemplo, LEP-ETU (NeoPharm) e EndoTAG[®]-1 (Medigene) que já atingiram a fase II dos estudos. Atualmente a quimioterapia com PTX está associada com reações de hipersensibilidade, mesmo quando o paciente é pré-medicado com corticoides e anti-histamínicos. Dessa

maneira, o desenvolvimento de um sistema capaz de carrear o PTX é de extrema importância. As abordagens atuais para a melhoria são focadas principalmente em três estratégias: (1) desenvolvimento de formulações desprovidas de Cremophor EL®; (2) investigação da possibilidade de uma produção em larga escala e (3) uma solicitação para uma estabilidade em longo prazo. Essas diferentes abordagens mostraram algumas possibilidades promissoras ao substituir o Taxol® por uma preparação menos irritável, como: (a) formulações micelares, (b) preparações de pró-fármaco solúveis em água, (c) preparações de pró-fármaco ativadoras de enzimas conjugadas com anticorpos ou albumina, (d) emulsões parenterais, (e) microesferas (f) ciclodextrinas e (g) nanocristais. No mercado farmacêutico atual apenas o Abraxane® (nanopartícula de albumina ligada ao PTX) (ZONG, WU & SHEN, 2017) e o Lipusu® (Luye Pharma Group) (PTX lipossomal aprovado pela agência reguladora da China) entraram no campo das aplicações clínicas. Geralmente os lipossomas e as nanopartículas de proteína representam uma abordagem promissora para a otimização do direcionamento de PTX. Sua comercialização está à porta do moderno mercado da entrega direcionada de fármacos (KOUDELKA & TURÁNEK, 2012).

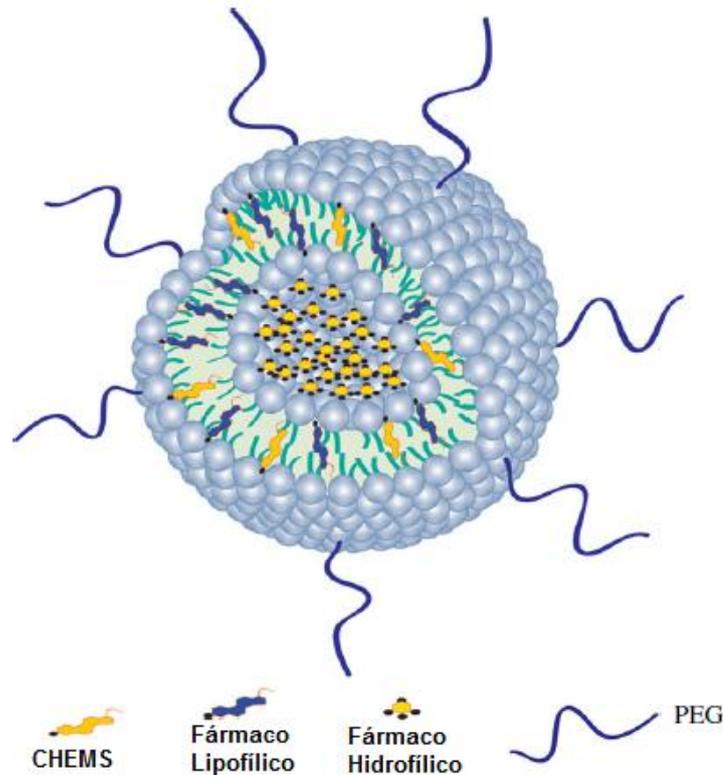
2.7 Lipossomas

Lipossomas são estruturas lipídicas anfifílicas, mais frequentemente fosfolípidos, que em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas, formando vesículas esféricas que circundam uma cavidade aquosa interna e um meio aquoso externo onde elas se encontram em suspensão (FIGURA 10). Estes sistemas foram descritos pela primeira vez por Bangham e colaboradores (1965), que estabeleceram a base para sistemas semelhantes às membranas celulares. No entanto, foi Gregory Gregoriadis que estabeleceu o conceito de que os lipossomas poderiam encapsular fármacos e serem usados como sistema de *drug delivery* (ALLEN & CULLIS, 2013).

As primeiras formulações foram compostas somente por lípidos naturais, e atualmente a composição também abrange lípidos sintéticos e/ou tensoativos. O tamanho dessas vesículas lipídicas, quase esféricas, pode variar de poucos nanômetros a vários micrômetros. No entanto, os lipossomas de uso clínico tem seu

tamanho variando entre 50 e 450 nm (BOZZUTO & MOLINARI, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2014).

Figura 10 – Representação esquemática de um lipossoma



CHEMS: hemissuccinato de colestera e PEG: polietilenoglicol.

Adaptado de MONTEIRO *et al.*, 2014.

Por terem sua composição baseada nas membranas celulares, os lipossomas são sistemas biocompatíveis, biodegradáveis e estáveis (HE & TANG, 2017). Lipossomas podem ser unilamelar ou multilamelar e incorporar substância de caráter hidrofílico dentro do compartimento aquoso, e, nas bicamadas, podem acomodar substâncias lipofílicas (MEEL *et al.*, 2014). Substâncias anfifílicas também podem ser acomodadas na interface entre a bicamada e a cavidade aquosa. Devido à flexibilidade de encapsular diferentes tipos de substâncias, várias formulações lipossomais estão disponíveis comercialmente (TABELA 3).

Tabela 3 – Formulações lipossomais para o tratamento do câncer aprovadas pela agência regulatória americana (FDA)

Medicamento	Princípio Ativo	Indicações	Empresa	Data de Aprovação
Doxil®	Cloridrato de doxorubicina	Câncer de ovário; Sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS	Jansen Res And Dev	17 de novembro de 1995
DaunoXome®	Citrato de daunorrubicina	Mieloma múltiplo Sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS	Galen	8 de abril de 1996
DepoCyt®	Citarabina	Meningite linfomatosa	Pacira Pharms Inc.	1 de abril de 1999
Marqibo®	Sulfato de vincristina	Leucemia linfoblástica	TALON THERAP	9 de agosto de 2012
Cloridrato de doxorubicina (Liposomal) ®	Cloridrato de doxorubicina	Câncer de ovário; Sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS	Sun Pharma Global	4 de fevereiro de 2013
Onivyde®	Cloridrato de irinotecano	Adenocarcinoma metastático do pâncreas	Merrimack Pharms	22 de outubro de 2015

Os dados foram coletados do site da US Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov>), 31 de julho de 2016.

Adaptado de HE & TANG, 2017

2.7.1 Tamanho e características da superfície de nanopartículas

Para entregar o fármaco no alvo tumoral de forma efetiva, as nanopartículas devem ter a capacidade de permanecer na corrente sanguínea por tempo considerável antes de serem eliminadas. Pensando nisso, o destino das nanopartículas injetadas pode ser controlado ajustando o tamanho e as características da superfície (CHO *et al.*, 2008).

Uma das vantagens das nanopartículas é que seu tamanho é ajustável, devendo ser grande o suficiente para evitar o seu rápido extravasamento dos capilares sanguíneos, mas pequeno o suficiente para escapar da captura por macrófagos fixos que são alojados no sistema fagocitário mononuclear (SFM), como fígado e baço. O tamanho do sinusóide no baço e das fenestrações das células de Kupffer no fígado varia de 150 a 200 nm e o tamanho da junção *gap* entre as células endoteliais da vasculatura tumoral pode variar de 100 a 600 nm. Conseqüentemente, o tamanho das nanopartículas deve ser adequado para atingir os tecidos tumorais passando através destas duas estruturas vasculares particulares (BAE & PARK, 2011; CHO *et al.*, 2008).

As nanopartículas devem, idealmente, ter uma superfície hidrofílica para escapar da captura de macrófagos, e conseqüentemente circular por mais tempo na corrente sanguínea tendo maiores chances de atingir os tecidos tumorais alvo. Isto pode ser conseguido de duas maneiras: o revestimento da superfície de nanopartículas com um polímero hidrofílico, como o polietilenoglicol (PEG) ou, alternativamente, com polímeros anfifílicos como copolímeros sintéticos de óxido de polietileno e óxido de polipropileno, os quais os protege da opsonização repelindo proteínas plasmáticas (CHO *et al.*, 2008; PÉREZ-HERERRO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

2.7.2 Direcionamento Passivo

A razão pela qual a nanotecnologia pode ser efetiva para alcançar células tumorais deve-se a vários fatores, mas o principal fator que leva ao direcionamento da entrega do fármaco no sítio tumoral baseia-se no efeito de permeabilidade e

retenção aumentada (EPR) das nanopartículas proposto pela primeira vez por Maeda (2010).

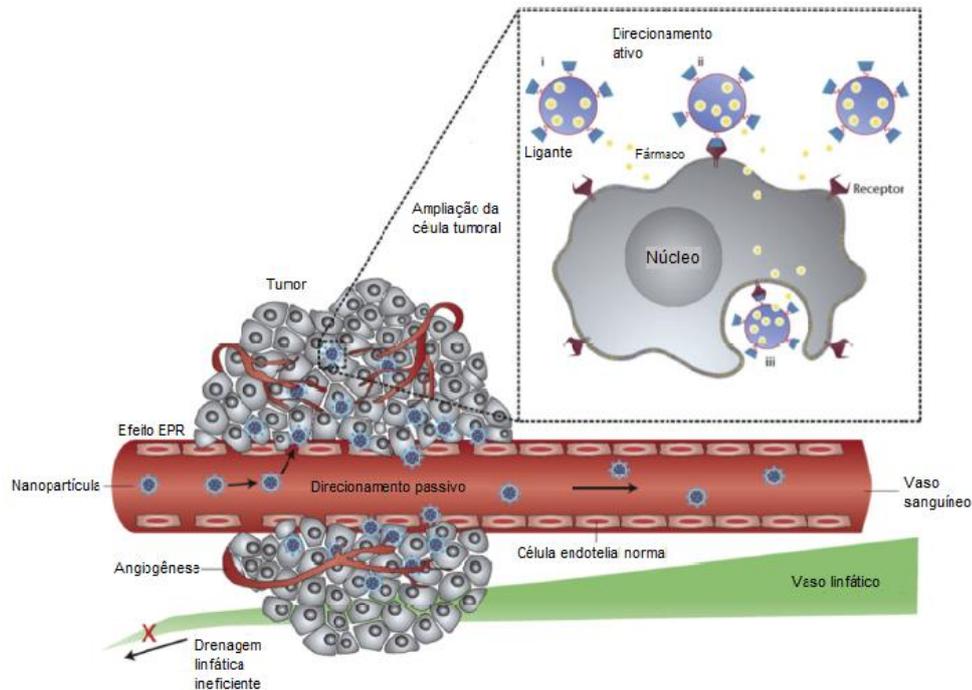
No microambiente tumoral, as células exibem um crescimento acelerado, sendo necessária a formação de novos vasos (neovascularização) ou o redirecionamento dos vasos existentes para perto da massa tumoral a fim de fornecer oxigênio e nutrientes. O desequilíbrio resultante de reguladores angiogênicos, como fatores de crescimento e metaloproteinases, faz com que os vasos recém-formados sejam altamente desorganizados e dilatados com numerosos poros que apresentam comprometimento das junções *gap* entre células endoteliais. Esse fato associado a uma drenagem linfática ineficiente constitui a base do fenômeno chamado de EPR, que corresponde a um mecanismo importante pelo qual as nanopartículas têm uma permeabilidade aumentada ao extravasar para o interstício do tumor uma vez que o leito vascular é anormal e descontínuo (HO, PFEFFER & SINGH, 2017). Portanto, há uma recuperação circulatória limitada das moléculas extravasadas, resultando no acúmulo de macromoléculas e nanopartículas no microambiente tumoral. Vale salientar que o endotélio normal apresenta junções *gap* muito menores cuja medida varia entre 5 a 10 nm, impossibilitando a permeabilidade de nanocarreadores (BOISSENOT *et al.*, 2016; DESHPANDE, BISWAS & TORCHILIN, 2013).

2.7.3 Direcionamento ativo

O direcionamento ativo consiste na conjugação de diferentes ligantes tais como, anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, peptídeos e fatores de crescimento na superfície da nanoestrutura. Por exemplo, certos receptores, como os receptores de folato e transferrina, são superexpressos em muitas células tumorais e foram utilizados para tornar as formulações nanoestruturadas mais específicas à célula tumoral. O direcionamento ativo aumenta a eficácia terapêutica ao melhorar a especificidade e a absorção dos fármacos, uma vez que são endocitados pelas células por interação com receptores específicos da superfície celular, acumulando no microambiente tumoral (BAKRANIA, VARIYA & PATEL, 2016; COLBY *et al.*, 2017; DESHPANDE, BISWAS & TORCHILIN, 2013; FRANCO, ROQUE & OLIVEIRA, 2017).

A Figura 11 mostra a representação tanto do direcionamento passivo (efeito EPR) quanto o direcionamento ativo.

Figura 11 – Representação do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) e direcionamento ativo



Nanocarreadores, uma vez próximos ao tumor pode: (i) liberar seu conteúdo citotóxico próximo das células cancerígenas, (ii) ligar-se à membrana das células tumorais e liberar o conteúdo de forma sustentada e (iii) ser internalizado nas células.

Adaptado de PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015

2.10 A evolução dos lipossomas como carreadores de quimioterápicos

Os primeiros lipossomas desenvolvidos para o transporte de fármacos, chamados convencionais, consistiam de uma bicamada composta por fosfolípides aniônicos, catiônicos ou neutros e colesterol, circundando o núcleo aquoso. Uma grande desvantagem dos lipossomas convencionais é que eles eram rapidamente reconhecidos, opsonizados e eliminados da circulação sanguínea pelo SFM que se concentra principalmente no fígado, baço e medula óssea (SERCOMBE *et al.*, 2015). Com exceção do tratamento de doenças em que há o envolvimento desses órgãos, a rápida captação de lipossomas pelo SFM leva à redução da distribuição do fármaco, bem como implica em toxicidade para os órgãos do SFM (ALLEN & CULLIS, 2013).

2.10.1 Lipossomas peguilados

Uma alternativa para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas na circulação sanguínea foi o revestimento da superfície lipossomal com polímeros inertes biocompatíveis, por exemplo, o PEG. A presença dos derivados de PEG forma uma camada aquosa na superfície dos lipossomas, o que conseqüentemente, previne seu reconhecimento pelas opsoninas, levando à redução do seu reconhecimento pelo SFM (FERREIRA *et al.*, 2013; PETERSEN *et al.*, 2016).

Embora as nanopartículas contendo PEG em sua composição tenham aumentado os tempos de circulação sistêmica, é importante perceber que a fração de nanopartículas que entra nos tumores ainda é muito limitada. Geralmente, apenas cerca de 5% das partículas administradas permanecem na circulação sistêmica após 12 h, sendo que cerca de 80% da dose inicial foi eliminada em menos de algumas horas (BAE & PARK, 2011).

2.10.2 Lipossomas pH-sensíveis

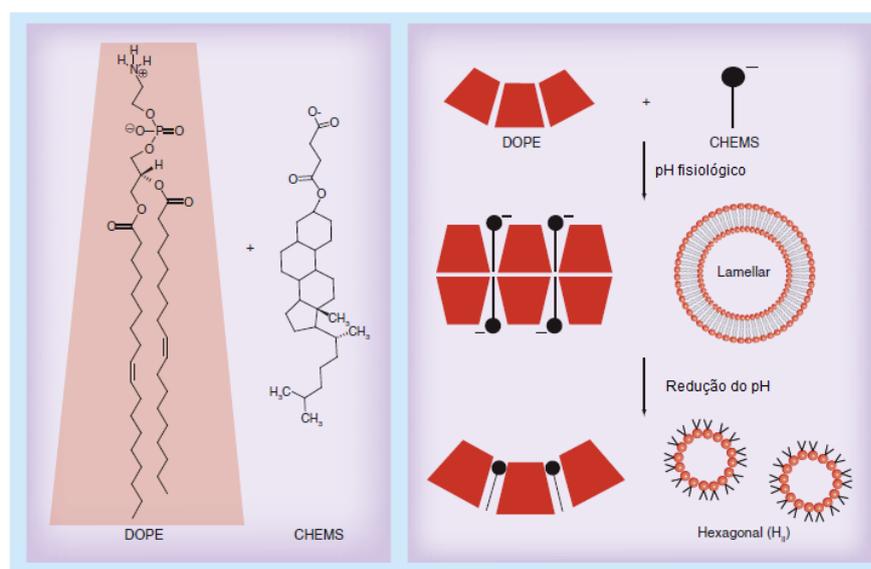
Apesar das estratégias de desenvolvimento lipossomal mencionadas acima, os lipossomas convencionais ou de circulação prolongada podem apresentar baixa liberação do fármaco ou podem ser incapazes de fundir-se com a membrana dos endossomas após sua internalização nas células. Por esse motivo, lipossomas pH-sensíveis foram extensamente estudados para melhorar a especificidade de entrega e o acúmulo de quimioterápicos na região tumoral (BALAMURALIDHARA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013).

O direcionamento de lipossomas pH-sensíveis (SpHL) para o tumor é um ponto importante a ser considerado na terapia do câncer. Alguns tecidos patológicos, incluindo tumores ou áreas de inflamação e infecção, apresentam um ambiente ácido causado por regiões de hipóxia, em comparação com os tecidos normais. Um lipossoma sensível ao pH é geralmente estável no pH fisiológico, mas pode ser desestabilizado e adquirir propriedades fusogênicas sob condições ácidas, levando assim à liberação do seu conteúdo aquoso diretamente na região tumoral, e também, podendo ser endocitado na forma intacta e liberar seu conteúdo dentro dos

endossomas em resposta a variações no pH (BOZZUTO & MOLINARI, 2015; CHENG & LIU, 2016; HE & TANG, 2017).

A utilização de derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), intercalada com moléculas anfífilas contendo um grupo ácido protonável, como o hemissuccinato de colesterila (CHEMS) são comumente utilizadas no desenvolvimento de SpHL. A geometria molecular dos derivados da PE é do tipo cone, os quais em meio aquoso, organizam-se sob a forma hexagonal, não sendo capazes de formar de vesículas por si só (OLIVEIRA *et al.*, 1998). Para formar lipossomas utilizando a DOPE como lípide estrutural é necessário adicionar um agente estabilizante com carga negativa, normalmente lípides carboxilado como o CHEMS. Essa associação resultará na repulsão eletrostática entre os grupos carboxilato (CHEMS) e fosfato (DOPE), favorecendo a organização lamelar e permitindo a formação da bicamada em pH fisiológico. A exposição dos SpHL ao meio ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com conseqüente perda da repulsão eletrostática e retorno à fase hexagonal, ou seja, há a desestabilização das vesículas e liberação do material encapsulado (FIGURA 12) (FERREIRA *et al.*, 2013).

