

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Jaqueline Aparecida Duarte

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE SINVASTATINA EM LIPOSSOMAS pH-  
SENSÍVEIS DE DOXORRUBICINA NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER DE MAMA  
EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte  
2022

Jaqueline Aparecida Duarte

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE SINVASTATINA EM LIPOSSOMAS pH-  
SENSÍVEIS DE DOXORRUBICINA NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER DE MAMA  
EXPERIMENTAL**

Tese 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 Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Amaral Leite

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Belo Horizonte

2022

Duarte, Jaqueline Aparecida.

D812e      Estudo da associação de sinvastatina em lipossomas pH-sensíveis de doxorubicina na terapêutica do câncer de mama experimental [recurso eletrônico] / Jaqueline Aparecida Duarte. – 2022.  
1 recurso eletrônico (133 f. : il.) : pdf

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

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Câncer de mama – Teses. 2. Lipossomos – Teses. 3. Agentes antineoplásicos – Teses. 4. Toxicidade – Testes – Teses. I. Leite, Elaine Amaral. II. Barros, André Luís Branco de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.99449

Elaborado por Leandro da Conceição Borges – CRB-6/3448



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

*“ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE SINVASTATINA EM LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE DOXORRUBICINA NA TERAPÊUTICA DO CÂNCER DE MAMA EXPERIMENTAL”*

JAQUELINE APARECIDA DUARTE

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

Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Profa. Dra. Cristiane dos Santos Giuberti  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Prof. Dr. Ênio Ferreira  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

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

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

Belo Horizonte, 25 de novembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Branco de Barros, Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2022, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em Folha de Aprovação FARMACIA-SECCPGCA 1912896 SEI 23072.268682/2022-21 / pg. 1



25/11/2022, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane dos Santos Giuberti, Usuário Externo**, em 25/11/2022, às 17:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Izabella Thais da Silva, Usuário Externo**, em 25/11/2022, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elaine Amaral Leite, Professora do Magistério Superior**, em 25/11/2022, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior**, em 26/11/2022, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1912896** e o código CRC **505ABEA9**.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Ademar e Consolação, por todo  
amor e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre iluminar os meus caminhos e por me amparar e proteger em todos os momentos.

Aos meus pais, Ademar e Consolação, por todo amor e dedicação. Sou infinitamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim. Por nunca medirem esforços e por sempre me incentivarem nos estudos. Obrigada por toda cumplicidade, carinho, suporte e orações.

À professora Elaine, minha orientadora a mais de seis anos, por tantos ensinamentos. Pelo exemplo de profissional competente, generosa e ética. Pela paciência, amizade e por estar sempre disposta a ajudar. Sou grata por todos conhecimentos compartilhados e por todas oportunidades oferecidas.

Ao professor André, pelas contribuições sempre relevantes e pelo apoio indispensável na condução do trabalho.

Ao professor Geovanni pela colaboração e disponibilidade.

À Eliza pela colaboração, apoio e amizade.

Aos professores e colegas do LTF, pela boa convivência, desde a minha iniciação científica. Pela troca de experiências e pelos momentos compartilhados.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia, em especial Adelaide, Batista, Nazaré e Marton, pela gentileza e prontidão para ajudar.

À CAPES, FAPEMIG, e CNPq, pela bolsa e apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional ao longo desses anos. Muito obrigada!

## RESUMO

A doxorubicina (DOX) é um potente quimioterápico utilizado como primeira linha no tratamento do câncer de mama; entretanto, a cardiotoxicidade é a principal desvantagem da terapia. Estudos pré-clínicos evidenciaram que a associação de simvastatina (SIM) com DOX diminuiu esse efeito colateral e as mortes por câncer de mama. Neste trabalho, uma formulação lipossomal pH-sensível, sem precedentes, capaz de coencapsular DOX e SIM em diferentes razões molares, foi investigada para seu potencial tratamento de tumores de mama. Foram realizados estudos de caracterização físico-química das formulações lipossomais. Os efeitos citotóxicos de DOX e SIM e suas combinações em diferentes razões molares (1:1; 1:2 e 2:1), livres ou coencapsulados em lipossomas pH-sensíveis foram avaliados frente à linhagens celulares de câncer de mama humano (MDA-MB-231; MCF-7 e SK-BR-3) e murino (4T1). Os protocolos experimentais incluíram viabilidade celular, índice de combinação, alterações morfológicas nucleares e capacidade de migração. Também foi investigada a atividade antitumoral da formulação SpHL-D-S 1:1, em camundongos BALB/c com tumor de mama 4T1, e comparada aos tratamentos DOX e SIM livres e encapsulados em lipossomas, bem como a mistura de DOX:SIM na razão molar de 1:1. As formulações apresentaram diâmetro inferior a 200 nm com índice de polidispersidade inferior a 0,3. O teor de encapsulação obtido foi próximo a 100% e cerca de 70% para DOX e SIM, respectivamente. Nos estudos *in vitro*, um efeito inibitório mais pronunciado nas linhagens celulares de câncer de mama foi observado para os tratamentos na razão molar DOX/SIM 2:1, com os fármacos isolados ou em lipossomas para as linhagens de cancer de mama humano e na razão 1:1 para a linhagem murina. Nos estudos em modelo animal BALB/c com tumor de mama da linhagem 4T1, as maiores taxas de inibição tumoral foram observadas para os tratamentos com SpHL-D-S, SpHL-D e DOX:SIM em relação ao controle. A grande vantagem do tratamento com SpHL-D-S foi a melhora do perfil de toxicidade cardíaca. Enquanto uma grande vacuolização foi observada no coração de todos os animais tratados com DOX, menor toxicidade cardíaca foi observado para os animais tratados com o SpHL-D-S. Os resultados demonstraram uma potencialização dos efeitos da DOX e SIM para o tratamento antitumoral.



Palavras-chave: câncer de mama; lipossomas pH-sensíveis; coencapsulação; doxorrubicina; sinvastatina.

## ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is a potent chemotherapeutic drug used as the first line in breast cancer treatment; however, cardiotoxicity is the main drawback of the therapy. Preclinical studies evidenced that the association of simvastatin (SIM) with DOX decreases this side effect and deaths from breast cancer. In this work, an unprecedented pH-sensitive liposomal formulation capable of co-encapsulating DOX and SIM at different molar ratios was investigated for its potential breast tumor treatment. Studies of physicochemical characterization of the liposomal formulations were carried out. The cytotoxic effects of DOX and SIM and their combinations at different molar ratios (1:1; 1:2 and 2:1), free or co-encapsulated in pH sensitive liposomes, were evaluated against three human breast cancer cell lines (MDA-MB-231; MCF-7 and SK-BR-3) and murine (4T1). Experimental protocols included cell viability, combination index, nuclear morphological changes, and migration capacity. The anti-tumor activity of the SpHL-D-S 1:1 formulation was also investigated in Balb/c mice with 4T1 breast tumor, and compared to the treatments DOX and SIM free and encapsulated in liposomes, as well as the mixture of DOX:SIM in the molar ratio of 1:1. The formulations showed diameter of less than 200 nm with a polydispersity index lower than 0.3. The encapsulation content close to 100% and about 70% for DOX and SIM, respectively. A more pronounced inhibitory effect on breast cancer cell lines was observed for the 2:1 treatments with isolated drugs or in liposomes and 1:1 for the murine. The highest rate of tumor inhibition was observed for treatments with SpHL-D-S, SpHL-D and DOX:SIM in relation to the control. The great advantage of treatment with SpHL-D-S was the improvement in the cardiac toxicity profile. While greater vacuolization was observed in the hearts of all DOX-treated animals, less cardiac toxicity was observed for the SpHL-D-S treated animals. Thus, SpHL-D-S allows the co-administration of DOX and SIM and can be considered valuable for the treatment of breast cancer.

Keywords: breast cancer; pH-sensitive liposomes; coencapsulation; doxorubicin; simvastatin.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina amino transferase
AST	Aspartato amino transferase
CHEMS	Hemisuccinato de coleslerila
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CK-MB	Creatino quinase isoforma MB
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência
Crio-TEM	Crio-microscopia eletrônica de transmissão
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina
DOX	Doxorrubicina
DP	Desvio padrão
DSPE	Distearoilfosfatidiletanolamina
DSPE-PEG <sub>2000</sub>	Distearoilfosfatidiletanolamina-(polietilenoglicol)2000
EPR	Aumento da permeabilidade e retenção
ER	Receptor de estrogênio
FDA	Food and Drug Administration
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2
HMGCR	Hidroximetilglutaril-coenzima A redutase
IC	Índice de combinação
INCA	Instituto nacional de cancer
IP	Índice de Polidispersidade

NMA	Análises morfométricas nucleares
PBS	Tampão fosfato
PE	Porcentagem de encapsulação
PEG	Poliétilenoglicol
PR	Receptor de progesterona
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
RP	Receptor de progesterona
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SIM	Sinvastatina
SpHL	Lipossoma pH-sensível
SpHL-D	Lipossoma contendo doxorrubicina
SpHL-D-S	Lipossoma contendo doxorrubicina e sinvastatina
SpHL-S	Lipossoma contendo sinvastatina
SRB	Sulforrodamina B
VRT	Volume relativo do tumor