Figura 12 – Representação das mudanças de fase desencadeadas pelo pH nos lipossomas constituídos por DOPE e CHEMS



A aplicação mais comum para o lipossoma consiste na encapsulação de agentes anticancerígenos demonstrada por estudos *in vivo* para avaliar a eficácia antitumoral de SpHL realizados com os seguintes fármacos: CDDP, doxorubicina (DOXO), gencitabina, tensirolimus, PTX, e mais recentemente, a coencapsulação de DOXO e PTX (FERREIRA *et al.*, 2013).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma formulação de SpHL para encapsular CDDP (SpHL-CDDP). Essa formulação foi constituída por DOPE:CHEMS:DSPE-PEG na razão molar 5,7:3,8:0,5 respectivamente. Quando testado *in vitro* essa formulação provou ser 1,34 vezes e 1,72 vezes mais eficazes do que a CDDP livre nas linhagens de câncer de pulmão A549 e nas linhagens de câncer de pulmão resistentes à CDDP, respectivamente (HIRAI *et al.*, 2007). Estudos *in vivo* demonstraram o aumento da concentração do fármaco no sítio tumoral na forma encapsulada, com conseqüente redução da toxicidade geral (mielotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade) (CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007a). Foi demonstrado, também, em um estudo pré-clínico desse lipossoma em tumor sólido de Ehrlich, que sua eficácia terapêutica pode ser comparada a da CDDP livre e que o aumento na dose administrada de SpHL-CDDP não produz aumento proporcional dos seus efeitos adversos, levando a um melhor perfil antitumoral quando comparado ao fármaco livre (LEITE *et al.*, 2012).

Uma formulação semelhante à descrita anteriormente foi proposta para a encapsulação do PTX (SpHL-PTX). Por ser um fármaco lipofílico, a associação do PTX na bicamada lipídica poderia ocasionar alteração da pH-sensibilidade dos lipossomas. Portanto, nosso grupo realizou um estudo com a intenção de comprovar a ausência de possíveis mudanças na organização supramolecular do lípide estrutural (DOPE) quando o PTX era adicionado à membrana lipossomal. Para isso, duas técnicas foram utilizadas, a calorimetria diferencial exploratória e a difração de raio X. Os achados indicaram que a introdução do fármaco no sistema não causa danos a pH-sensibilidade, o que resulta na desestabilização do lipossoma principalmente em regiões de baixo pH e liberação do PTX encapsulado preferencialmente no tecido alvo (MONTEIRO *et al.*, 2016). Estudos preliminares *in vitro* demonstraram que a atividade antitumoral de SpHL-PTX foi claramente maior que a verificada para PTX livre em células tumorais de mama humano (MCF-7 e

MDA-MB-231) e em células não tumorais (fibroblastos L929) possivelmente porque os SpHL-PTX podem ser internalizados de maneira mais eficiente do que o PTX livre (BARBOSA *et al.*, 2015).

Diante do que foi exposto e discutido acerca do câncer de mama, dos possíveis tratamentos e sobre a inovação dos lipossomas como carreadores de quimioterápicos, o presente trabalho apresenta-se relevante e promissor para investigar um novo tratamento destinado aos tumores de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a atividade antitumoral e o perfil toxicológico de lipossomas pH sensíveis contendo CDDP e PTX.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a compatibilidade dos fármacos PTX e CDDP.
- Preparar os SpHL-PTX e SpHL-CDDP e caracterizá-los quanto ao diâmetro, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação.
- Avaliar a citotoxicidade dos SpHL-PTX e SpHL-CDDP frente às células tumorais de mama MDA-MB-231 e 4T1.
- Investigar o sinergismo dos fármacos livres e dos fármacos encapsulados frente à linhagem 4 T1.
- Monitorar o volume tumoral dos animais após administração das formulações lipossomais em camundongos BALB/c portadores de tumor de mama da linhagem 4T1 e comparar com o volume tumoral dos animais que receberam PTX e CDDP livres e do grupo controle.
- Avaliar as possíveis alterações bioquímicas, indicativas de toxicidade renal e hepática, observadas após o tratamento.
- Avaliar as possíveis alterações histológicas do fígado, baço, pulmão, intestino e rins dos animais tratados com os lipossomas e comparar com a administração dos fármacos livres e do lipossoma branco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

A CDDP foi adquirida da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha) e o PTX foi cedido pela Quiral Química do Brasil S/A (Juiz de Fora, Brasil). Os lípidos DOPE e DSPE-PEG₂₀₀₀ foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) e o CHEMS da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O hidróxido de sódio foi obtido da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). O clorofórmio P.A. foi adquirido da Synth (São Paulo, Brasil). O cloreto de sódio P.A. e a acetonitrila de grau analítico para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi proveniente da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e destilada.

As células das linhagens MDA-MB-231 (ATCC[®] HTB26[™]) e 4T1 (ATCC[®] CRL-2539[™]) foram adquiridas do ATCC (Manassas, EUA). Os fibroblastos gengivais humanos saudáveis, obtidos de cultura celular primária de gengiva humana, foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da referida universidade sob número de protocolo 021/2009. O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI 1640) e a Sulforrodamina B foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, EUA) enquanto a tripsina e o EDTA foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O soro fetal bovino foi adquirido da Gibco[®] Life Technologies (Carlsbad, EUA).

Os animais BALB/c fêmeas foram obtidos do Biotério Central da UFMG (Belo Horizonte, Brasil). A solução de xilazina (Dopaser[®] 2%) e de cloridrato de ketamina (Dopalen[®] 10%) foram fornecidas pela Hertape Calier (Juatuba, Brasil) e Vetbrands Agroline (Campo Grande, Brasil), respectivamente.

Os kits para análises bioquímicas foram adquiridos da empresa Labtest (Lagoa Santa, Brasil). Todos os estudos em modelo animal foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob número de protocolo 75/2014.

4.2 Avaliação da reatividade entre PTX e CDDP

A fim de avaliar a compatibilidade dos fármacos em questão, alíquotas de 1,0 mL de soluções distintas de PTX e CDDP em dimetilformamida, 1 mg/mL, foram transferidas para frascos âmbar e misturadas sob agitação em vórtex. Em seguida, as misturas foram armazenadas a 4°C e suas características visuais (cor ou presença de precipitado) foram avaliadas nos tempos de 1 e 24 h. Nesses mesmos tempos, avaliou-se o teor de PTX e sua possível degradação pela CDDP utilizando o método CLAE previamente validado por Barbosa e colaboradores (2015a). As condições cromatográficas consistiram em uma coluna Hibar 4,0 mm x 250 mm LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha). O sistema eluente foi constituído pela mistura acetonitrila/água na proporção de 55:45 (v/v), respectivamente. O volume das injeções foi de 10 µL, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,2 mL/min. O material eluído foi detectado no comprimento de onda de 227 nm utilizando-se um detector UV e o tempo de retenção foi de 6 minutos.

4.3 Preparo da solução de CDDP

Para a formulação dos lipossomas, testes *in vitro* e *in vivo*, 10,0 mg de CDDP foram pesados em balança analítica, solubilizados em 4 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) sob aquecimento à temperatura de 37 °C e seguida de agitação em banho de ultrassom. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, completando-se o volume com solução de NaCl 0,9% (p/v).

4.4 Preparo da solução e dispersão micelar de PTX

Para a formulação lipossomal, 10,0 mg de PTX foram pesados em balança analítica, solubilizados em 4 mL de clorofórmio P.A. e posteriormente, essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, completando-se o volume com clorofórmio P.A.

Para os testes *in vitro*, 8,5 mg de PTX foram pesados em balança analítica e solubilizado em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar a solução estoque de 5 mM.

No experimento *in vivo* foi preparada a dispersão micelar de PTX semelhante ao Taxol®. Para isto, pipetou-se 2 mL de Cremophor EL e de etanol desidratado de modo a obter a mistura na proporção 1:1 (v/v) e reservou-se esta mistura. Então, 30,0 mg de PTX foram pesados em balão volumétrico de 2 mL e solubilizado com 1 mL da mistura preparada anteriormente sob agitação vigorosa, completando-se o volume com a mistura. No momento do uso, 80 µL dessa formulação foi diluída em 1,0 mL de salina a fim de obter uma concentração similar à dos SpHL-PTX (1,0 mg/mL).

4.5 Preparação dos lipossomas pH sensíveis de circulação prolongada

Todos os lipossomas de circulação prolongada (SpHL) foram preparados segundo a técnica de hidratação do filme lipídico, como descrito anteriormente por Bangham e colaboradores (1965). Para a preparação dos lipossomas foi utilizando o rotavapor Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça).

4.5.1 Preparo dos SpHL-branco

Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS, DSPE-PEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação em banho a 30 °C e a baixa pressão para eliminação do solvente. Após obtenção do filme lipídico, foi adicionada quantidade suficiente da solução de NaOH (0,456 M) necessária para promover a completa ionização do CHEMS e então, o filme foi hidratado com solução de NaCl 0,9% (p/v) à temperatura ambiente sob agitação vigorosa. Os lipossomas obtidos foram calibrados mediante filtração em filtros de 0,22 µm de espessura.

4.5.2 Preparo dos SpHL-PTX

Para realização dos estudos *in vitro* com a formulação lipossomal contendo apenas PTX, a mesma foi preparada conforme descrito a seguir. Primeiramente, alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS, DSPE-PEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente) e PTX (concentração final no lipossoma de 2,0 mg/mL) foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação em banho a 30 °C para eliminação do solvente. Ao filme lipídico obtido foi adicionado quantidade equimolar ao CHEMS da solução de NaOH na concentração de 0,456 M. O filme lipídico foi hidratado com solução de NaCl 0,9% (p/v), a temperatura ambiente mediante agitação no vórtex. Os lipossomas foram, então, filtrados em 0,22 µm. O PTX não encapsulado foi separado dos lipossomas por centrifugação (centrífuga Heraeus Multifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) a 3000 rpm, 4 °C, durante 15 minutos para a obtenção dos lipossomas purificados.

Para os estudos *in vivo*, a formulação lipossomal contendo apenas PTX, foi submetida à liofilização utilizando trealose como crioprotetor. Essa modificação foi realizada com o objetivo de atingir a dose necessária ao tratamento dos animais em pequenos volumes de injeção, uma vez que é recomendada a administração intravenosa de um volume máximo de 100 µL por camundongos. O preparo dessa formulação foi realizado de forma similar ao descrito anteriormente até a etapa de adição da solução de NaOH (0,456 M). Em seguida, o filme foi hidratado com solução de trealose preparada em cloreto de sódio. A proporção de crioprotetor utilizada foi de 1:3 (p/p, lipossoma:crioprotetor). Os lipossomas foram filtrados em filtros com diâmetro de 0,22 µm para calibrar o tamanho. Para eliminação do PTX não encapsulado a formulação foi centrifugada (centrífuga HeraeusMultifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, Massachu-setts, EUA) a 3000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos). Como etapa final do preparo, alíquotas da formulação foram separadas em frascos de liofilização, congeladas em nitrogênio líquido e levadas imediatamente ao liofilizador Thermo Savant Modulyo D-115 (Waltham, MA, EUA) e procedeu-se com a liofilização por 24 horas. No momento da administração nos animais, os líofilos foram ressuspensos em água purificada e o PTX foi quantificado por CLAE.

4.5.3 Preparo dos SpHL-CDDP

Primeiramente, alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG₂₀₀₀ (concentração lipídica total igual a 40 mM; razão molar 5,7:3,8:0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação em banho a 30 °C para eliminação do solvente à pressão reduzida. O filme lipídico foi hidratado com quantidade suficiente de solução de NaOH (0,456 M) e então, uma solução de CDDP a 2,0 mg/mL preparada em solução de NaCl 0,9% (p/v) foi adicionada. Os lipossomas obtidos foram calibrados mediante filtração em filtros de 0,22 µm de espessura. A CDDP não encapsulada foi separada dos lipossomas por ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima® L-80XP, Beckman Coulter, Califórnia, EUA) a 150.000 g, a 10 °C, durante 90 minutos para a obtenção dos lipossomas purificados. O pellet resultante foi ressuscitado em solução salina 0,9% (p/v).

4.6 Caracterização química e físico-química dos lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro médio, potencial zeta e teor de encapsulação conforme descrições abaixo:

4.6.1 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio das vesículas e o índice de polidispersão foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano series ZS90 (Malvern, Inglaterra). As medidas foram efetuadas em temperatura de 25 °C, utilizando um ângulo de 90°. O índice de polidispersão reflete o perfil de homogeneidade do diâmetro das vesículas e amostras com valores inferiores a 0,3 foram consideradas monodispersas. O potencial zeta foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons associado à mobilidade eletroforética utilizando o mesmo equipamento. Para a realização de ambas as medidas, 30 µL de lipossomas foram diluídos em 1,0 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) filtrada em 0,45 µm. As medidas foram feitas em triplicata e os resultados foram apresentados como a média ± desvio padrão.

4.6.2 Determinação do teor de encapsulação de PTX em SpHL-PTX

A determinação da porcentagem de PTX encapsulado nas diferentes formulações foi realizada por CLAE por método validado anteriormente por Barbosa e colaboradores (2015a). Inicialmente, a membrana lipídica dos lipossomas foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:9 v/v, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente (acetonitrila:água 55:45 v/v) e injetada no cromatógrafo. O equipamento utilizado foi composto de uma bomba modelo 515, um autoinjeter modelo 717 Plus e um detector DAD modelo 2996 (Waters Instruments, Milford, EUA), conectado a um computador. O software utilizado foi *Empower*, versão 2.0. Para a separação do PTX utilizou-se como fase estacionária a coluna Hibar 250-4 LiChrospher 100RP-18, 25 cm x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha). O sistema foi mantido em um fluxo igual a 1,2 mL/min, volume de injeção foi de 10 µL e o tempo de corrida igual a 8 minutos. O material eluído foi detectado em comprimento de onda igual a 227 nm à temperatura ambiente. O teor de encapsulação (TE) do PTX foi calculado de acordo com a seguinte equação:

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

4.6.3 Determinação do teor de CDDP encapsulada em SpHL-CDDP

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) foi utilizada para determinação da porcentagem de CDDP encapsulada. Todas as medições foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite Varian Spectr AA-Zeeman 220 (Springvale, Austrália) equipado com um forno de grafite GTA 110 e um amostrador automático. Uma lâmpada de cátodo oco para platina (Pt) número 139-3601 da Hitachi Instrument Service Co., Ltd. (Tóqui, Japão) foi usada a 10 mA. Argônio com pureza de 99,999% da Air Liquid Brasil (Contagem, Brasil) foi utilizado como gás de purga. Utilizaram-se tubos de grafite pirólico sem plataforma e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 265,9 nm e uma fenda de 0,5. O volume de amostra utilizado para realizar as medições foi de 20 µL. O TE da CDDP nas formulações foi calculado mediante a determinação da

porcentagem da concentração de CDDP presente nos lipossomas purificados (Lip Purificado) e antes da purificação (Lip total).

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

4.6.3.1 Doseamento da CDDP por GF AAS

As condições analíticas do forno para a determinação da platina pela técnica GF AAS foram definidas em um estudo anterior realizado por Vieira e colaboradores (2013) e estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições analíticas para determinação de platina em lipossomas contendo cisplatina, empregando GF AAS

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Fluxo de argônio (L/min)
Estágio 1 – secagem		
85	5,0	3,0
95	40,0	3,0
95	20,0	3,0
170	10,0	3,0
Estágio 2 – pirólise		
500	5,0	3,0
1100	5,0	3,0
1100	10,0	3,0
1100	2,0	0,0
Estágio 3 – atomização		
2700	0,8	0,0
2700	4,0	0,0
Estágio 4 limpeza		
2700	3,0	3,0

4.6.3.2 Preparo do padrão intermediário de Pt 350 µg/L

Foram realizadas diluições seriadas da solução padrão estoque de Pt (39,16 mg/mL), em solução aquosa de ácido nítrico 1% (v/v) até atingir a concentração de 350 µg/L. Construiu-se uma curva de calibração mediante diluições

da solução padrão intermediária cujos limites de concentração foram 39,2 µg/L a 509,1 µg/L de Pt (VIEIRA *et al.*, 2013).

4.6.3.3 Preparo das amostras de SpHL-CDDP

As amostras de SpHL-CDDP foram diluídas e digeridas em solução aquosa de ácido nítrico 1% (v/v) e a homogeneização foi realizada manualmente com pipeta automática. A concentração final estimada das amostras foi igual a 200 µg de Pt/L. As absorbâncias integradas (Abs/s) foram medidas no comprimento de onda de 265,9 nm com largura da fenda de 0,5 nm. O volume de amostragem utilizado foi igual a 10 µL e o volume total de 15 µL.

4.7 Cultivo Celular

As células MDA-MB-231 e os fibroblastos primários de gengiva humano foram mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. A linhagem tumoral de câncer de mama murino 4T1 foi mantida em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino. As culturas de células foram mantidas em garrafas T-75, em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Os meios de cultura foram substituídos a cada dois ou três dias. Os estoques celulares ficaram armazenados congelados em nitrogênio líquido no meio de congelamento constituído por soro fetal bovino e 10% (v/v) de DMSO, e periodicamente avaliados quanto a presença de micoplasma.

4.7.1 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico com Sulforrodamina B (SRB) previamente descrito por Vichai & Kirtikara (2006). Primeiramente, células tumorais de mama (MDA-MB-231 e 4T1) e os fibroblastos gengivais foram semeados em placa de 96 poços num volume de 100 µL/poço e densidade de 5.000 a 10.000 células/poço. Após 24 horas de incubação a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%, 100 µL de meio contendo os seguintes tratamentos foi adicionado em cada poço: lipossoma branco, CDDP livre ou SpHL-CDDP (de 0,065 a 100 µM) e PTX livre ou SpHL-PTX (de 0,0065 a 10 µM) e as placas foram

novamente incubadas por 48 horas. Após esse período, sem remover o meio de cultura, as células foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) por uma hora a 4 °C. Posteriormente, 100 µL da solução de SRB 0,057% (p/v) foram adicionados em cada poço da placa e mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente para a adequada coloração das células. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com solução de ácido acético 1% (v/v) para retirar o corante não ligado. A seguir, foi adicionado 100 µL da solução Tris-base (10 mM, pH 10,5), as placas foram levadas ao espectrofotômetro SpectraMax® Plus 384 microplate reader (Molecular Devices, EUA) para a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 510 nm.

Os valores de absorvância medidos para cada concentração de cada material-teste foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos controles celulares, considerados 100% viáveis, por meio da seguinte fórmula, onde DO= Densidade Óptica:

$$X\% = \frac{DO_{\text{material-teste}} \times 100}{DO_{\text{controle celular}}}$$

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico, e através de análise de regressão não-linear, foi possível calcular a CI₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Essa foi calculada com o auxílio do software GraphPad Prism versão 5.0 (San Diego, EUA), o qual permite obter a regressão da curva viabilidade celular x concentração do fármaco.

4.7.2 Análise de sinergismo entre os fármacos

Para verificar o sinergismo *in vitro* causado pelos efeitos citotóxicos da combinação de PTX e CDDP (livres e encapsulados) optou-se por adotar células da linhagem 4T1 devido à facilidade de obtenção de modelo tumoral em animais. Para isso, células 4T1 (5.000/cavidade) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa de CO₂ a 5%. Após esse tempo, as células foram tratadas com PTX, isoladamente ou em combinação com CDDP, em uma razão fixa,

equivalente aos respectivos valores de CI_{50} (isto é, $CI_{50} \times 0,25$, $\times 0,5$, $\times 1$, $\times 2$, e $\times 4$) por 48 horas. As concentrações de combinação dos fármacos, livres ou encapsulados, foram escolhidas, baseadas no método proposto por Chou (2006) que estabelece que devem ser testadas duas concentrações equidistantes, acima e abaixo da CI_{50} . Esse mesmo autor deduziu um modelo matemático para calcular o índice combinatório (IC, em inglês, *combination index*), que quantifica o sinergismo ou antagonismo entre duas substâncias. Neste teorema, valores de IC <1 , $=1$ e >1 indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente. Para a determinação dos respectivos valores de IC utilizou-se o software CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.).

Baseado em estudos anteriores do nosso grupo, cujas doses de CDDP e PTX, administradas por via intravenosa em modelos experimentais *in vivo* de tumor de mama, foram iguais a 8,0 mg/Kg e 7,5 mg/Kg, respectivamente, calculou-se a razão molar entre os fármacos considerando essas duas doses (LEITE *et al.*, 2012a; MONTEIRO *et al.* 2018). Uma razão molar de aproximadamente 1:3 de PTX:CDDP foi obtida. Diante disso, nesse estudo foi avaliada uma combinação na razão molar de 1:3 (PTX:CDDP), adotando-se como parâmetro o valor de CI_{50} do lipossoma de PTX, seguindo-se o esquema de concentrações proposto por Chou (2006). Assim, o esquema de tratamento adotado está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Representação do esquema de tratamento do sinergismo

Valores experimentais	
Concentração de PTX livre ou encapsulado (μM)	Concentração de CDDP livre ou encapsulada (μM)
0,05	0,15
0,1	0,3
0,2	0,6
0,4	1,2
0,8	2,4
1,6	4,8

4.8 Experimentação *in vivo*

4.8.1 Animais do estudo

Foram utilizados vinte e um camundongos BALB/c fêmeas com 8 semanas de idade e peso corporal de aproximadamente 20 g, obtidos do Biotério Central da UFMG. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, mantidos em ambiente com controle de ciclo de luz e ventilação e tiveram livre acesso à ração e água (CEUA 75/2014).

4.8.2 Obtenção do modelo de tumor de mama 4T1 em camundongos BALB/c

A inoculação das células de tumor de mama 4T1 foi feita injetando-se subcutaneamente $2,5 \times 10^6$ células/animal num volume igual a 100 μ L no flanco direito de cada animal. Após sete dias da inoculação do tumor, os tumores apresentaram-se palpáveis e os animais foram divididos, aleatoriamente, em 3 grupos com 7 animais.

4.8.3 Delineamento experimental

Dos três grupos estudados, o primeiro, recebeu a coadministração de PTX e CDDP livre (7,5 mg/Kg e 8,0 mg/Kg, respectivamente); o segundo grupo recebeu a coadministração de SpHL-PTX e SpHL-CDDP (7,5 mg/Kg e 8,0 mg/Kg, respectivamente) e o terceiro, grupo controle, recebeu o SpHL-branco, em um volume correspondente a quantidade de lípides administrada no grupo 2. Cada grupo recebeu a mesma quantidade total de fármaco, considerando a concentração molar dos mesmos. Dessa forma a razão molar de fármacos se manteve fixa entre os grupos de animais tratados.

Os camundongos receberam, por via intravenosa, dose única de tratamento. As formulações lipossomais e soluções foram administradas pela veia caudal utilizando seringas de insulina de 1 mL.

4.8.4 Avaliação da atividade antitumoral

A atividade antitumoral foi avaliada nos sete dias subsequentes ao tratamento a partir das dimensões do nódulo do tumor, o qual foi medido a cada dois dias com o

auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Tóquio, Japão) e calculado de acordo com a seguinte fórmula: $V = 0,5 \times (d1 \times d2^2)$, em que d1 e d2 representam o maior e menor diâmetro do tumor, respectivamente (ROLLAND *et al.*, 2009).

A variação do volume tumoral foi determinada considerando-se o volume inicial como 100% e calculando-se a porcentagem de aumento ou redução do volume de acordo com esse volume inicial. Ao final do período experimental o volume relativo do tumor (VRT) foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{VRT} = \frac{\text{volume do tumor no dia 6}}{\text{volume do tumor no dia 0}}$$

4.8.5 Avaliação de toxicidade

Após o tratamento, os animais foram observados quanto à alteração de parâmetros comportamentais, peso corporal, morbidade e mortalidade. Os animais foram pesados a cada dois dias. Outros parâmetros avaliados foram análise hematológica, bioquímica e avaliação histopatológica.

4.8.5.1 Investigação hematológica e bioquímica

Para as análises hematológicas e bioquímicas, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo o anticoagulante EDTA (300 mmol/L). A proporção de EDTA 1 mg/mL:sangue foi 0,1:1 (v/v) e o volume de sangue coletado foi aproximadamente 0,6 mL de cada animal.

Imediatamente após a coleta, os tubos contendo sangue e EDTA foram homogeneizados por 30 segundos e uma alíquota foi utilizada para a determinação dos seguintes parâmetros hematológicos: número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, global e diferencial de leucócitos e as plaquetas. Os parâmetros foram mensurados automaticamente utilizando o equipamento Hemovet 2300 (São Paulo, Brasil) e comparados com os valores de referência obtidos anteriormente no estudo de de Oliveira Silva (2018).

Em seguida, uma amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos para obtenção do plasma, o qual foi utilizado para quantificação dos parâmetros bioquímicos. Os testes foram realizados em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil), utilizando kits comerciais. Foram avaliados marcadores de função renal (uréia e creatinina) e função hepática por meio da dosagem de alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST) e gama glutamil transpeptidase (gama GT).

4.8.5.2 Avaliação histopatológica

Para análise histopatológica foram coletados tecido tumoral, fígado, baço, pulmão, intestino e rins. Os tecidos foram fixados em formol tamponado a 10%, incluídos em bloco de parafina, seccionados em cortes de 4 µm de espessura e corados pelo método hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas pelo Professor Geovanni Dantas do Departamento de Patologia do ICB, UFMG e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera acoplada a microscópio óptico (câmera digital Spot Insight Color adaptada ao microscópio Olympus BX-40 e o software de captura SPOT® versão 3.4.5).

4.9 Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata e os dados obtidos foram analisados com os softwares GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e CalcuSyn (Biosoft, Cambridge, U.K.). Os dados foram previamente avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade utilizando os testes de D'Agostino & Pearson e Bartlett, respectivamente. Os dados que seguiram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas pela equação: $y = \log(\text{variável} + 1)$ a fim de torná-las dentro da normalidade. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Compatibilidade entre os fármacos

A compatibilidade entre os fármacos foi avaliada de acordo com a degradação do PTX na presença de CDDP. Não foram observadas alterações visuais como mudança de cor ou presença de precipitado na mistura. Análise por CLAE da concentração de PTX mostrou que após 1 hora ou 24 horas de contato direto, não houve redução da concentração inicial de PTX, indicando compatibilidade química e física entre os fármacos. Os dados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de paclitaxel determinada após incubação com cisplatina

Solução	Concentração Teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental \pm DP ($\mu\text{g/mL}$)
PTX	1000	1054 \pm 1,57
Mistura 1 hora	500	551 \pm 0,18
Mistura 24 horas	500	499 \pm 0,66

Cada valor representa a média \pm desvio padrão (DP); n = 3

5.2 Caracterização química e físico-química das formulações

5.2.1 *SpHL-CDDP* e *SpHL-PTX*

Os parâmetros físico-químicos das formulações lipossomais, como o diâmetro médio das vesículas, o índice de polidispersão e o potencial zeta estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Características físico-químicas dos SpHL-PTX e SpHL-CDDP

Formulação	Tamanho (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	Teor de Encapsulação (%)
SpHL-PTX	197 ± 22	0,23 ± 0,03	-2,9 ± 0,3	68 ± 10
SpHL-CDDP	193 ± 14	0,22 ± 0,04	-2,9 ± 0,6	31 ± 2

Cada valor representa a média ± desvio padrão (n = 3)

Os resultados de diâmetro médio inferiores a 200 nm, obtidos para os SpHL-PTX e SpHL-CDDP foram similares aos descritos previamente por nosso grupo de pesquisa (BARBOSA *et al.*, 2015; LEITE *et al.*, 2012). A obtenção de um diâmetro médio reduzido é importante, uma vez que lipossomas com tamanho entre 50 e 300 nm acumulam-se, preferencialmente, nos tumores devido ao efeito EPR (BAE & PARK, 2011). O índice de polidispersão mostrou-se abaixo de 0,3, o que é um indicativo de amostras monodispersas.

O potencial zeta próximo da neutralidade pode ser atribuído às moléculas de PEG presentes na superfície da bicamada lipídica. A presença de fosfolípidos funcionalizados com PEG na superfície dos lipossomas reduz sua mobilidade eletroforética, resultando em potencial zeta próximo à neutralidade (AZONANOTECHNOLOGY ARTICLE, 2018). Em estudos anteriores foi demonstrado que nanopartículas carregadas tendem a possuir maiores taxas de opsonização em comparação com as partículas neutras, por isso, partículas com cargas são mais rapidamente eliminadas da circulação sanguínea comparadas a sistemas constituídos por lípidos peguilados os quais diminuem o reconhecimento pelas células do SFM, promovendo o aumento no tempo de circulação sanguínea (BAKRANIA, VARIYA & PATEL, 2016).

O teor de encapsulação de PTX nos lipossomas pH-sensíveis, para a mesma razão molar lípide/fármaco, mostrou-se semelhante aos resultados obtidos em estudo anterior realizado por Barbosa e colaboradores (2015), o qual foi próximo de 61%. Nesse estudo, os autores investigaram a influência da composição lipídica e da razão molar lípide/fármaco na capacidade de encapsular o PTX. Apesar dos resultados mostrarem que o aumento na razão molar de lípide/fármaco para

lipossomas SpHL-PTX levou ao aumento significativo na concentração de PTX encapsulado, houve uma redução na porcentagem de encapsulação que juntamente com os resultados de caracterização físico-química influenciaram a escolha da menor razão molar para prosseguimento com os estudos. Para este estudo, escolheu-se a maior razão lípide/fármaco devido a sua capacidade de carrear maior concentração de PTX, a qual é requerida nos estudos *in vivo*.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, o método desenvolvido para preparo do SpHL-CDDP era a evaporação em fase reversa (REV) seguido de extrusão para calibrar o tamanho das vesículas formadas. Com esse método obtinha-se um teor de encapsulação de aproximadamente 22%. Apesar do baixo teor de encapsulação, estudos foram conduzidos em modelos animais e excelentes resultados foram encontrados para os SpHL-CDDP preparados a partir dessa metodologia. Para o presente trabalho, decidiu-se testar outro método de preparação do SpHL-CDDP o qual foi a hidratação do filme lipídico seguido de filtração para calibração do tamanho das vesículas. Essa modificação no método do preparo do SpHL-CDDP, que o tornou mais simples, mostrou um resultado interessante pois proporcionou o aumento da encapsulação do fármaco em lipossomas e manteve os parâmetros de diâmetro médio e potencial zeta adequados para prosseguimento do estudo.

A partir desses resultados, os valores de encapsulação obtidos para PTX e CDDP nesse estudo foram considerados adequados para a realização dos estudos posteriores *in vitro* e *in vivo*.

5.3 Estudo de viabilidade celular

Para o teste de viabilidade celular *in vitro* dos fármacos livres e encapsulados, duas linhagens celulares TNBC (MDA-MB-231 e 4T1) e uma linhagem de fibroblasto gengival humano saudável foram tratadas com concentrações seriadas de CDDP livre, SpHL-CDDP (variando de 0,065 a 100 μM), PTX livre ou de SpHL-PTX (variando de 0,0065 a 10 μM) por 48 horas.

Os dados obtidos, expressos como viabilidade celular (%), estão representados na Figura 13 e os valores de CI_{50} e estão detalhados na Tabela 8.

Tabela 8 – Média dos valores de CI_{50} para as células tratadas com os fármacos PTX e CDDP livres e encapsulados

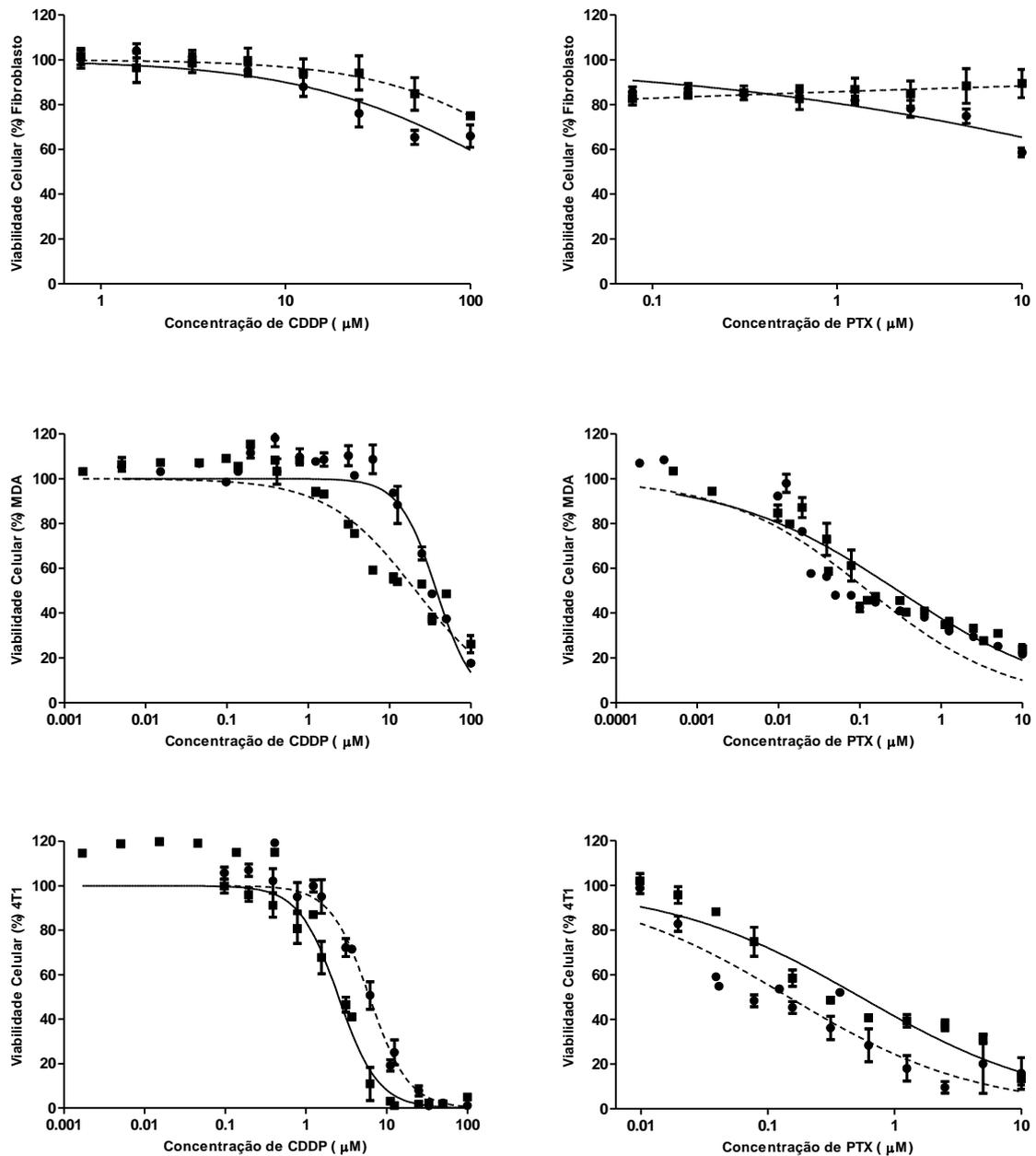
Linhagem celular	Tratamento	Valor de CI_{50} (μM)	Intervalo de Confiança de 95%
MDA-MB-231	PTX livre	0,3	0,2 a 0,4
	SpHL-PTX	0,1	0,06 a 0,2
	CDDP livre	37,7	31,8 a 44,8
	SpHL-CDDP	21,0 ^a	15,8 a 27,9
4T1	PTX livre	0,7	0,5 a 1,0
	SpHL-PTX	0,4	0,1 a 0,6
	CDDP livre	2,5	2,2 a 2,9
	SpHL-CDDP	6,1 ^a	5,5 a 6,9

CI_{50} : concentração capaz de inibir 50% de crescimento das células após 48 horas de tratamento. Os valores de CI_{50} representam a média (n=3). ^aRepresenta diferença estatística ($p < 0,05$) entre o SpHL-CDDP e CDDP livre.