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 CÂNCER DE MAMA .....	13
2.2 DOXORRUBICINA (DOX).....	19
2.3 ESTATINAS .....	22
2.3.1 <i>Sinvastatina (SIM)</i> .....	25
2.4 ASSOCIAÇÃO DE SINVASTATINA E DOXORRUBICINA.....	26
2.5 LIPOSSOMAS .....	28
2.5.1 <i>Lipossomas de doxorubicina</i> .....	31
2.5.2 <i>Lipossomas de sinvastatina</i> .....	33
2.5.3 <i>Coencapsulação de fármacos e razões sinérgicas</i> .....	33
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4 MATERIAIS E METODOS</b> .....	<b>38</b>
4.1 MATERIAIS .....	38
4.2 PREPARO DOS LIPOSSOMAS .....	38
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE LIPOSSOMAS .....	39
4.3.1 <i>Diâmetro da vesícula, Índice de Polidispersidade (IP) e Potencial Zeta</i> ...	39
4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DOX E SIM .....	39
4.5 LIOFILIZAÇÃO .....	40
4.6 CRIO-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	41
4.7 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO .....	41
4.8 ESTUDO DE LIBERAÇÃO.....	41
4.9 CULTURA DE CÉLULAS .....	42
4.10 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE .....	42
4.11 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE COMBINAÇÃO (IC).....	43
4.12 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS NUCLEARES (NMA).....	43
4.13 TESTE DE MIGRAÇÃO.....	44
4.14 ESTABILIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....	44
4.15 ANIMAIS .....	45
4.16 ATIVIDADE ANTITUMORAL .....	45
4.17 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	46
4.18 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE .....	47
4.19 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO I: Estudo do potencial antitumoral da associação de doxorubicina e sinvastatina livres ou coencapsuladas em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada: Avaliação <i>in vitro</i> frente linhagens celulares de câncer de mama humano.</b> .....	<b>50</b>

1 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	51
2 VIABILIDADE CELULAR E ANÁLISE DE SINERGISMO .....	54
3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS NUCLEARES (NMA).....	60
4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	65
5 ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO .....	69
6 ESTUDO DE LIBERAÇÃO .....	71
7 CRIO-TEM .....	73
8 CONCLUSÃO.....	74

**CAPÍTULO II: Investigação da atividade antitumoral lipossomas pH sensíveis coencapsulando doxorrubicina e sinvastatina em um modelo animal de câncer de mama murino. .... 75**

1 ESTABILIDADE BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> .....	75
2 ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR E SINERGISMO EM LINHAGEM 4T1 .....	77
3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS NUCLEARES (NMA).....	80
4 ENSAIO DE MIGRAÇÃO .....	83
5 ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VIVO</i> .....	85
6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	88
7 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE TOXICIDADE.....	91
8 CONCLUSÃO.....	97
6 DISCUSSÃO GERAL .....	98
7 PERSPECTIVAS.....	101
REFERÊNCIAS .....	102

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama foi o mais incidente no mundo em 2021, e mais de 2,2 milhões de casos foram diagnosticados (Sung et al., 2021). É um relevante problema de saúde pública, sendo o tipo de câncer mais comumente identificado, representando 1 em cada 8 diagnósticos de câncer em todo o mundo. Em 2040, prevê-se um aumento de mais de 1 milhão de mortes por câncer devido ao crescimento populacional e ao envelhecimento (Arnold et al., 2022; Wilkinson & Gathani, 2022).

Dentre os esquemas quimioterápicos para tratamento dessa doença, as antraciclina, principalmente a doxorubicina (DOX), são as mais utilizadas. Apesar da taxa de resposta clínica expressiva, a DOX induz efeitos adversos graves, principalmente cardiotoxicidade (Tan et al., 2017). Além disso, a DOX pode induzir resistência quimioterápica resultando em mau prognóstico e reduzida sobrevida dos pacientes. Assim, a busca por novas estratégias capazes de superar esses problemas tornou-se essencial.

A nanomedicina trouxe uma opção terapêutica favorável à DOX e a primeira formulação lipossomal de DOX aprovada, Doxil® (Janssen Biotech, Inc., Johnson & Johnson, EUA), mostrou eficácia antitumoral comparável à DOX livre e redução do dano cardíaco. No entanto, efeitos tóxicos ainda foram relatados na aplicação clínica (Soundararajan et al., 2011).

Evidências pré-clínicas sugerem que a simvastatina (SIM), além de suas propriedades anticolesterolemicas, pode ter efeitos antitumorais e diminuir a toxicidade cardíaca induzida pela DOX (Duarte et al., 2021). Um estudo de meta-análise de 1.111.407 pacientes com câncer mostrou que o uso do SIM reduziu a mortalidade por câncer em 40% (Jiang et al., 2021a). Nesse contexto, a coencapsulação desses fármacos em formulação lipossomal pode ser uma estratégia promissora para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade. Além disso, a associação de ambos os fármacos no mesmo nanossistema permitiria a entrega simultânea no local alvo (Franco et al., 2019). Recentemente, um medicamento contendo uma formulação lipossomal de daunorrubicina e citarabina coencapsuladas (Vyxeos®) em uma proporção molar sinérgica de 1:5 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* e pela Agência Europeia de Medicamentos para o tratamento da leucemia mieloide (Cortes et al., 2021).

Nosso grupo tem estudado o emprego de lipossomas sensíveis ao pH para entrega seletiva de DOX baseado (i) no pH ácido do microambiente tumoral e endossomos intracelulares (em torno de 6,5 e 5,0-6,0, respectivamente) em comparação com tecidos normais (pH 7,4), (ii) na presença de lipídio polimórfico capaz de formar uma bicamada lamelar em pH fisiológico e sofrer desestabilização e mudança para uma fase hexagonal, liberando o conteúdo da vesícula em pH ácido e (iii) no tempo de circulação do fármaco prolongado pelo uso de um lipossoma contendo polietilenoglicol (PEG) (Paliwal et al., 2012).

Diante do exposto, a proposta do presente estudo foi desenvolver e caracterizar uma formulação lipossomal pH-sensível contendo DOX e SIM bem como avaliar de diferentes razões entre DOX e SIM livres ou coencapsulados em modelos experimentais de tumor de mama *in vitro* e *in vivo*. Essa estratégia tem como propósito investigar os efeitos combinatórios entre os fármacos, uma vez que existe a necessidade de aprimorar o efeito terapêutico desses agentes e proporcionar alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer de mama.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é hoje o câncer mais diagnosticado no mundo. Os números globais mais recentes contabilizaram 2,26 milhões de casos incidentes de câncer de mama em 2020 e a doença é a principal causa de mortalidade por câncer em mulheres em todo o mundo (Wilkinson & Gathani, 2022). A taxa de incidência de câncer de mama é mais alta nos países desenvolvidos, isso se deve, principalmente, ao aumento da idade da população. Embora a prevalência de câncer de mama seja mais alta nos países desenvolvidos, as maiores taxas de mortalidade são observadas nas regiões menos desenvolvidas (Ahmad, 2019; Dantas et al., 2021; Fitzmaurice et al., 2018). A estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) para cada ano do triênio 2020-2022 é de 66.280 casos novos de câncer de mama, o que corresponde a um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

O câncer de mama, como todos os outros cânceres, é o resultado de uma proliferação clonal que se origina em células com várias mutações genéticas as quais podem ser hereditárias, ou que ocorrem como resultado de instabilidade gênica e/ou fatores ambientais. Essas células tumorais muitas vezes invadem tecidos adjacentes e podem metastizar para sítios distantes (Granadillo Rodríguez et al., 2020).

O câncer de mama ocorre devido à mutação ou à alteração nos genes responsáveis por regular o crescimento normal das células. Os genes BRCA1 e BRCA2 são os genes que mais comumente estão associados às mutações e ao alto risco de câncer de mama. Esses genes são conhecidos como reguladores do reparo, transcrição e ciclo celular em resposta a danos no DNA (Feng et al., 2018; Lima et al., 2019). Dados estatísticos mostram que as mulheres com uma mutação no BRCA1 têm um risco de 55 a 65% ao longo da vida de desenvolver câncer de mama. Para mulheres com mutação no BRCA2, o risco ao longo da vida é de 45% (Allison, 2012; Colditz et al., 2012; Feng et al., 2018).

O mecanismo exato pelo qual o câncer de mama é iniciado é desconhecido; no entanto, foi demonstrado que o sistema imunológico desempenha um papel duplo na

iniciação e progressão do tumor. As citocinas, como o Fator de Crescimento Transformador (TGF- $\beta$ ), Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produzidas na carcinogênese em um ambiente inflamatório, podendo promover ativamente o crescimento tumoral e a metástase (Nagarajan & McArdle, 2018).