Para a linhagem MDA-MB-231 o SpHL-PTX apresentou efeitos citotóxicos ligeiramente mais promissores do que os observados para o PTX livre em todas as concentrações de fármaco testadas, indicando que o PTX carregado pelo lipossoma exibe atividade equivalente ao fármaco livre. Outra observação importante foi o fato da encapsulação da CDDP promover a redução dos valores de CI_{50} para a linhagem MDA-MB-231, indicando um incremento de sua atividade citotóxica quando encapsulado. Uma justificativa para esses achados é que os lipossomas facilitarão a internalização dos fármacos pelas células e promoverão sua liberação de maneira mais controlada, potencializando seu efeito citotóxico (CHENG & LIU, 2016; FATTAL, COUVREUR & DUBERNET, 2004). Uma vez internalizado pelas células tumorais os lipossomas são compartimentalizados pelos endossomas que apresentam valores de pH entre 4,5 a 6,0. O ambiente ácido dos endossomas promoverá a desestabilização das membranas do lipossoma sensível ao pH, ocasionando na liberação de CDDP e PTX no citoplasma das células antes que os nanossistemas sejam degradados, e diminuindo a ocorrência dos mecanismos de resistência aos fármacos (FERREIRA et al., 2013; CHENG & LIU, 2016).

Resultado semelhante ao da linhagem MDA-MB-231 foi encontrado para a linhagem 4T1 em relação ao PTX livre e SpHL-PTX. Isso pode ser explicado pela capacidade das linhagens de células TNBC, de maneira geral, exibirem maior sensibilidade ao PTX quando comparado ao tratamento com outros fármacos, como a CDDP (LUCANTONI, 2018). Por outro lado, o valor de CI_{50} para o SpHL-CDDP foi significativamente maior na linhagem 4T1 comparado à CDDP livre, indicando menor citotoxicidade dos lipossomas frente a esta linhagem celular. Esse resultado pode ser explicado baseado em dados da literatura, os quais mostram que a linhagem 4T1 é um modelo estabelecido para o câncer de mama no estágio IV que é mais sensível ao tratamento com CDDP (Li *et al.*, 2014). Sendo assim, a CDDP na forma livre poderia inibir o crescimento celular de maneira mais efetiva do que o SpHL-CDDP (refletido pelos valores de CI_{50}), uma vez que este promove a liberação do fármaco encapsulado de maneira mais controlada conforme foi discutido acima. Além disso, estudos prévios *in vivo* realizados por Carvalho-Júnior e colaboradores (2007a) e Leite e colaboradores (2012) demonstraram a capacidade dos lipossomas carreadores de CDDP em promoverem uma maior concentração desse fármaco no sítio tumoral, além de ser possível o aumento da dose administrada sem aumento dos efeitos adversos da CDDP. Esses achados tornam racional e embasam nosso objetivo inicial de avaliar a atividade antitumoral decorrente da coadministração de SPHL-PTX e SpHL-CDDP em um modelo animal portador de tumor da linhagem 4T1.

Figura 13 – Efeito dos fármacos livres (linha cheia) e dos fármacos encapsulados (linha tracejada) na citotoxicidade frente à células de diferentes linhagens pelo ensaio com SRB



5.3.1 Estudo da seletividade dos tratamentos

Outro aspecto investigado por meio dos valores de CI_{50} foi o grau de seletividade dos lipossomas e dos fármacos livres frente a células tumorais TNBC e células

saudáveis, fibroblastos gengivais humano. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação de citotoxicidade dos tratamentos com PTX e CDDP livres e encapsulados frente à célula saudável (fibroblasto) e tumorais (4T1 e MDA-MB-231)

Linhagem Celular	Tratamento	CI50 (μM) Fibroblasto	CI50 (μM)	IS ($\text{CI}_{50\text{FIB}}/\text{CI}_{50\text{CEL}}$)
4T1	PTX livre	>10	0,7	>14,3
	SpHL-PTX	>10	0,4	>25,0
	CDDP livre	>100	2,5	>40,0
	SpHL-CDDP	>100	6,1	>16,4
MDA-MB-231	PTX livre	>10	0,3	>33,3
	SpHL-PTX	>10	0,1	>100,0
	CDDP livre	>100	37,7	>2,7
	SpHL-CDDP	>100	21,0	>4,8

IS: índice de seletividade. Representa o valor que demonstra quão menos tóxico é o composto para uma célula saudável quando comparada a uma linhagem tumoral.

Pode-se observar que os fármacos, nas mesmas concentrações testadas em células tumorais, não reduziram a viabilidade celular das células saudáveis, o que nos leva a ressaltar que todos os tratamentos se apresentam seletivos para as células tumorais analisadas. Sabe-se que a toxicidade seletiva é o objetivo da terapia farmacológica antineoplásica, ou seja, a inibição de vias ou de alvos, que são críticos para a sobrevivência e a replicação de células tumorais, em concentrações abaixo daquelas necessárias para afetar as células saudáveis do hospedeiro. A seletividade pode ser obtida ao se direcionar a terapia a alvos exclusivos das células tumorais, que não estejam presentes em células não tumorais, ou a vias de sinalização e receptores superexpressos em células tumorais (COUVREUR & VAUTHIER, 2006).

O possível efeito citotóxico exercido pelo lipossoma branco também foi avaliado, sendo que nenhuma das três linhagens celulares sofreu interferência significativa dos SpHL-branco (a viabilidade celular manteve-se entre 86 a 95% para a linhagem

4T1, em torno de 100% para a linhagem MDA-MB-231 e entre 97 a 107% para os fibroblastos não tumorais).

5.4 Análise de sinergismo

Muitos protocolos referentes ao tratamento do câncer incluem a combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação. Um dos benefícios da combinação de medicamentos é o efeito sinérgico, o que significa que o efeito combinado é maior do que a soma dos efeitos individuais. O sinergismo de fármacos permite que o efeito terapêutico seja alcançado com doses mais baixas dos medicamentos, proporcionando uma melhora na eficácia terapêutica com menos efeitos adversos (FRANCO & OLIVEIRA, 2017).

A obtenção do efeito sinérgico por meio da terapia combinada é dependente da dose correta dos diferentes fármacos, bem como da proporção adequada entre eles. Segundo Chou & Talalay (1983, 1984), para um estudo de sinergismo em estágio inicial, a relação de cada fármaco deve ser realizada numa razão de equipotência, por exemplo, na razão $(CI_{50})_1/(CI_{50})_2$, de modo que as contribuições dos efeitos de cada fármaco para a combinação sejam aproximadamente iguais. Sendo assim, foi realizado o cálculo das relações de CI_{50} dos fármacos livres (TABELA 10).

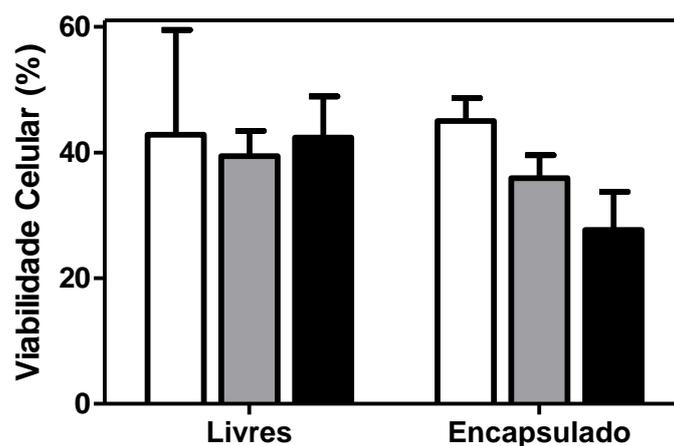
Tabela 10 – Determinação da razão molar adequada entre os fármacos livres

Linhagem Celular	Razão $(CI_{50})_{CDDP}/(CI_{50})_{PTX}$	Razão (CDDP:PTX)
MDA-MB-231	125,66	125:1
4T1	3,6	3:1

Como pode ser observada, a razão molar entre os fármacos livres para a linhagem MDA-MB-231 indica a necessidade de encapsulação de uma concentração de CDDP muito superior ao limite do lipossoma, evidenciando numa limitação farmacotécnica. Devido a esse empecilho, foi escolhido trabalhar com a linhagem 4T1 a qual apresentava uma razão molar condizente com o preparo da formulação e por ser um modelo tumoral de fácil acesso e reprodutível em se tratando de tumor de mama.

Dessa maneira, a combinação dos fármacos livres e encapsulados foi avaliada em uma razão molar constante (1:3) de PTX e CDDP. As células 4T1 foram tratadas por 48 horas com PTX livre, CDDP livre, mistura de PTX + CDDP, SpHL-PTX, SpHL-CDDP e mistura de SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Ao analisar os resultados de viabilidade celular para cada tratamento na Figura 14, observa-se que, para o tratamento com os fármacos livres e com CDDP + PTX, o efeito combinado não foi maior do que a soma dos efeitos individuais, então a mistura dos dois fármacos não conseguiu inibir do crescimento das células tumorais quando é feita uma comparação desta resposta com o efeito na viabilidade de cada fármaco isolado, sugerindo uma resposta antagônica da mistura. Já para o tratamento com os fármacos encapsulados, verificou-se que a combinação deles impactou na viabilidade celular de modo a reduzi-la, ou seja, o tratamento com SpHL-PTX + SpHL-CDDP foi capaz de inibir de forma mais efetiva o crescimento das células tumorais, sugerindo que esse tratamento apresenta um maior efeito contra esse tipo de célula.

Figura 14 – Variação da viabilidade celular da linhagem 4T1 observada após 48 horas de tratamento com CDDP (barra branca), PTX (barra cinza) e a mistura (barra preta). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão



Os dados de viabilidade celular foram inseridos em arquivo do programa Calcsyn para determinação dos índices combinatórios (IC) de cada ponto por meio de modelo matemático elaborado por Chou & Talalay (1981, 1983, 1984). Quando

analisada a combinação de PTX + CDDP, verificou-se que todas as concentrações testadas se mostraram antagônicas (valores de IC acima de 2). Já a análise da combinação entre SpHL-PTX + SpHL-CDDP mostrou que há sinergismo para a maior concentração testada (Tabela 11).

Tabela 11 – Efeito antagônico e sinérgico do tratamento realizado com os fármacos livres e encapsulados, respectivamente

Combinações Testadas	Razão de combinação	Valor médio de IC	Efeito Observado
PTX (1,6 µM) + CDDP (4,8 µM)	CI ₅₀ x 2	2,3 ± 0,07	Antagonismo
SpHL-PTX (1,6 µM) + SpHL- CDDP (4,8 µM)	CI ₅₀ x 2	0,3 ± 0,04	Sinergismo

A terapia combinada desempenha papel fundamental no tratamento do câncer. Experiências clínicas mostraram que os fármacos citotóxicos atuam de maneira mais eficaz quando administrados em combinação para obter efeitos aditivos ou sinérgicos. A lógica para a quimioterapia combinada baseia-se na coadministração de medicamentos que atuam em diferentes mecanismos moleculares, e assim, aumenta-se a chance de morte das células tumorais enquanto se reduz a probabilidade de aparecimento de resistência aos medicamentos e minimiza a toxicidade (AL-LAZIKANI, BANERJI & WORKMAN, 2012). A intenção ao administrar a combinação dos fármacos é atingir diferentes vias para inibição do crescimento tumoral, por exemplo, as células deficientes do gene Tp53 têm a capacidade de manter o ciclo celular parado em G2 por longos períodos de tempo podendo causar recidiva (SKLADANOWSKI *et al.*, 2007). Sendo assim, é interessante utilizar a combinação de fármacos que tenham ação complementar, ou seja, enquanto um fármaco exibe atividade citotóxica, o outro pode ativar a via de apoptose mitocondrial (PABLA *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2011), por exemplo, utilizando assim uma outra via apoptótica.

A administração concomitante de PTX e CDDP não é indicada mesmo ambos apresentando mecanismos de ação diferentes (Guia de Protocolos e Medicamentos

para Tratamento em Oncologia e Hematologia, 2013). Apesar da CI_{50} do PTX ter sido muito menor que da CDDP, quando os dois fármacos são administrados ao mesmo tempo, observa-se uma predominância da resposta da cisplatina. Experimentos em células de ovário sugerem que a CDDP pode bloquear parcialmente a estabilização dos microtúbulos induzida pelo PTX, impactando negativamente na capacidade apoptótica deste fármaco. Vários mecanismos podem explicar o domínio observado da cisplatina sobre o paclitaxel. Um deles pode envolver o bloqueio do ciclo celular induzido pela cisplatina, ou seja, a CDDP promove a parada do ciclo celular em G_1-S , bloqueando as atividades induzidas pelo PTX que ocorrem em várias outras fases do ciclo celular, particularmente a parada mitótica (fase M). Um mecanismo alternativo pode corresponder ao aumento da tolerância celular ao dano no DNA podendo resultar na falha da ativação da via apoptótica. Outro mecanismo proposto é que ambos os fármacos possuem a capacidade de modular a transcrição de maneira que a CDDP poderia bloquear a transcrição de genes específicos relacionados à citotoxicidade do PTX. Sendo assim, alguns estudos não indicam a administração concomitante de CDDP e PTX, e sim sugerem que a administração na sequência correta pode trazer os benefícios desejados para o tratamento com a combinação de fármacos (BRENES *et al.*, 2007; CUELLO *et al.*, 2001; LUCANTONI *et al.*, 2018; SAWADA *et al.*, 2003).

Uma explicação para o antagonismo observado apenas para o tratamento com os fármacos livres é que, apesar de PTX e CDDP apresentarem mecanismos de ação distintos, a resposta citotóxica da combinação desses fármacos é altamente dependente da sequência de administração (JUDSON *et al.*, 1999; ROWINSKY *et al.*, 1993). Embora possa parecer razoável combinar vários antitumorais, a administração concomitante de determinados medicamentos para o tratamento do câncer de mama pode mostrar tendência para um resultado inferior. Nesses casos, esses agentes podem ser melhores utilizados em sequência e não em combinação (AL-LAZIKANI, BANERJI & WORKMAN, 2012).

Uma hipótese que poderia explicar o resultado sinérgico encontrado para os lipossomas é que a encapsulação dos fármacos induziria o regime correto de administração. Possivelmente o SpHL-PTX liberaria seu conteúdo mais rapidamente do que o SpHL-CDDP, promovendo a sequência correta de tratamento para as

células tumorais, refletindo no sinergismo observado. Enquanto que, na administração dos fármacos livres, eles estariam disponíveis, ao mesmo tempo, nas células tumorais, fato que poderia provocar uma competição entre os mecanismos de ação desses fármacos como foi demonstrado por Rowinsky e colaboradores (1991 e 1993) e ocasionaria o efeito antagônico determinado.

A combinação tanto dos fármacos livres quanto dos lipossomas não foi tóxica aos fibroblastos de gengiva não tumorais, exibindo viabilidade celular (%) acima de 75% após 48 horas de exposição. Esse resultado comprova a seletividade dos tratamentos combinados em relação às células tumorais, preservando as células não tumorais saudáveis.

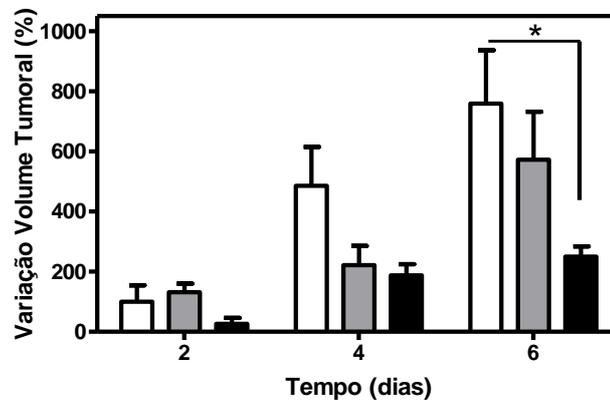
Esses resultados abriram a perspectiva de utilização dos fármacos na forma encapsulada para o tratamento de tumores em modelos animais.

5.5 Avaliação da atividade antitumoral *in vivo*

Baseado em estudos anteriores do grupo de pesquisa com CDDP e SpHL-CDDP, decidiu-se iniciar o tratamento dos camundongos BALB/c com injeção intravenosa na cauda de 8,0 mg/Kg (LEITE *et al.*, 2012a). A dose de tratamento do PTX de 7,5 mg/Kg também foi baseada em trabalhos do nosso grupo de pesquisa (dados não publicados).

A atividade antitumoral dos seguintes tratamentos: lipossoma branco, combinação de fármacos livres e combinação de fármacos encapsulados, foi realizada avaliando-se a variação do volume do tumor ao longo de seis dias. A efetividade da combinação dos fármacos livres e dos fármacos encapsulados é mostrada na Figura 15.

Figura 15 – Efeito antitumoral em camundongos BALB/c observados até 6 dias após a administração IV de SpHL (barra branca), CDDP + PTX (barra cinza) e SpHL-PTX + SpHL-CDDP (barra preta). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão



Como pode ser observado, o grupo que recebeu o lipossoma branco apresentou crescimento do volume tumoral contínuo ao longo do tempo avaliado. Do dia 2 para o dia 4 é verificado um crescimento de aproximadamente 5 vezes, enquanto que do dia 4 para o dia 6 houve um crescimento menor, uma vez que o tumor já se apresentava avançado e provocava dificuldade de deslocamento dos camundongos. Isso demonstra que o sistema lipídico não induziu efeito antitumoral e que o efeito observado para os demais tratamentos é decorrente apenas dos fármacos. Esse resultado é encontrado em outros estudos do grupo os quais utilizaram SpHL com a mesma composição lipídica (CARLESSO *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2012).