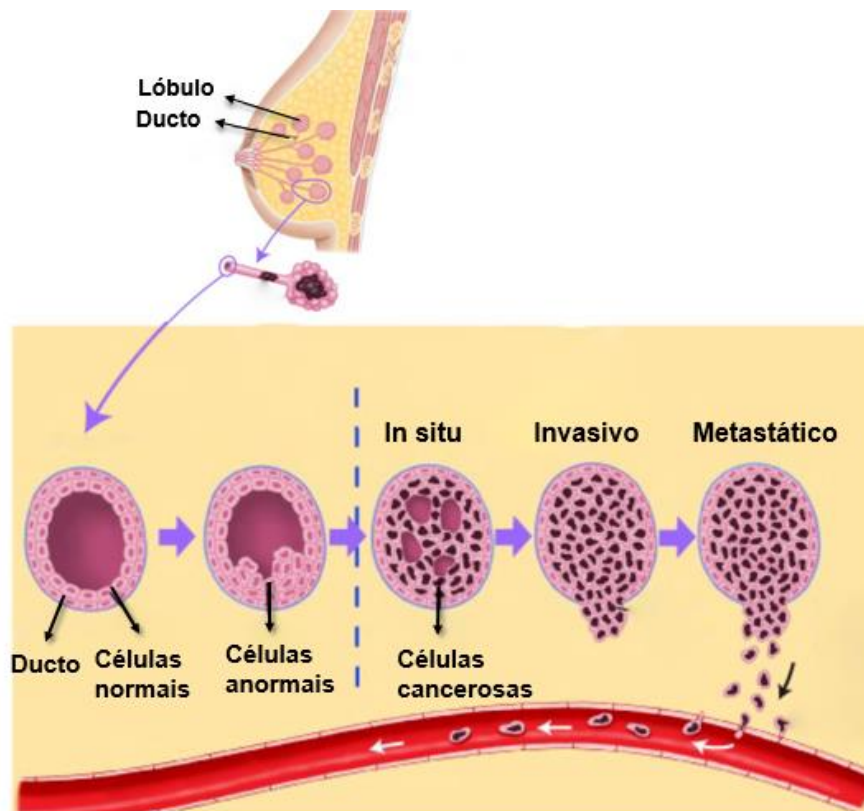
Diversos fatores, além do gênero (maior prevalência em mulheres) e da idade (risco proporcional a idade e marcadamente aumentado após a menopausa) estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver a doença. Dentre esses fatores de risco estão os elementos genéticos e o histórico familiar, sendo que mulheres com ao menos um parente de primeiro grau com câncer de mama apresenta duas vezes mais de desenvolver essa doença. No entanto, o câncer de mama de caráter hereditário corresponde a apenas 5% a 10% do total de casos. Outro fator de risco é a densidade da mama, uma vez que, mama com menor densidade é composta predominantemente de tecido adiposo, levando a um risco de câncer de mama cerca de 5 vezes menor comparativamente a mulheres com mama de alta densidade (IARC, 2022). Há ainda fatores comportamentais que levam a um aumento de risco da doença, relacionados ao sedentarismo, a obesidade, a reposição hormonal, ao tabagismo e a ingestão excessiva de bebidas alcóolicas (IARC, 2022).

O câncer de mama mostra um amplo espectro de morfologia celular com extensa no tipo e grau histológico e por isso, a tipagem e a classificação de carcinomas de mama muda ao longo do tempo. Os cânceres de mama são classificados de acordo com muitos de seus aspectos embora a apresentação histológica foi por muitos anos o padrão ouro para o diagnóstico de câncer de mama. No entanto, a quinta edição do grupo de trabalho da OMS também introduziu algumas mudanças em relação à tipagem tumoral, refletindo não apenas uma melhor compreensão da biologia tumoral, incluindo alterações moleculares e comportamento clínico, mas também concordância diagnóstica e nível de evidência para sua designação como tipos especiais de tumores (Muller et al., 2022; Rakha et al., 2022).

Por ser uma doença altamente heterogênea, pode ser definida pela expressão diferencial de receptores de superfície celular (Bou Zerdan et al., 2022). Essas estratificações influenciam o tratamento com base, por exemplo, na expressão de biomarcadores (Cserni, 2020). Dentre os diferentes tipos de carcinomas de mama

existentes e com base na histopatologia, podem ser divididos em carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos (“Breast Pathology,” 2022) . A maioria dos cânceres de mama são carcinomas, os quais iniciam nas células epiteliais. Quando os carcinomas se formam nas células dos ductos ou nos lóbulos são chamados adenocarcinomas (**Figura 1**) (Allison, 2012; Colditz et al., 2012; Wang et al., 2018).

**Figura 1** – Representação da anatomia mamária e estágios de carcinomas



Fonte: internet adaptada de Saint John's Cancer Institute, 2022

O tratamento do câncer de mama depende do estágio. O estágio 0 é o carcinoma ductal *in situ*, que não é invasivo, mas progride para câncer invasivo em até 40% dos pacientes (Trayes & Cokenakes, 2021). Aproximadamente, 95% de todos os casos de câncer de mama se enquadram em subcategorias invasivas, ou seja, nesse estágio, as células rompem a parede do ducto invadindo o tecido mamário adjacente. A subcategoria mais comum é o carcinoma ductal invasivo, correspondendo a cerca de 8 a cada 10 casos de câncer de mama invasivo (Y. Feng et al., 2018). Há ainda o câncer de mama metastático, também chamado de estágio IV, é o câncer de mama avançado, em que a neoplasia se espalha para outras partes do corpo. Nesse estágio

metastático, o câncer de mama é tratável, mas não curável e cada grama do tumor pode liberar cerca de  $10^6$  células por dia na corrente sanguínea (Veronesi et al., 2005).

Baseado no perfil de expressão gênica das células tumorais, o câncer de mama invasivo pode ser dividido, por meio de avaliação imuno-histoquímica, em quatro subtipos moleculares principais de acordo com a expressão do receptor de estrogênio (ER), a expressão do receptor de progesterona (PR) e/ou a expressão do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). A capacidade de distinguir com precisão entre os subtipos é importante, pois cada um tem um prognóstico, implicando em diferentes tratamentos (Burguin et al., 2021). Por meio desses parâmetros, os cânceres de mama geralmente são divididos nos subtipos: luminal A, luminal B, HER-2 e triplo negativo (**Tabela 1**).

**Tabela 1** Principais subtipos moleculares de câncer de mama.

Subtipo	Assinatura molecular	Características	Tratamento
<b>Luminal A</b>	ER positivo PR positivo/negativo HER2 negativo	Mais comum (~40% dos casos); crescimento lento; melhor prognóstico.	Normalmente terapia hormonal/ cirurgia/ radioterapia.
<b>Luminal B</b>	ER positivo PR positivo/negativo HER2 positivo	~20% dos casos; prognóstico é um pouco pior que o luminal A	Normalmente terapia hormonal/ cirurgia/ radioterapia.
<b>HER-2</b>	ER negativo PR negativo HER2 positivo	~10% dos casos; crescem mais rapidamente que os cânceres luminais	Terapias direcionadas à proteína HER2, como trastuzumabe/ cirurgia/ radioterapia.
<b>Triplo negativo</b>	ER negativo PR negativo HER2 negativo	~20% dos casos; mais agressivo que os demais;	Quimioterapia convencional/ cirurgia/ radioterapia.

Fonte: Adaptado de FENG et al., 2018.

O câncer de mama se desenvolve em um microambiente complexo que compreende vários tipos de células e a matriz extracelular. As células mais abundantes são os fibroblastos mas o microambiente do câncer de mama também contém células da

linhagem leucocitária (incluindo linfócitos, macrófagos e células estromais derivadas de mieloides), a maioria das quais estão envolvidas na resposta imune. A imunogenicidade do câncer de mama varia entre os subtipos moleculares, sendo maior em tumores TNBC e HER2-positivos e menor nos subtipos luminal A e luminal B (Harbeck et al., 2019).

O diagnóstico correto do câncer é essencial para um tratamento quimioterápico adequado e eficaz. Esse pode ser multimodal, com uma combinação de quimioterapia neo/adjuvante, cirurgia, radioterapia e/ou terapia endócrina. O objetivo principal do tratamento é curar o câncer ou prolongar a vida do paciente de forma considerável bem como melhorar a qualidade de vida do paciente por meio da diminuição dos efeitos adversos e do apoio psicológico (IARC, 2022.; Plummer et al., 2016).

Em resposta ao estresse induzido pela quimioterapia, as células cancerígenas sofrem apoptose. Em células cancerígenas resistentes à apoptose ou em doses mais baixas de fármacos, o estresse induzido pela terapia leva à senescência prematura. Vale ressaltar que a indução de senescência prematura em células tumorais significa apenas a interrupção do crescimento dessas células e pode estar relacionada à estabilização da doença. Somente quando as células senescentes são eliminadas pelas células do sistema imunológico, isso pode ser considerado uma regressão da doença (Milanovic et al., 2018). Cerrito e colaboradores mostraram que o tratamento combinado com vinorelbina e 5-fluorouracil induziu senescência em células MDA-MB-231. Além disso, eles sugeriram que a indução da senescência e a morte celular autofágica foram especialmente responsáveis pela melhor resposta dos pacientes com TNBC que receberam baixas doses e em curtos intervalos que a mesma terapia em esquema padrão (Cerrito et al., 2018).

A escolha do tratamento depende do subtipo molecular, bem como da extensão do câncer no organismo e das condições do paciente, como idade e co-morbidades. A quimioterapia sistêmica é um dos pilares no tratamento e, normalmente, usada para tratar câncer de mama invasivo em estágio inicial ou câncer de mama em estágio avançado para destruir ou danificar as células cancerígenas. Em alguns casos, a quimioterapia é administrada antes da cirurgia para reduzir o tamanho câncer (INCA, 2022). Para cânceres de mama metastático, a taxa de sobrevida é baixa,

independentemente do subtipo, e pode ser ainda menor para o subtipo triplo negativo (Burguin et al., 2021). Isso indica que são necessárias novas estratégias de tratamento para garantir uma boa taxa de sobrevida.

Nesses casos, os regimes de quimioterapia mais utilizados são os agentes citotóxicos como as antraciclinas (doxorubicina (DOX) e epirubicina), antimetabólitos (5-fluorouracil, gemcitabina) e/ou taxanos (paclitaxel e docetaxel) (Tagde et al., 2022). Contudo, a taxa de resposta à maioria desses fármacos é usualmente baixa, devido a uma série de fatores como: especificidade insuficiente para células tumorais; farmacocinética indesejável com depuração rápida e meia vida curta; baixa solubilidade dos fármacos e a frequente resistência desenvolvida pelas células (Attama et al., 2022).