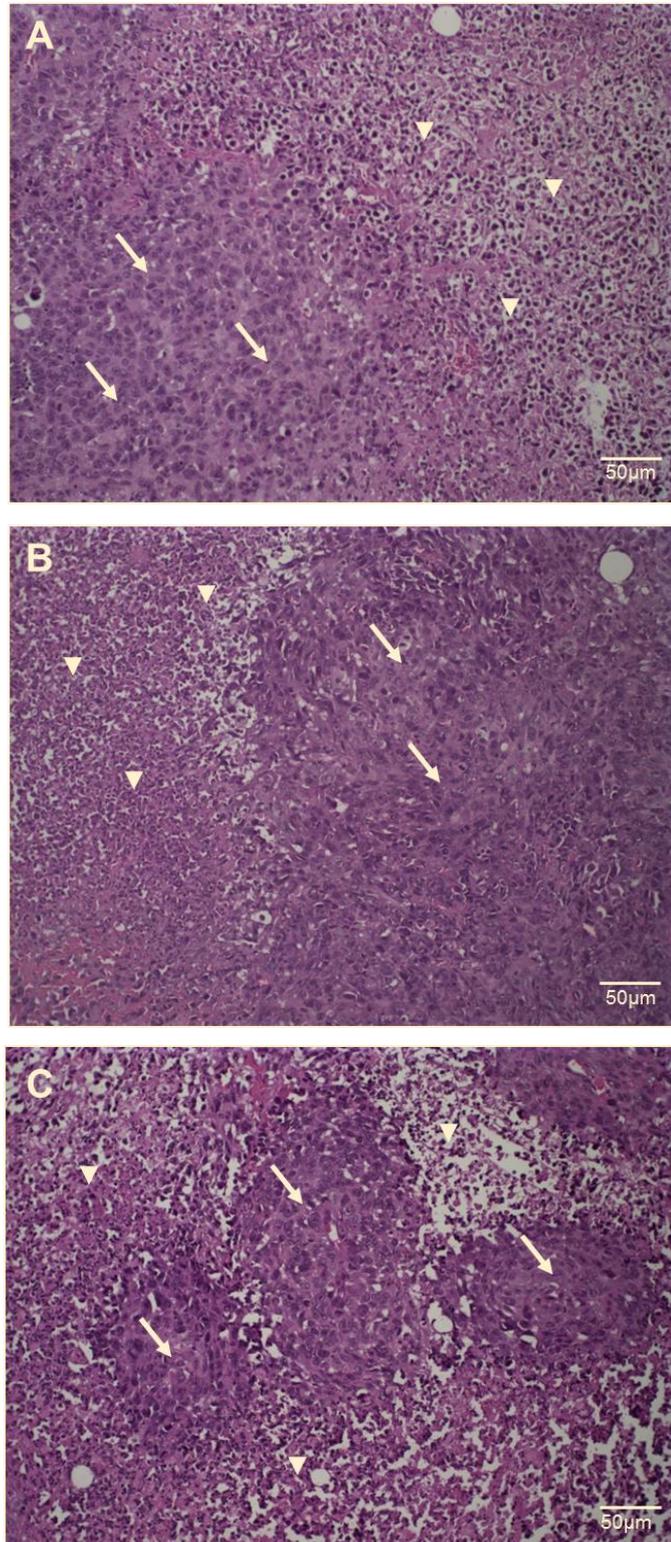
Para o grupo que recebeu a combinação dos fármacos livres, foi verificada uma redução do crescimento tumoral comparada ao grupo controle até o quarto dia após o tratamento. No entanto, no sexto dia do estudo observou-se uma recuperação do crescimento tumoral. Porém, foi decidido não administrar outro tratamento devido à mortalidade dos animais desse grupo. A recuperação do crescimento tumoral pode estar associada, além da necessidade de outro tratamento, ao resultado obtido com a análise de sinergismo *in vitro*. Neste resultado, ficou evidente que a combinação dos fármacos livres exibe uma resposta antagônica nas células tumorais, significando que a combinação de PTX e CDDP induz menos morte celular do que o tratamento com os fármacos isolados. No entanto, a combinação de PTX e CDDP é amplamente utilizada na clínica e apresenta bons resultados terapêuticos, desde

que administrada na sequência correta, como foi discutido anteriormente. Uma explicação para essa divergência é encontrada no estudo de Milross e colaboradores (1995), em que os autores mostram que a eficácia antitumoral é altamente dependente da sequência em que os fármacos foram administrados (a administração de PTX seguida de CDDP foi mais eficaz). Como a administração foi feita com os dois fármacos ao mesmo tempo, essa pode ser uma justificativa para o resultado encontrado, pois ambos atuam no ciclo celular, sendo que a CDDP suprimiu para zero a porcentagem de células na mitose, impedindo a atuação do PTX na própria mitose (MILROSS *et al.*, 1995).

Ao comparar grupo que recebeu o tratamento com a combinação dos fármacos encapsulados com os demais tratamentos, foi verificado, também, uma redução do crescimento tumoral ao comparar com o grupo controle, a qual foi significativamente diferente no 6º dia. É interessante notar ainda que o crescimento do tumor se estabilizou no 6º dia de observação, demonstrando padrão diferente do encontrado para o grupo tratado com a combinação dos fármacos livres. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos tratados, observa-se claramente uma tendência à melhora da atividade antitumoral após o tratamento com os fármacos administrados na forma lipossomal. A soma da resposta sinérgica encontrada nos experimentos *in vitro* e a capacidade de entrega mais seletiva do lipossoma no sítio tumoral (LEITE *et al.*, 2012) podem ser a justificativa para a redução significativa do crescimento tumoral observada para este grupo, evidenciando, assim, o ganho da encapsulação em modelo animal.

A análise histológica do tumor revelou presença de área necrótica em todos os grupos, porém, com maior extensão no grupo tratado com SpHL-PTX + SpHL-CDDP, conforme Figura 16. Essas áreas necróticas são decorrentes da desnaturação de proteínas celulares devido à queda acentuada no pH durante o processo de hipóxia causado, principalmente, pela ação antiangiogênica do PTX (BERNABEU *et al.*, 2017). Com isso, o citoplasma celular se torna bastante eosinófilo e como a maioria das enzimas autolíticas foi desnaturada, a célula não é destruída e a arquitetura tecidual é mantida por algum tempo até digestão e remoção do tecido necrótico por leucócitos (áreas brancas na Figura 16) (BRASILEIRO-FILHO, 2016).

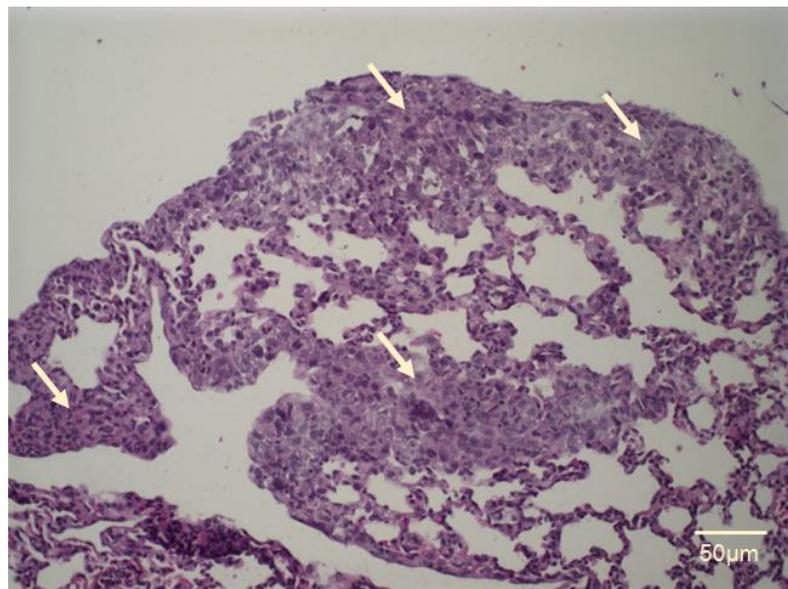
Figura 16 – Cortes histológicos de tumor de camundongos BALB/c fêmeas inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (c) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 200x. As setas pretas representam o parênquima tumoral. As cabeças de seta indicam áreas de infiltrado inflamatório



5.5.1 Avaliação da atividade antitumoral mensurada a partir da capacidade de metastatização do tumor

O modelo experimental adotado nesse estudo, camundongos BALB/c inoculados com células de tumor de mama 4T1, tem a tendência a formar um tumor sólido que se metastatiza preferencialmente para o tecido pulmonar (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2001). Sendo assim, o resultado encontrado a partir de observações de cortes histológicos do tecido pulmonar evidencia o que foi mencionado acima, pois os animais que receberam o SpHL como forma de tratamento apresentaram numerosos focos metastáticos (FIGURA 17), enquanto aqueles que receberam como tratamento PTX + CDDP livres ou SpHL-PTX + SpHL-CDDP não apresentaram foco de metástase (dados não mostrados). No estudo de Yin e colaboradores (2017), resultado similar foi encontrado para os animais que não receberam tratamento.

Figura 17 – Corte histológico do tecido pulmonar de fêmeas de camundongos BALB/c controle inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200x. As setas pretas representam focos metastáticos



5.6 Avaliação da toxicidade geral de PTX + CDDP e dos SpHL-PTX + SpHL-CDDP

5.6.1 Avaliação de peso, sinais clínicos e mortalidade dos animais

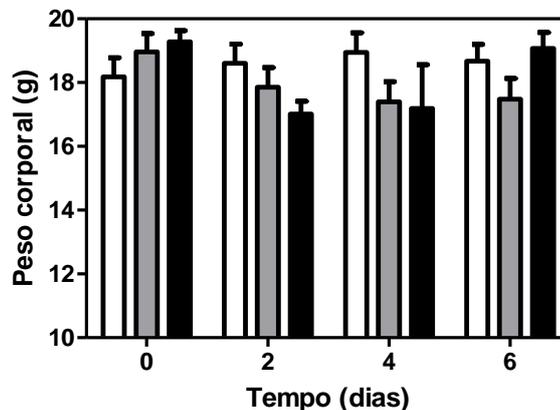
Quanto aos animais do grupo que recebeu apenas o SpHL não foram observados sinais clínicos, perda de peso ou mortes após seis dias de observação. Esse fato sugere que há biocompatibilidade e segurança de formulações lipossomais (HE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017)

Após a administração dos fármacos livres, alguns efeitos como ataxia, fraqueza, prostração e piloereção de intensidade moderada a intensa foram observados em todos os animais. Vale pontuar que esses sinais clínicos se mantiveram até o sexto dia após a administração e que diarreia foi observada em apenas um animal do grupo tratado com PTX + CDDP livre. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Leite e colaboradores (2009); Zhang e colaboradores (2016) e Yang, Ju & Dong (2017) e indicam a toxicidade desse tipo de tratamento. Para o grupo que recebeu os fármacos encapsulados, foi observada fraqueza e piloereção apenas no dia da administração. Esses achados são semelhantes ao estudo de Koudelka & Turánek (2012) em que eles demonstraram que as formulações de CDDP e PTX aumentam a dose máxima tolerada (DMT) de ambos os fármacos; e de Leite e colaboradores (2012a), em que foi verificada a DMT para o SpHL-CDDP aproximadamente 3 vezes superior a DMT da CDDP livre, sugerindo que os lipossomas podem reduzir a toxicidade induzida por esses fármacos e se tornar um candidato promissor para a terapia intravenosa de tumores sólidos.

Em relação ao peso, os grupos que receberam a combinação de PTX + CDDP ou SpHL-PTX + SpHL-CDDP apresentaram redução do peso corporal em relação ao controle (FIGURA 18). A administração de 8,0 mg/Kg de CDDP livre e 7,5 mg/Kg de PTX livre induziu a perda de peso nos camundongos a partir do segundo dia de monitoramento. Os camundongos que receberam tratamento com SpHL-PTX + SpHL-CDDP apresentaram uma perda máxima superior aos demais grupos, aproximadamente 12%. No entanto, os animais desse grupo apresentaram recuperação do peso corporal no 6º dia após o tratamento. Por outro lado, o grupo

tratado com a combinação dos fármacos livres apresentou redução do peso corporal menos acentuada (8%), porém, irreversível até o final do estudo, indicando sinais de toxicidade mais expressivos. Resultado semelhante foi encontrado por Araújo e colaboradores (2017), que observou uma maior perda de peso nos camundongos tratados com SpHL-CDDP nas primeiras 24 horas, seguido de recuperação do peso corporal após 72 horas da administração, e com outros estudos usando a mesma formulação lipossomal (ARAÚJO *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2012).

Figura 18 – Variação do peso corporal de camundongos BALB/c fêmeas observados durante 6 dias após a administração IV de SpHL (barra branca), PTX + CDDP (barra cinza) e SpHL-PTX + SpHL-CDDP (barra preta). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão



Na Tabela 12 estão apresentados os resultados de mortalidade dos camundongos após o tratamento com SpHL, PTX + CDDP ou SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Nenhuma morte foi observada nos animais tratados com a combinação dos SpHL-PTX + SpHL-CDDP durante o estudo. No entanto, dois camundongos tratados com a combinação dos fármacos livres morreram durante o tempo de observação. No estudo de Leite e colaboradores (2012a) CDDP livre e LpHS-CDDP foi administrada IV em camundongos em diferentes dosagens para encontrar a DMT. Nesse estudo, nenhuma morte foi observada nos camundongos fêmeas tratadas com CDDP livre na dosagem de 7,5 mg/Kg. Esse resultado mostra que a CDDP sozinha não induz mortalidade e sugere que a combinação do PTX à esta resulta no aumento da toxicidade do tratamento, fato este, já relatado na literatura, em que se sabe que a CDDP, quando administrada na sequência correta, potencializa os efeitos de

toxicidade do PTX (Guia de Protocolos e Medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia, 2013)

Tabela 12 – Resultados de mortalidade para camundongos BALB/c após o tratamento com SpHL, combinação de PTX + CDDP e combinação dos SpHL-PTX + SpHL-CDDP

Tratamento	Número de animais no grupo	Número de mortes	Porcentagem de morte
SpHL	7	0	0%
PTX + CDDP livres	7	2	28%
SpHL-PTX + SpHL-CDDP	7	0	0%

5.6.2 Investigação hematológica

Imediatamente após coleta do sangue dos animais, foi realizada a análise hematológica para investigar possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos. Os valores de referência (VR) utilizados para comparação foram baseados no trabalho de de Oliveira Silva (2018). Nesse trabalho a autora avaliou a toxicidade aguda de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo DOXO e utilizou de tratamentos com salina e SpHL para comparação com o tratamento do antitumoral. As análises hematológicas dos animais submetidos aos tratamentos deste estudo estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Parâmetros hematológicos de camundongos BALB/c fêmeas tratados com SpHL, combinação de PTX + CDDP e combinação dos SpHL-CDDP + SpHL-PTX

	Hemácias (cél/mm ³ x 10 ⁶)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	Plaquetas (cél/mm ³ x 10 ³)
SpHL	6,1 ± 0,5	11,8 ± 1,5	31 ± 2,3	293 ± 72
PTX + CDDP	4,9 ± 1,6	10,4 ± 0,6	28 ± 3,5	147 ± 54 ^a
SpHL-PTX + SpHL-CDDP	6,0 ± 0,2	11,4 ± 0,6	31 ± 1,2	246 ± 48 ^b

Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. ^aRepresenta diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05, teste de Tukey). ^bRepresenta diferença significativa em relação ao grupo PTX + CDDP (p < 0,05, teste de Tukey). VR: hemácias: 9,5 ± 2,2 cél/mm³ x 10⁶; hemoglobina: 12,3 ± 1,0 g/dL; hematócrito: 37 ± 1%.

Pela análise do eritrograma, verificou-se ausência de alteração significativa sobre a contagem de hemácias, quantificação de hemoglobina e hematócrito após os tratamentos dos três grupos. No entanto, ao comparar esses resultados com os valores de referência de Oliveira Silva (2018), verifica-se uma redução da contagem de hemácias para os três tratamentos (VR $9,5 \pm 2,2 \text{ cel/mm}^3 \times 10^6$) e, uma redução da quantificação de hemoglobina (VR $12,3 \pm 1,0 \text{ g/dL}$) e hematócrito (VR $37 \pm 1\%$) apenas para o grupo tratado com a combinação dos fármacos livres. Esse achado evidencia uma tendência de redução dos parâmetros hematológicos para o grupo tratado com PTX+CDDP, fato que sugere maior mielotoxicidade do tratamento com os fármacos livres. No estudo de Leite e colaboradores (2012), com a administração de CDDP livre na dose de 7,5 mg/Kg, foi observada uma redução na contagem de hemácia e quantificação de hematócrito em camundongos fêmeas semelhantes a este estudo, mas sem significância estatística. Em seu estudo, no entanto, não foi encontrada alteração na quantificação de hemoglobina. Apesar de não ser observada significância estatística nos dados encontrados, a anemia é uma resposta à administração de CDDP (SIKOV, 2015), sendo descrita na literatura que os lipossomas são capazes de reduzir a toxicidade geral dos fármacos livres (LEITE *et al.*, 2012a).

O tratamento com a combinação dos fármacos livres afetou consideravelmente o número de plaquetas tanto em relação ao controle e VR quanto em relação ao tratamento com a combinação dos fármacos encapsulados ($p < 0,05$). Esse achado sugere alta mielotoxicidade provocada pelos quimioterápicos. Nos estudos de Cai e colaboradores (2015) e Maroni e colaboradores (2012), resultado semelhante foi encontrado. Os autores explicam que esse achado pode ser devido à presença do tumor que leva a um enfraquecimento do estado de saúde dos camundongos e compromete sua resposta imune. Esses resultados sugerem que a encapsulação de CDDP em lipossomas pH-sensíveis e de circulação prolongada mantém o nível de células do sistema imunológico de acordo com os valores normais.

Tabela 14 - Parâmetros leucocitários de camundongos BALB/c tratados com SpHL, combinação de PTX + CDDP e SpHL-CDDP + SpHL-PTX

	Global de Leucócitos (cél/mm ³ x 10 ³)	Diferencial de Leucócitos (cél/mm ³ x 10 ³)				
		Linfócitos	Neutrófilos	Basófilos	Eosinófilos	Monócitos
SpHL	56,9 ± 14,2	6,6 ± 1,9	45,0 ± 10,0	0	1,0 ± 1,2	0,6 ± 1,2
PTX + CDDP	18,5 ± 5,9 ^a	4,9 ± 6,7	11,4 ± 2,3 ^a	0	0,1 ± 0,9	2,1 ± 0,7
SpHL-PTX + SpHL-CDDP	76,8 ± 8,5 ^{a,b}	4,8 ± 1,3	61,7 ± 6,5 ^b	0,2 ± 0,5	0,5 ± 0,5	2,2 ± 0,7

Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. ^aRepresenta diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ^bRepresenta diferença significativa em relação ao grupo tratado com PTX + CDDP ($p < 0,05$).

VR: global de leucócitos: $8,4 \pm 2,1$ cél/mm³ x 10³; linfócitos: $6,8 \pm 1,5$ cél/mm³ x 10³; neutrófilos: $1,5 \pm 1,0$ cél/mm³ x 10³.

Em relação aos parâmetros leucocitários apresentados na Tabela 14, observou-se que a administração da combinação dos fármacos livres afetou drasticamente a contagem global de leucócitos em relação aos VR, sendo esta alteração representada por leucopenia significativa. A redução no número de leucócitos totais para o grupo tratado com os fármacos livres pode ser explicada pela redução da contagem de neutrófilos, levando ao quadro de neutropenia (LEITE *et al.*, 2009). Esse quadro também foi encontrado no estudo de Maroni e colaboradores (2012), em que a administração de CDDP livre provocou supressão de granulócitos, sugerindo supressão hematopoiética, a qual é bem conhecida para CDDP. A contagem de leucócitos foi significativamente menor no grupo tratado com PTX + CDDP livre em comparação com o controle e com o grupo tratado com os SpHL-PTX + SpHL-CDDP ($p < 0,05$).

Observou-se também, um aumento na contagem global de leucócitos no grupo que recebeu a combinação dos fármacos encapsulados, provavelmente, devido ao aumento da contagem de neutrófilos. Isso pode ser explicado porque administração de SpHL-CDDP contribuiu para a melhoria da resposta imune de camundongos ocasionada devido à maior eficácia antitumoral associada à toxicidade inferior da medula óssea induzida pelo tratamento com SpHL-CDDP quando comparada com o tratamento com CDDP livre (MARONI *et al.*, 2012). Nenhuma diferença significativa

foi verificada para a contagem de linfócitos, basófilos, eosinófilos e monócitos ($p > 0,05$).

5.6.3 Investigação bioquímica

5.6.3.1 Investigação da toxicidade renal

Na Tabela 15 estão apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal.

Tabela 15 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal avaliados em camundongos BALB/c sete dias após a administração dos tratamentos

	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Índice Uréia/Creatinina
SpHL	32,3 ± 7,9	0,30 ± 0,06	105,4 ± 17,5
PTX + CDDP	40,0 ± 6,9	0,25 ± 0,03	160,5 ± 30,4 ^a
SpHL-PTX + SpHL-CDDP	30,4 ± 3,8 ^b	0,25 ± 0,03	122,1 ± 13,3 ^b

Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. ^aRepresenta diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). ^bRepresenta diferença significativa em relação ao grupo tratado com PTX + CDDP ($p < 0,05$).

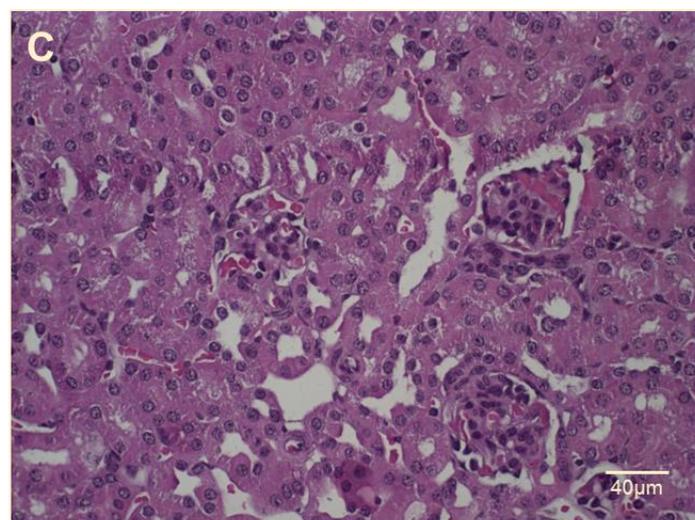
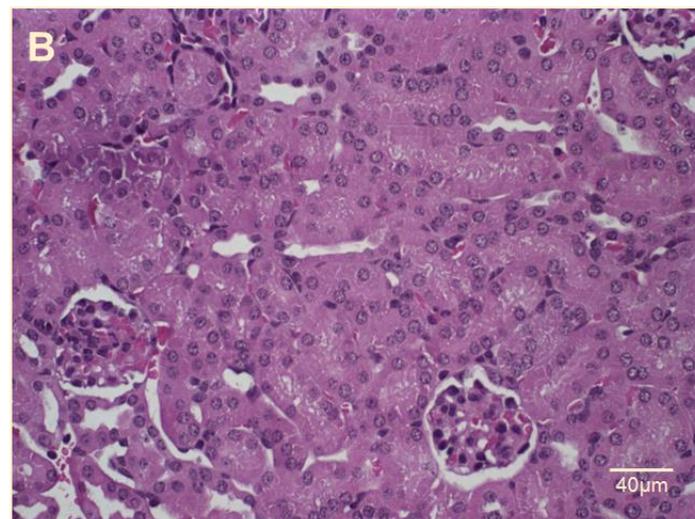
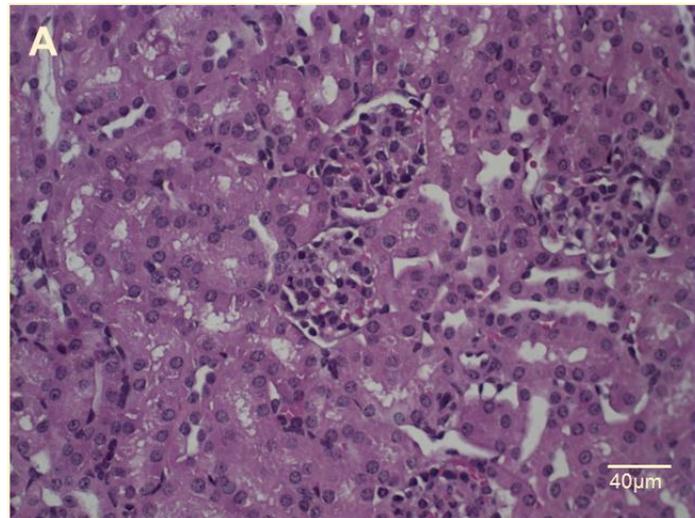
VR: ureia: 51 ± 7 mg/dL; creatinina: 0,32 ± 0,05 mg/dL.

Ao analisar a quantificação plasmática dos níveis de ureia deste estudo e comparar com o VR proposto por de Oliveira Silva (2018) fica evidente que todos os resultados se encontram dentro dos limites de normalidade. No entanto, é possível observar uma tendência de aumento nesses níveis, exclusivamente, para o grupo tratado com a combinação dos fármacos livres. Esse fato somado à diferença significativa encontrada para o tratamento com a combinação dos fármacos livres em relação aos encapsulados é um forte indicativo de lesão renal inicial. Talvez, se os tratamentos tivessem sido realizados por um período mais longo, seria possível observar uma lesão renal consolidada, uma vez que vários artigos demonstram a nefrotoxicidade relacionada ao uso de quimioterapia com CDDP (ASSAYAG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2014).

Outra observação importante é que não houve alteração nos níveis plasmáticos de creatinina. Esse fato pode ocorrer porque nos estágios iniciais de comprometimento renal, um mecanismo compensatório de secreção da creatinina pode ser ativado mantendo seus níveis plasmáticos dentro dos limites de normalidade. Nessas situações, a avaliação do índice ureia/creatinina pode ser um indicativo de toxicidade renal em estágio inicial (ASNA *et al.*, 2005; BUNEL *et al.*, 2017). Ao analisar os valores do índice ureia/creatinina para o tratamento contendo os fármacos livres e comparar com o grupo controle observa-se um aumento significativo ($p < 0,05$) nesse parâmetro. Esse achado somado ao aumento dos níveis de ureia sugere uma maior toxicidade renal quando os fármacos são administrados na forma livre comparado à administração na forma lipossomal. Esse fato pode ser explicado pela capacidade dos lipossomas em normalizar a perfusão renal e a taxa de filtração glomerular e, também, em modificar o perfil de biodistribuição dos fármacos, promovendo maior proteção para o tecido renal (LEITE *et al.*, 2012a).

Apesar dos parâmetros bioquímicos para a combinação dos fármacos livres terem indicado uma toxicidade renal em estágio inicial, não foram observadas alterações histológicas nesse tecido (FIGURA 19). Normalmente as alterações bioquímicas antecedem as alterações histológicas, principalmente no caso desse estudo em que foi administrada apenas uma dose de tratamento e o tempo de observação foi curto (DEVARAJAN *et al.*, 2004). É importante lembrar que a avaliação histopatológica foi realizada para os animais sobreviventes ao final do experimento, quando a reversibilidade da lesão renal pode ter ocorrido.

Figura 19 – Cortes histológicos representativos dos rins de camundongos fêmeas BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 400x



5.6.3.2 Investigação da toxicidade hepática

Na Tabela 16 estão apresentados os resultados dos parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática. Nenhuma alteração significativa foi observada para camundongos que receberam a administração de lipossomas em comparação com o grupo que recebeu o fármaco livre, indicando que, embora os lipossomas possam aumentar a captação dos fármacos pelo fígado, nenhum indicativo de toxicidade foi observado.

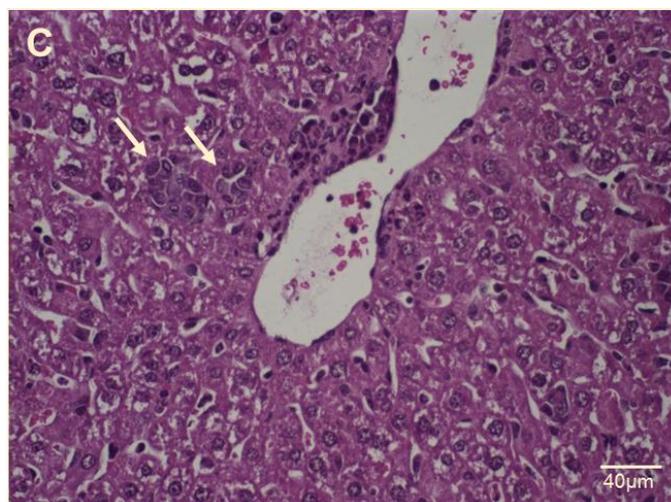
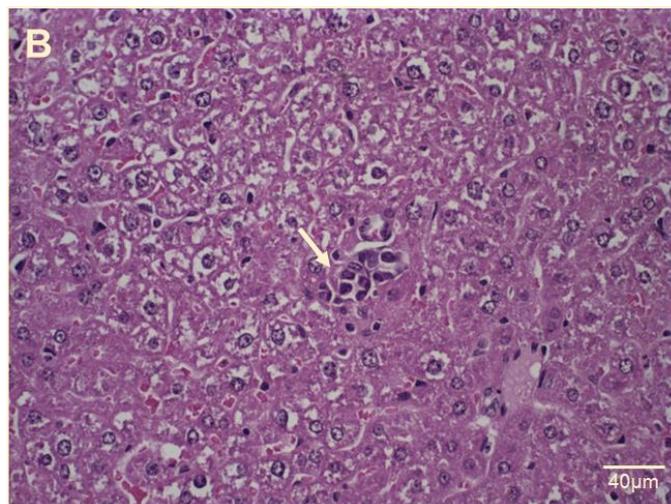
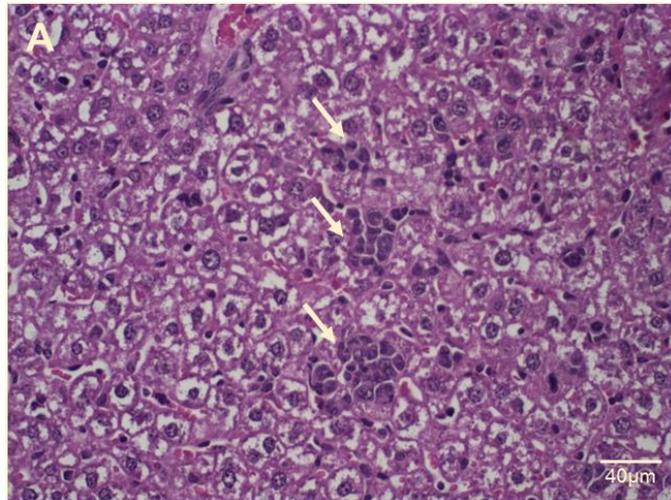
Tabela 16 - Parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade hepática avaliados em camundongos BALB/c sete dias após a administração dos tratamentos

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Gama GT (g/dL)
SpHL	110 ± 24	24,1 ± 2,0	2,4 ± 0,8
PTX + CDDP	97 ± 13	24,4 ± 3,5	0,9 ± 0,7
SpHL-PTX + SpHL-CDDP	101 ± 27	23,7 ± 4,1	1,75 ± 0,9

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. VR: AST: 167 ± 21 U/L; ALT: 57 ± 17 U/L.

No que se refere ao fígado, todos os animais que receberam SpHL apresentaram grande quantidade de megacariócitos e infiltrado inflamatório, além disso, havia leve degeneração nos hepatócitos e micrometástases multifocal, sem evidência de necrose, como pode ser observado na Figura 20. A administração de PTX + CDDP reduziu consideravelmente o número de infiltrados inflamatórios na região hepática. Pode-se correlacionar esse resultado com aqueles encontrados para os parâmetros leucocitários, reafirmando os dados da literatura de que o tratamento com esses quimioterápicos leva a neutropenia (MARONI et al., 2012; SIKOV, 2015). Para o grupo tratado com os SpHL-PTX + SpHL-CDDP, foram encontrados achados histológicos similares aqueles apresentados pelos animais do grupo SpHL, com ligeiro aumento na carga de infiltrado inflamatório (em conformidade com os parâmetros leucocitários).

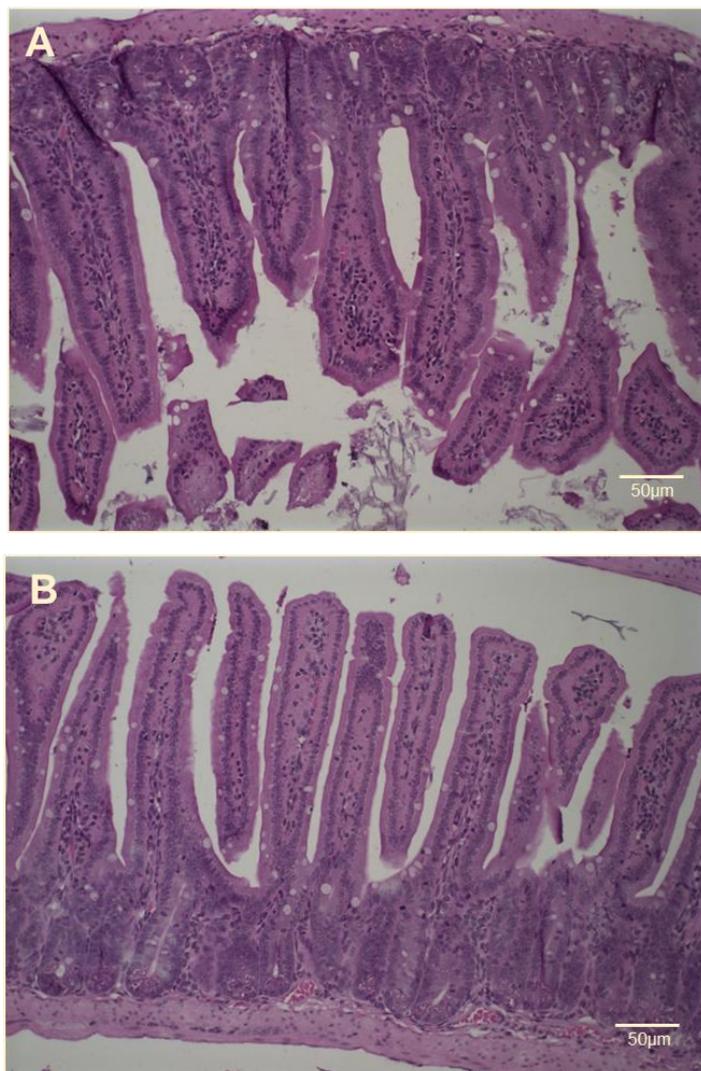
Figura 20 – Cortes histológicos de fígado de fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 400x. As setas pretas demonstram focos metastáticos de tumor de células 4T1

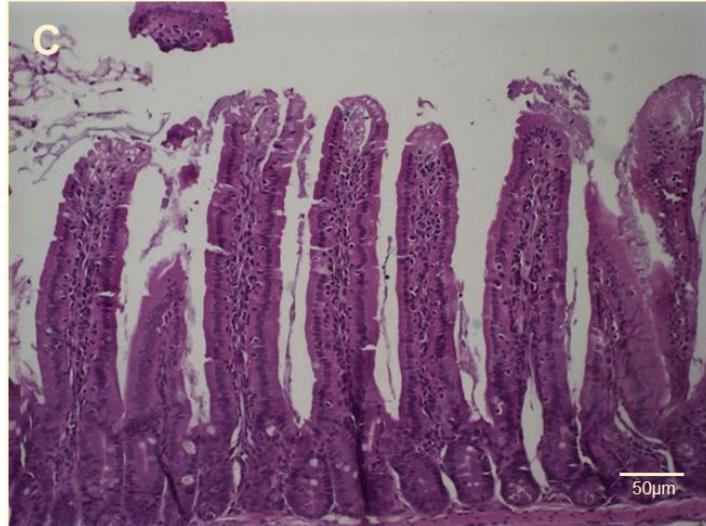


5.6.3.3 Investigação da toxicidade intestinal

Com relação ao intestino, não foram encontradas alterações histológicas sugestivas de toxicidade nesse órgão, conforme pode ser verificado na Figura 21. Esse dado divergente do encontrado por Carlesso e colaboradores (2016). Cabe ressaltar que este protocolo de tratamento apresentou doses seriadas de fármaco enquanto que para o presente trabalho realizou-se protocolo com dose única. Essa pode ser a razão da não observação de alterações histológicas nesse órgão.