Dentre essas classes, as antraciclinas são os agentes quimioterápicos mais ativos e que apresentam melhores resultados clínicos para o tratamento de câncer de mama. Esses fármacos podem ser usados em regimes de monoterapia ou em associação com outro fármaco (Bines et al., 2014; Tan et al., 2017). Terapias contendo associações de outros quimioterápicos com a DOX são, atualmente, a primeira linha para o tratamento do câncer de mama metastático e por isso, continuam sendo extensamente estudadas (Zaheed et al., 2019). O uso da quimioterapia combinada potencialmente oferece vantagens como chances de melhor eficácia e redução da dose, reduzindo toxicidade e reduzindo ou retardando o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Foucquier & Guedj, 2015).

Os avanços na quimioterapia envolvem também a introdução e o uso *off label* de fármacos que demonstraram melhorar os resultados gerais do tratamento convencional, especialmente na terapia combinada, como sobrevida e a diminuição de efeitos adversos (Lima et al., 2019). A prescrição *off label* é prática comum em oncologia e é um componente integrante das estratégias de tratamento do câncer de mama. Um estudo feito em 2015 nos Estados Unidos acompanhou 65 pacientes em tratamento contra o câncer de mama e revelou 55,4% dos casos investigados registraram usos *off-label* no tratamento (Hamel et al., 2015). Entretanto, a terapia combinada precisa ser cuidadosamente selecionada para garantir que os pacientes obtenham o máximo benefício da terapia, uma vez que, a adição de alguns agentes

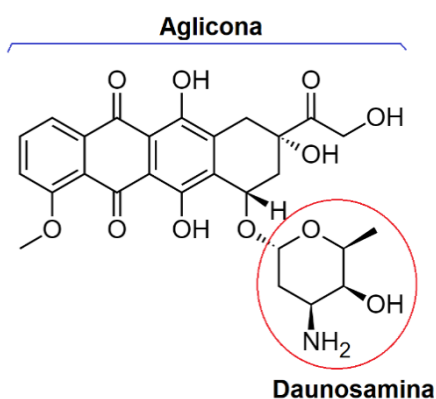
aos regimes existentes pode resultar em aumento da toxicidade sem melhora significativa na eficácia terapêutica (Lima et al., 2019).

A terapia antitumoral combinada tem se mostrado viável, porém, a entrega desses fármacos ao sítio alvo continua sendo um grande desafio. Nesse contexto, a utilização de nanossistemas pode propiciar vantagens como a redução da imunogenicidade, veiculação de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos simultaneamente, promoção da captação celular, obtenção de efeito sinérgico e liberação simultânea dos compostos no alvo. Portanto, o uso dos nanossistemas no tratamento combinado é uma estratégia que pode aumentar a eficácia dos agentes antitumorais, bem como reduzir sua toxicidade (Eldar-Boock et al., 2013; Foucquier & Guedj, 2015).

## 2.2 Doxorrubicina (DOX)

A DOX é um fármaco amplamente prescrito contra o câncer de mama e considerado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como um dos mais potentes à disposição para uso na clínica (Al-malky et al., 2020). Pertence à classe das antraciclina, portanto, quimicamente consiste em uma aglicona e um açúcar (**Figura 2**).

**Figura 2** - Estrutura química da doxorrubicina



A aglicona consiste em um tetracíclico (quatro anéis) com dois grupos adjacentes: um grupo metoxi e uma cadeia lateral curta contendo um grupamento carbonila. O açúcar, denominado daunosamina, está ligado ao anel por uma ligação glicosídica, e é responsável pela solubilidade aquosa da DOX, enquanto o anel tetracíclico corresponde à região hidrofóbica (Jawad et al., 2019) (Minotti et al., 2004).