Figura 21 – Cortes histológicos de intestino de fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 200x

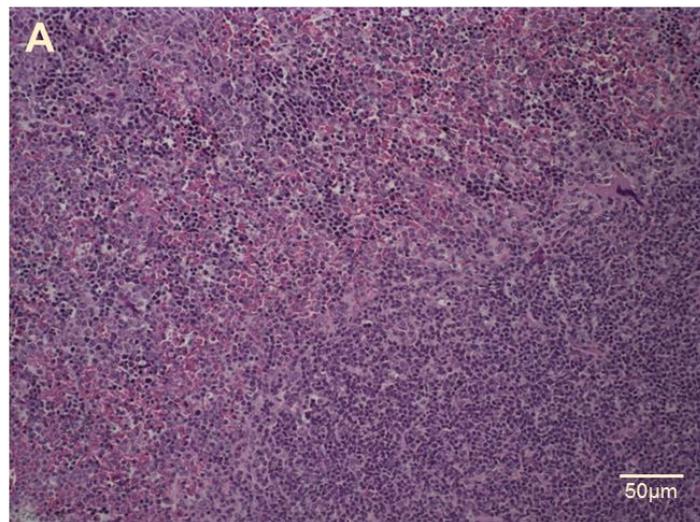


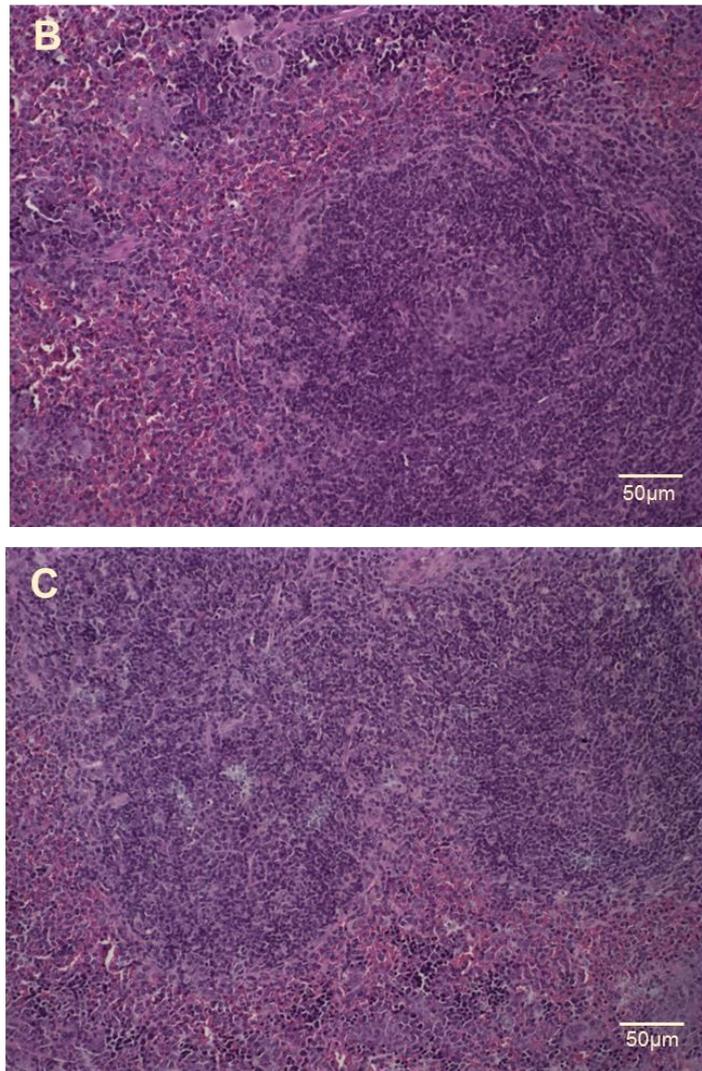


5.6.3.4 Investigação da toxicidade esplênica

A análise do baço revelou intenso acúmulo de infiltrado inflamatório para os três grupos de tratamento conforme apresentado na Figura 22.

Figura 22 – Cortes histológicas de baço de fêmeas de camundongos BALB/c inoculados com células 4T1 corados por Hematoxilina e Eosina. (A) SpHL (controle), (B) combinação PTX + CDDP livres e (C) combinação SpHL-PTX + SpHL-CDDP. Aumento de 200x





5.7 Considerações finais

É descrito na literatura que uma formulação lipossomal contendo antineoplásicos apresenta o potencial em reduzir a toxicidade e manter ou aumentar a atividade antitumoral desses fármacos (CAI, 2015). Os resultados encontrados nesse trabalho mostram que a combinação dos SpHL-PTX e SpHL-CDDP é uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de mama triplo negativo. No entanto, novos estudos com diferentes regimes de tratamento devem ser realizados para avaliar a real potencialidade desses sistemas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados nesse trabalho podemos fazer as seguintes conclusões:

A partir do estudo de reatividade entre os fármacos, foi comprovado que há compatibilidade quando CDDP e PTX são misturados, uma vez que não houve formação de precipitado ou mudança de cor.

Os SpHL-PTX e os SpHL-CDDP foram devidamente caracterizados química e físico-quimicamente ao apresentarem diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta adequados para administração intravenosa; os teores de encapsulação encontrados para as duas formulações permitiram a realização dos estudos *in vitro* e *in vivo*.

A avaliação da citotoxicidade mostrou que SpHL-PTX conseguiu inibir o crescimento tumoral nas duas linhagens TNBC mais eficazmente do que o fármaco livre. Já o SpHL-CDDP apresentou efeito semelhante na linhagem MDA-MB-231 quando comparado ao fármaco livre. A linhagem 4T1 apresentou maior sensibilidade à CDDP livre devido a uma característica intrínseca dessa linhagem frente a este fármaco. Os lipossomas brancos não exibiram citotoxicidade para nenhuma das linhagens testadas e os fibroblastos não tiveram redução de crescimento quando tratados com os fármacos livres ou encapsulados.

No estudo para avaliar a capacidade da combinação dos fármacos em produzir uma resposta sinérgica, foi demonstrado que o regime de tratamento coadministrando CDDP e PTX encapsulados em lipossomas pH-sensíveis na razão de 3:1 mostrou efeito sinérgico em células 4T1 enquanto que o tratamento coadministrando os fármacos livres mostrou resposta antagônica. Os tratamentos com os fármacos livres ou encapsulados, bem como a combinação sinérgica não apresentaram toxicidade significativa nos fibroblastos de gengiva humana.

O regime de tratamento coadministrando cisplatina e paclitaxel encapsulados em lipossomas pH-sensíveis foi capaz de controlar o crescimento tumoral de células 4T1

de forma mais eficientemente que os fármacos em sua forma livre ou dos lipossomas brancos.

Além disso, o emprego dos lipossomas propiciou redução da toxicidade dos fármacos evidenciada pela ausência de morte desses animais, ausência de neutropenia e plaquetopenia e ausência de toxicidade renal refletida na relação creatinina/ureia. Não foram encontradas alterações indicativas de toxicidade hepática para nenhum dos três grupos testados.

A redução da toxicidade desses lipossomas é acompanhada pelo ganho na atividade evidenciada pela maior área necrótica no corte histológico do tumor e ausência de metástases no pulmão as quais foram encontradas no grupo controle.

7 PERSPECTIVAS

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

- Proceder com estudos da cinética de liberação *in vitro* dos fármacos.
- Estudar as vias de morte induzidas pelo tratamento com CDDP + PTX e com SpHL-PTX + SpHL-CDDP.
- Estudar a biodistribuição dos tratamentos em camundongos portadores de tumor 4T1.
- Avaliar outros regimes de tratamento, com maior número de doses e durante maior tempo de observação.
- Propor a coencapsulação de PTX e CDDP em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL-PTX/CDDP) para estabelecer uma relação fixa entre os dois fármacos.
- Realizar a caracterização físico-química mais detalhada do SpHL-PTX/CDDP bem como determinar as características morfológicas.
- Avaliar a citotoxicidade, a atividade antitumoral e a toxicidade dos SpHL-PTX/CDDP.

REFERÊNCIAS

ABREU, E. de & KOIFMAN, S. Fatores Prognósticos no Câncer da Mama Feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, ed. 1, p. 113-131, 2002.

ACOG. American College of Obstetricians and Gynecologists. Breast Cancer Risk Assessment and Screening in Average-Risk Women. ACOG Practice Bulletin Nº 179. American College of Obstetricians and Gynecologists. **Obstetrics & Gynecology**, v.130:el-16, n. 1, 2017.

ACS. American Cancer Society. Disponível em: <http://www.cancer.org/>. Acesso em: 22/11/2017.

AL-LAZIKANI, B.; BANERJI, U. & WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature Biotechnology**. v. 30, n. 7, p. 679-692, 2012.

ALLEN, T. M. & CULLIS, P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36-48, 2013.

ALMEIDA, V. L. D. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, ed. 1, p. 118–129, 2005.

ANDERS, C. & CAREY, L. A. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*, v. 22, n. 11, p. 1233-1239, 2008.

ARAÚJO, J. G. *et al.* Biodistribution and antitumoral effect of long-circulating and pH-sensitive liposomal cisplatin administered in Ehrlich tumor-bearing mice. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 236, p. 808-815, 2011.

ARAÚJO, R. S. *et al.* Intestinal toxicity evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes loaded with cisplatin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, p. 142-151, 2017.

ARMSTRONG, D. K. *et al.* Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, p. 34-43, 2006.

ASSAYAG, M. *et al.* Renal failure during chemotherapy: renal biopsy for assessing subacute nephrotoxicity of pemetrexed. **BMC Cancer**, v. 17, 2017.

ASNA, N. *et al.* Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. **Life Sci.**, v. 76, p. 1825-1834, 2005.

Azonanotechnology article. The use of zeta potential measurements to study sterically stabilized liposomes using Malvern Instruments. Disponível em: <<http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1214>>. Acesso em: 23/12/2017.

BABA, A. I. & CĂTOI, C. Comparative oncology. in bucharest: **The publishing house of the romanian academy**; 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9557/>

BAE, Y. H. & PARK, K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. **Journal of Controlled Release**, v. 153, p. 198-205, 2011.

BAKRANIA, A. K.; VARIYA, B. C. & PATEL, S. S. Novel targets for paclitaxel nano formulations: Hopes and hypes in triple negative breast cancer. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 577-591, 2016.

BALAMURALIDHARA, V. *et al.* pH sensitive drug delivery systems: A review. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 1, p. 24-48, 2011.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M. & WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238-252, 1965.

BARBOSA, M. V. *et al.* Experimental design of a liposomal lipid system: A potential strategy for paclitaxel-based breast cancer treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 553-561, 2015.

BARBOSA, M. V. *et al.* Comparative study of first-derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods for quantification of paclitaxel in liposomal formulation. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 26, n. 7, 1338-1343, 2015a.

BERNABEU, E. *et al.* Paclitaxel: What has been done and the challenges remain ahead. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, ed. 1-2, p. 474-495, 2017.

BOISSENOT, T. *et al.* Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 241, p. 144-163, 2016.

BOSSI, P. *et al.* A randomized, phase 2 study of cetuximab plus cisplatin with or without paclitaxel for the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 11, p. 2820-2826, 2017.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia – Portaria nº 1.008, de 30 de setembro de 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 49 f. il, 2015.

BRASILEIRO-FILHO, G., GUIMARÃES, R., e BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: Brasileiro-Filho, G, editor. Bogliolo Patologia Geral. 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 148–192, 2016.

BRENES, O. *et al.* Characterization of cell death events induced by anti-neoplastic drugs cisplatin, paclitaxel and 5-fluorouracil on human hepatoma cell lines: Possible mechanisms of cell resistance. **Biomed Pharmacother.**, v. 61, n. 6, p. 347-355, 2007.

BRUFISKY, A. M. Long-term management of patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: concepts for sequential and combination endocrine-based therapies. **Cancer Treatment Reviews**, v. 59, p. 22-32, 2017.

BUNEL, V. *et al.* Early detection of acute cisplatin nephrotoxicity: interest of urinary monitoring of proximal tubular biomarkers. **Clin. Kidney Journal**, v. 10, n. 5, p. 639-647, 2017.

CAI, L. *et al.* Telodendrimer nanocarrier for co-delivery of paclitaxel and cisplatin: A synergistic combination nanotherapy for ovarian cancer treatment. **Biomaterials**, v. 37, p. 456-468, 2015.

CANCER RESEARCH UK (2017). Verbete procurado: câncer. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/what-is-cancer/cells/what-cancer-is>> Acesso em 21/11/2017

CARDOSO, F. *et al.* ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2). **The Breast**, v 23, p. 489-502, 2014.

CARLESSO, F. N. *et al.* Preliminary data of the antipancreatic tumor efficacy and toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin. **Nuclear Medicine Communications**, v. 37, p. 727-734, 2016.

CARVALHO-JÚNIOR, A. D. *et al.* Preparation and cytotoxicity of cisplatin loaded liposomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, n. 8, p. 1149-1157, 2007.

CARVALHO-JÚNIOR, A. D. *et al.* Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in Ehrlich tumor-bearing mice. **Life Sci.**, v. 80, p. 659-664, 2007a.

CHENG, Q. & LUI, Y. Multifunctional platinum-based nanoparticles for biomedical applications. **WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.**, 2016.

CHO, K. *et al.* Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008.

CHOU, TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 623-681, 2006.

CHOU, TC. & TALALAY, P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. **European Journal of Biochemistry**. v. 115, n. 1, p. 207-216, 1981.

CHOU, TC. & TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Cell Press**. v. 4, p. 450-454, 1983.

CHOU, TC & TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**. v. 22, p. 27-55, 1984.

CIRQUEIRA, M. B. *et al.* Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**. v. 39, n. 10, p. 499-503, 2011.

COHEN, S. M. *et al.* Subcutaneous delivery of nanoconjugated doxorubicin and cisplatin for locally advanced breast cancer demonstrates improved efficacy and decreased toxicity at lower doses than standard systemic combination therapy in vivo. **The American Journal of Surgery**, v. 202, p. 646-653, 2011.

COLBY, A. H. *et al.* Nanoparticle drug-delivery systems for peritoneal cancers: a case study of the design, characterization and development of the expansile nanoparticle. **WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.**, v. 9, n. 3, p. 1-20, 2017.

COUVREUR, P & VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharm Res* 23: 1417-1450, 2006.

CUELLO, M. *et al.* Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells. **Gynecol. Oncol.**, v. 81, n. 3, p. 380-390, 2001.

DAWOOD, S. Triple-negative breast cancer: epidemiology and management options. *Drugs*, v. 70, n. 17, p. 2247-2248, 2010.

DE OLIVEIRA SILVA *et al.* Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 352, p. 162-169, 2018.

DEVARAJAN, P. *et al.* Low renal toxicity of Lipoplatin compared to cisplatin in animals. **Anticancer Res.**, v. 24, p. 2193-2200, 2004.

DESHPANDE, P. P; BISWAS, S. & TORCHILIN, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. **Nanomedicine (London)**, v. 8, n. 9, p. 1509-1528, 2013.

DUKE UNIVERSITY. Study of Abraxane® and carboplatin as first-line treatment for triple negative metastatic breast cancer. Disponível em: clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01207102. Acesso em: 17/03/2018

EGGER, S. J. *et al.* Platinum-containing regimens for metastatic breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 6. Art. No.: CD003374, 2017.

ESTEBAN-FERNÁNDEZ, D. *et al.* Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs. **Metallomics**, v. 2, p. 19-38, 2010.

FAR EASTERN MEMORIAL HOSPITAL. An effective and compliance regimen of paclitaxel plus cisplatin to treat metastatic breast cancer. Disponível em: clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00270569. Acesso em: 17/03/2018.

FATTAL, E.; COUVREUR, P. & DUBERNET, C. “Smart” delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 23, p. 931-946, 2004.

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

FLOREA, A.M. & BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug Resistance and induced side effects. **Cancers**; v. 3 n.1, p. 1351-1371, 2011.

FOUAD, Y. A. & AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017.

FRANCO, M. S. & OLIVEIRA, M. C. Ratiometric drug delivery using non-liposomal nanocarriers as an approach to increase efficacy and safety of combination chemotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 584-595, 2017.

FRANCO, M. S.; ROQUE, M. C. & OLIVEIRA, M. C. Active targeting of breast cancer cells using nanocarriers. **Modern Applications in Pharmacy & Pharmacology**, p. 1-4, 2017.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, p.1869-1883, 2012.

GANNON, L. M.; COTTER, M. B. & QUINN, C. M. The classification of invasive carcinoma of the breast. *Expert Reviews of Anticancer Therapy*, v. 13, n. 8, p. 941-954, 2013.

GAO, J. J. & SWAIN, S. M. Luminal A breast cancer and molecular assay: a review. **The Oncologist**, v. 23, p. 1-10, 2018.

GARCES, A. H. I. *et al.* Carboplatina e paclitaxel em primeira linha paliativa no tratamento de câncer de colo uterino avançado ou persistente/recorrente: análise de

uma série de casos do Instituto Nacional de Câncer do Brasil. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 9, n. 31, p. 18-24, 2013.

GI-SU O. *et al.* Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. **Electrolyte Blood Press.** v. 2, p. 55-65, 2014.

GRECO, F. & VICENT, M. J. Combination therapy: opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1203-1213, 2009.

Guia de Protocolos e Medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia 2013. Editores: Miguel Cendoroglo Neto, Nelson Hamerschlak, Andreza Alice Feitosa Ribeiro, Rafael Aliosha Kaliks Guendelmann, Valéria Armentano dos Santos. São Paulo, Hospital Albert Einstein, 516 páginas, 2013.

HANG, Z; COOPER, M. A. & ZIORA, Z. M. Platinum-based anticancer drugs encapsulated liposome and polymeric micelle formulation in clinical trials. **Biochemical Compound**, v. 4, article 2, 2016.

HE, Z. *et al.* Hemocompatibility of folic-acid-conjugated amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles for co-delivery of cisplatin and paclitaxel: treatment effects for non-small-cell lung cancer. **Tumour Biol.**, v. 37, n. 6, p. 7809-7821, 2016.

HE, K & TANG, M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. **Chemico-Biological Interactions**, 2017.

HIRAI, M. *et al.* Novel and simple loading procedure of cisplatin into liposomes and targeting tumor endothelial cells. **International Journal of Pharm.**, v. 391, p. 274-283, 2010.

HO, B. N.; PFEFFER, C. M. & SINGH, A. T. K. Update on nanotechnology-based drug delivery systems in cancer treatment. **Anticancer Research**, v. 37, p. 5975-5981, 2017.

HUANG, L. *et al.* Cisplatin versus carboplatin in combination with paclitaxel as neoadjuvant regimen for triple negative breast cancer. **Onco Targets and Therapy**, v. 10, p. 5739-5744, 2017.

IARC. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2008. Autores: Boyle, P. & Levin, B. IARC press, p. 510. Lyon, 2008. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/> Acesso em: 21/11/2017.

IMAI, S. *et al.* Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5947, 2017.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. (Brasil) 2015. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee> Acesso em 21/11/2017.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. (Brasil). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>> Acesso em 17/03/2018.

ISHIDA, S. *et al.* Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. **Cancer Cell.**, v. 17, n. 6, p. 574–583, 2010

IURLARO, R.; LEÓN-ANNICCHIARICO, C. L. & MUÑOZ-PINEDO, C. Regulation of Cancer Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors. **Methods in Enzymology**, v. 542, p. 59-80, 2014.

JOHNSTONE, T. C.; PARK, G. Y. & LIPPARD, S. J. Understanding and improving platinum anticancer drugs – Phenanthriplatin. **Anticancer research**, v. 34, n. 1, p. 471-476, 2014.

JORDAN, M. A. e WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews: Cancer**, v. 4, p. 253-265, 2004.

JUDSON, P. L. *et al.* Cisplatin inhibits paclitaxel-induced apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines: Possible explanation for failure of combination therapy. **Cancer Research**, v. 59, p. 2425-2432, 1999.

KARASAWA, T. & STEYGER, P. S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicol Lett.**, v. 237, n. 3, p. 219-227, 2015.

KENEMANS, P; VERSTRAETEN, R. A. & VERHEIJEN, R. H. M. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas**, v. 49, p. 34-43, 2004.

KHOSRAVI-SHAHI, P.; CABEZÓN-GUTIÉRREZ, L. & CUSTODIO-CABELLO, S. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies. **Asia-Pac J Clin Oncol**, p. 1-8, 2017.

KIELER-FERGUSON, H. M. *et al.* Encapsulation, controlled release, and efficacy of cisplatin delivered in liposomes composed of sterol-modified phospholipid. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, p. 85-93, 2017.

KOUDELKA, S. & TURÁNEK, J. Liposomal paclitaxel formulations. **J. Control Release**, v. 163, n. 3, p. 322-334, 2012.

KWOK, J. M. M. *et al.* FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells. **Mol. Cancer Res.**, v. 8, n. 1, p. 24-34, 2010

LEITE, E. A. *et al.* Acute toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin in mice after intraperitoneal administration. **Life Sciences**, v. 84, p. 641-649, 2009.

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

LEITE, E. A. *et al.* Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating an pH-sensitive liposomes administered in mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 1-11, 2012a.

LI, Q. *et al.* The effect of lipocisplatin on cisplatin efficacy and nephrotoxicity in malignant breast cancer treatment. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6462-6472, 2014.

LIN, W. *et al.* Protein kinase C inhibitor chelerythrine selectively inhibits proliferation of triple-negative breast cancer cells. **Scientific Reports** v. 7, n. 2022, 2017.

LIU, Y. *et al.* Codelivery of doxorubicin and paclitaxel by cross-linked multilamellar liposome enables synergistic antitumor activity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, p.1651–1661, 2014.

LIU, B. *et al.* Co-delivery of paclitaxel and TOS-cisplatin via TAT-targeted solid lipid nanoparticles with synergistic antitumor activity against cervical cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 955-968, 2017.

LOCATELLI, M. A.; CURIGLIANO, G. & ENIU, A. Extended adjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Breast Care**, v. 12, p. 152-158, 2017.

LODI, M. *et al.* Breast cancer in elderly women and altered clinico-pathological characteristics: a systematic review. **Breast Cancer Res. Treat.**, 2017.

LUCANUS, A. J. & YIP, G. W. Kinesin superfamily: roles in breast cancer, patient prognosis and therapeutics. *Oncogene*. v. 37, p. 833-838, 2018.

LUCANTONI, F. *et al.* Systems modeling accurately predicts responses to genotoxic agents and their synergism with BCL-2 inhibitors in triple negative breast cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 1-13, 2018.

MA, Y. *et al.* Combinational delivery of hydrophobic and hydrophilic anticancer drugs in single nanoemulsions to treat MDR in cancer. **Mol. Pharm.**, v. 11, n. 8, p. 2623-2630, 2014.

MAEDA, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: Background and future prospects. **Bioconjugate Chem.**, v. 21, p. 797-802, 2010.

MARANHÃO, R. C. *et al.* Clinical experience with drug delivery systems as tools to decrease the toxicity of anticancer chemotherapeutic agents. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 14, n. 10, p. 1217-1226, 2017.

MARONI, L. de C. *et al.* Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 974-984, 2012.

MARZO, T. *et al.* cis-Pt I₂(NH₃)₂: a reappraisal. The Royal Society of Chemistry, **Dalton Transactions**, 2015.

MEEL, R. van der *et al.* Extracellular vesicles as drug delivery systems: Lessons from the liposome field. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 195, p. 72-85, 2014.

MILROSS, C. G. *et al.* Sequence-dependent antitumor activity of paclitaxel (taxol) and cisplatin *in vivo*. **Int. J. Cancer**, v. 62, p. 599-604, 1995.

MONTEIRO, N. *et al.* Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 101, p. 1-24, 2014.

MONTEIRO, L. O. F. *et al.* Phase behavior of dioleylphosphatidylethanolamine molecules in the presence of components of pH-sensitive liposomes and paclitaxel. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 144, p. 276-283, 2016.

MONTEIRO, L. O. F. *et al.* Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: a biodistribution study. **Biomed. Pharmacother.**, v. 97, p. 489-495, 2018.

MUKHTAR, E.; ADHAMI, V. M. & HUKHTAR, H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. **Mol. Cancer Ther**, v. 13, n. 2, p. 275-284, 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Paclitaxel with or without carboplatin in treating women with metastatic breast cancer. Disponível em: clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00025688. Acesso em: 17/03/2018.

NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY HOSPITAL. Paclitaxel (Phyxol) and cisplatin as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer. Disponível em: clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00154882. Acesso em: 17/03/2018.

NIH. U. S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home> Acesso em: 15/09/2018.

NEJDL, L. *et al.* Platinum nanoparticles induce damage to DNA and inhibit DNA replication. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 2017.

NUSSBAUMER, S. *et al.* Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, p. 2265-2289, 2011.

OLIVEIRA, M. C. de *et al.* 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**, v. 1372, p. 301-310, 1998.

OZKOK, A. & EDELSTEIN, C. L. Physiopathology of cisplatin-induced acute kidney injury. **Biomed Research Int.**, v. 2014, 17 pages, 2014.

PABLA, N. *et al.* ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 10, p. 6572-6583, 2008.

PARAKH, S. *et al.* Evolution of anti-HER2 therapies for cancer treatment. **Cancer Treatment Reviews**. Disponível em: doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.06.005>, 2017.

PARK, J.; MORLEY, T. S. & SCHERER, P. E. Inhibition of endotrophin, a cleavage product of collagen VI, confers cisplatin sensitivity to tumours. **EMBO Mol. Med.**, v. 5, p. 935-948, 2013.

PÉREZ-HERRERO, E. & FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 95, p. 52-79, 2015.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** v. 406: p. 747-752, 2000.

PETERSEN, G. H. *et al.* Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. **Journal of Controlled Release**, v. 232, p. 255-264, 2016.

PULASKI, B. A. & OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Curr. Protoc. Immunol.**, capítulo 20, unidade 20.2, 2001.

RENI, M. *et al.* Phase 1B trial of Nab-paclitaxel plus gemcitabine, capecitabine, and cisplatin (PAXG regimen) in patients with unresectable or borderline resectable pancreatic adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 3, p. 290-296, 2016.

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

ROSENBERG B. *et al.* Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385, 1969.

ROWINSKY, E. K. *et al.* Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. **J. Clin. Oncol.**, v. 9, n. 9, p. 1692-1703, 1991.

ROWINSKY, E. K. *et al.* Sequence-dependent cytotoxic effects due to combinations of cisplatin and the antimicrotubule agents taxol and vincristine. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 119, n. 12, p. 727-733, 1993.

SARAIVA, D. P. *et al.* How many diseases is triple negative breast cancer: the protagonism of the immune microenvironment. **ESMO Open**, v. 2, n. 4, 2017.

SAWADA, S. *et al.* Combination chemotherapy of paclitaxel and cisplatin induces apoptosis with Bcl-2 phosphorylation in a cisplatin-resistant human epidermoid carcinoma cell line. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 51, n. 6, p. 505-511, 2003.

SBOC. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA –SBOC. Manual de Condutas 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica**, 592 páginas, 2011.

SERCOMBE, L. *et al.* Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, 2015.

SIBAUD, V. *et al.* Dermatological adverse events with taxane chemotherapy. **European Journal of Dermatology**, v. 26, p. 427-443, 2016.

SIKOV, W. M. Assessing the role of platinum agents in aggressive breast cancer. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 17, n. 3, 2015.

SKLADANOWSKI, A. *et al.* Dual inhibition of PI3K/Akt signaling and the DNA damage checkpoint in p53-deficient cells with strong survival signaling: implications for cancer therapy. **Cell Cycle**. v. 6, n. 18, p. 2268-2275, 2007.

STAGE, T. B.; BERGMANN, T. K. & KROETZ, D. L. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel monotherapy: An updated literature review. **Clin Pharmacokinet**, v. 57, n. 1, p. 7-19, 2017.

STATHOPOULOS, G. P. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. **Anticancer Drugs**, v. 21, p. 732-736, 2010.

SONG, S. J. *et al.* Incidence of taxane-induced peripheral neuropathy receiving treatment and prescription patterns in patients with breast cancer. **Support Care Cancer**, n. 25, v. 7, p. 2241-2248, 2017.

SORLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 10869-10874, 2001.

SORLIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 8418-8423, 2003.

STRAS, S. *et al.* Interstitial release of cisplatin from triggerable liposomes enhances efficacy against triple negative breast cancer solid tumor analogues. ACS Publications. **Molecular Pharmaceutics**, 2016.

SUN, S. *et al.* Cisplatin improves antitumor activity of weekly nab-paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1443-1452, 2014.

SUNTHARALINGAM, M. *et al.* Effect of the addition of cetuximab to paclitaxel, cisplatin, and radiation therapy for patients with esophageal cancer: The NRG oncology RTOG 0436 phase 3 randomized clinical trial. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 11, p. 1520-1528, 2017.

TARTARI, F. *et al.* Healthcare cost of HER2-positive and negative breast tumors in the United States (2012-2035). **Cancer Treatment Reviews** v. 60, p. 12-17, 2017.

THOMAS, C. G. *et al.* Estrogen receptor beta decreases survival of p53-defective cancer cells after DNA damage by impairing G2/M checkpoint signaling. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 127, p. 417-427, 2011.

TIJE, A. J. ten *et al.* Pharmacological effects of formulation vehicles. **Clin. Pharmacokinet**, v. 42, n. 7, p. 665-685, 2003.

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

VIEIRA, F. P. *et al.* ET AAS evaluation of the stability and pH-sensitivity of, pH-sensitive stealth liposomes containing cisplatin in mouse plasma. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 84, p. 135-139, 2013.

VODUC, K. D. *et al.* Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, 2010.

VUONG, D. *et al.* Molecular classification of breast cancer. **Virchows Arch.**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2014.

WANG, D. & LIPPARD, S. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews – Drug Discovery**, v. 4, p. 307-320, 2005.

WOODCOCK, J. *et al.* Development of novel combination therapies. **New Engl. J. Med.**, n. 364, v. 11, p. 985-987, 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency of Research on Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> Acesso em 21/11/2017

YANG, J.; JU, Z. & DONG, S. Cisplatin and paclitaxel co-delivered by folate-decorated lipid carriers for the treatment of head and neck cancer. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 792-799, 2017.

YIN, J. *et al.* pH-Sensitive nano-complexes overcome drug resistance and inhibit metastasis of breast cancer by silencing Akt expression. **Theranostics**, v. 7, n. 17, p. 4204-4216, 2017.

YU, X. *et al.* Modulation of chemoresponsiveness to platinum-based agents by microRNAs in cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 9, p. 1769-1778, 2017.

YUAN, Z. *et al.* The p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) chemosensitizes intrinsically resistant ovarian cancer cells to cisplatin by lowering the threshold set by Bcl-xl and Mcl-1. **Mol. Med.**, v. 17, n. 11-12, p. 1262–1274, 2011.

ZHANG, W. *et al.* Prodrug-based nano-drug delivery system for co-encapsulate paclitaxel and carboplatin for lung cancer treatment. **Drug Delivery**, v. 23, n. 7, p. 2575-2580, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Co-delivery of carboplatin and paclitaxel via cross-linked multilamellar liposomes for ovarian cancer treatment. **RSC Adv.**, v. 7, n. 32, p. 19685-19693, 2017.

ZHENG, H.C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p. 59950-59964, 2017.

ZHOU, L. *et al.* Weekly paclitaxel and cisplatin as neoadjuvant chemotherapy with locally advanced breast cancer: a prospective, single arm, phase II study. **Oncotarget**, v. 8, n. 45, p. 79305-79314, 2017.

ZHU, X. & JOY, A. A. Targeting HER2 in advanced breast cancer. In: **Zhixiang Wang** (ed), ErbB Receptor Signaling: methods and protocols, methods in molecular biology, v. 1652, capítulo 4, 2017.

ZISMAN, N. *et al.* Optimizing liposomal cisplatin efficacy through membrane composition manipulations. **Chemoth. Res. Pract.**, n. 2011, p. 1-7, 2011.

ZONG, Y.; WU, J. & SHEN, K. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**. v. 8, n. 10, p. 17360-17372, 2017.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA EM SERES HUMANOS (CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 062

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

APROVADO

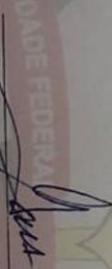
PROCESSO: 021/09 FR- 240440

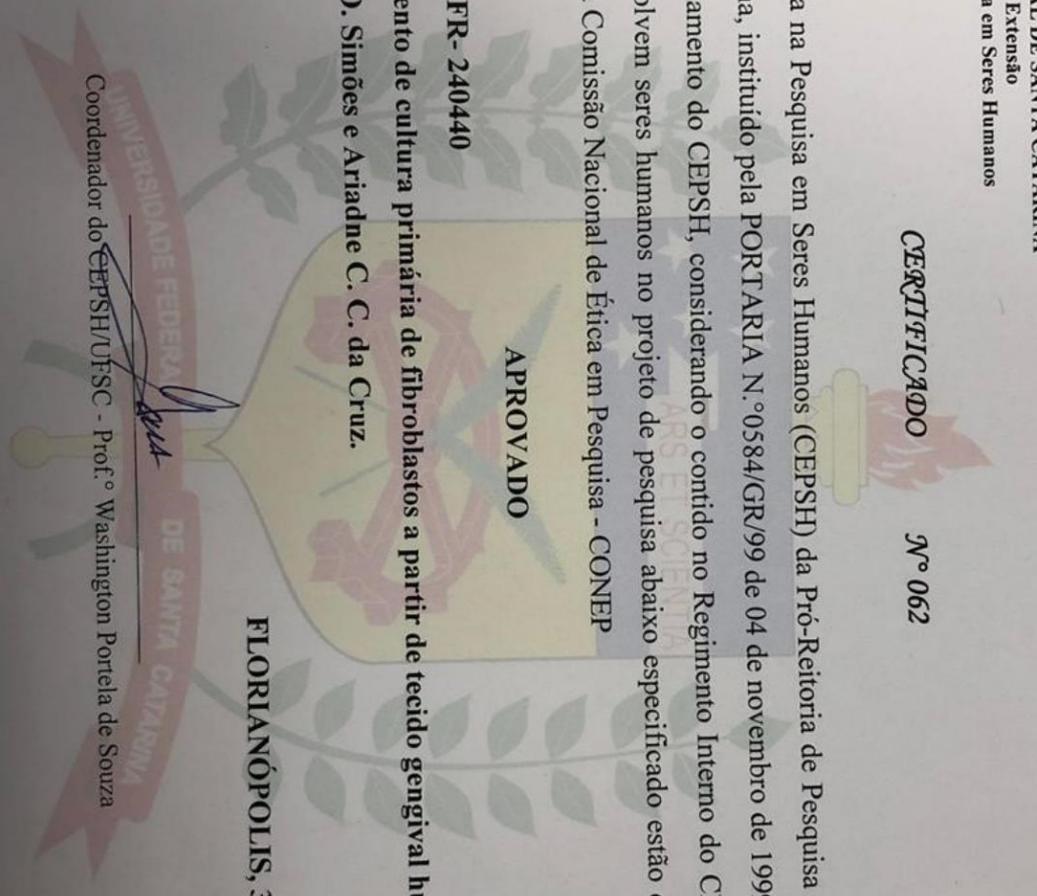
TÍTULO: Estabelecimento de cultura primária de fibroblastos a partir de tecido gengival humano.

AUTOR: Cláudia M. O. Simões e Ariadne C. C. da Cruz.

DPTO.: CCS/UFSC

FLORIANÓPOLIS, 30 de março de 2009.


Coordenador do CEPSH/UFSC - Prof.º Washington Portela de Souza



ANEXO B – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 75 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Desenvolvimento de lipossomas multifuncionalizados como estratégia para a encapsulação de fármacos antineoplásicos”, que tem como responsável André Luís Branco de Barros, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 24/05/2016. Este certificado expira-se em 24/05/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 75 / 2014, related to the Project entitled “Development of multi-fuctionalized liposomes as strategy to encapsulate anticancer drugs”, under the supervision of André Luís Branco de Barros, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 24/05/2016. This certificates expires in 24/05/2021.

Cleuza Maria de Faria Rezende
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG
 Belo Horizonte, 24/05/2016.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br