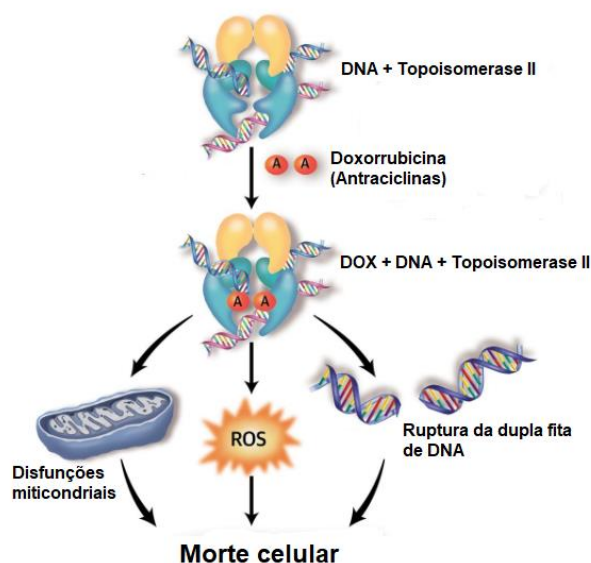
A DOX é comercializada na forma de cloridrato e administrada por via endovenosa e a dose recomendada é entre 50 e 75 mg/m<sup>2</sup>, geralmente administrada em dose única com intervalo de 21 dias. Apesar do seu extenso uso na clínica, seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Dentre os mecanismos propostos estão: a inibição da topoisomerase II, resultando em quebra da dupla fita de ácido desoxirribonucléico (DNA) e morte celular; a formação de adutos com DNA e o estresse oxidativo pela formação de radicais livres, ambos levando a danos no DNA e morte celular e superprodução de ceramidas que leva à apoptose via ativação da caspase-3 (Yang et al., 2014).

A inibição da topoisomerase II é o mecanismo considerado o mais relevante de sua ação citotóxica. A DOX entra nas células por difusão passiva e, no citoplasma, liga-se a subunidade 20S do proteossoma. Esse complexo migra para o núcleo e lá se mantém devido à maior afinidade da DOX pelo DNA. A concentração de DOX no núcleo é portanto cerca de cinquenta vezes maior do que no citoplasma. No núcleo, a DOX inibe a ação da topoisomerase II, levando à formação de um complexo estável Dox-DNA-Topoisomerase II (**Figura 3**) (Yang et al., 2014). Esse complexo ocasiona rupturas nas fitas do DNA, levando a parada do ciclo celular (Hande, 2008). Além disso, altera o transcriptoma, levando à biogênese mitocondrial defeituosa e ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS), tendo como resultado a morte celular (Hande, 2008; Minotti et al., 2004; Vejpongsa & Yeh, 2014).

Apesar da alta eficácia, a DOX não é seletiva para células cancerígenas, e logo, seu uso possui fatores limitantes, especialmente, cardiotoxicidade e emergência de resistência. Além de efeitos tóxicos gerenciáveis como distúrbios gastrointestinais (como náusea, vômitos, diarreia, etc.), alopecia e estomatite. A mais grave toxicidade associada ao uso de DOX é a cardiotoxicidade e este efeito é dose-dependente. Os efeitos agudos começam logo após sua administração e incluem arritmias, hipotensão e alterações eletrocardiográficas, podendo ocorrer pericardite. Estima-se que em torno de 11% dos pacientes tratados com DOX desenvolvem cardiotoxicidade aguda (Al-malky et al., 2020; Jawad et al., 2019).



**Figura 3** Principal mecanismo citostático da DOX



Adaptado de (Vejpgonga & Yeh, 2014)

Em relação aos efeitos crônicos, eles ocorrem em, aproximadamente, 1,7% dos pacientes tratados com DOX, promovendo uma taxa de mortalidade de 50% nesses casos. Os efeitos crônicos ocorrem por acumulação de doses sucessivas de DOX (em especial quando atingem valores acumulados de 500 mg/m<sup>2</sup>) e levam à insuficiência cardíaca congestiva e cardiomiopatias que podem surgir até anos após o fim do tratamento. Estima-se que 10% dos pacientes tratados com DOX apresentarão complicações cardíacas em até 10 anos após o término do tratamento (Octavia et al., 2012; Vejpgonga & Yeh, 2014).

São propostas diversas hipóteses de mecanismos para a patogênese da cardiotoxicidade da DOX. A hipótese clássica atribui o dano nos cardiomiócitos às ROS liberadas pela ação intracelular da DOX em células normais e tumorais. Devido a inibição da enzima Topoisomerase II ocorre morte celular e dano oxidativo mitocondrial e, o tecido cardíaco apresenta uma maior concentração de mitocôndrias quando comparado com outros tecidos (Octavia et al., 2012; Vejpgonga & Yeh, 2014).

A fim de melhorar o perfil de segurança da DOX, dispõe-se de uma série de estudos com a encapsulação deste agente em nanoestruturas, principalmente lipossomas. Essa estratégia tem se mostrado útil como ferramenta para aumento de seletividade

do fármaco, por se acumularem preferencialmente nos tecidos-alvo, diminuindo os danos aos tecidos saudáveis, além de melhorar as propriedades de biodisponibilidade e farmacocinética dos quimioterápicos (Akhtari et al., 2016; Pandey et al., 2016; Prokopowicz, 2015).

Por outro lado, estudos tem demonstrado que a associação da DOX com outros agentes quimioterápicos tem sido bastante vantajosa uma vez que une dois ou mais fármacos que podem atuar por diferentes mecanismos de ação resultando em um sinergismo bem como reduzindo o efeito tóxico dos mesmos (Franco et al., 2019).

### 2.3 Estatinas

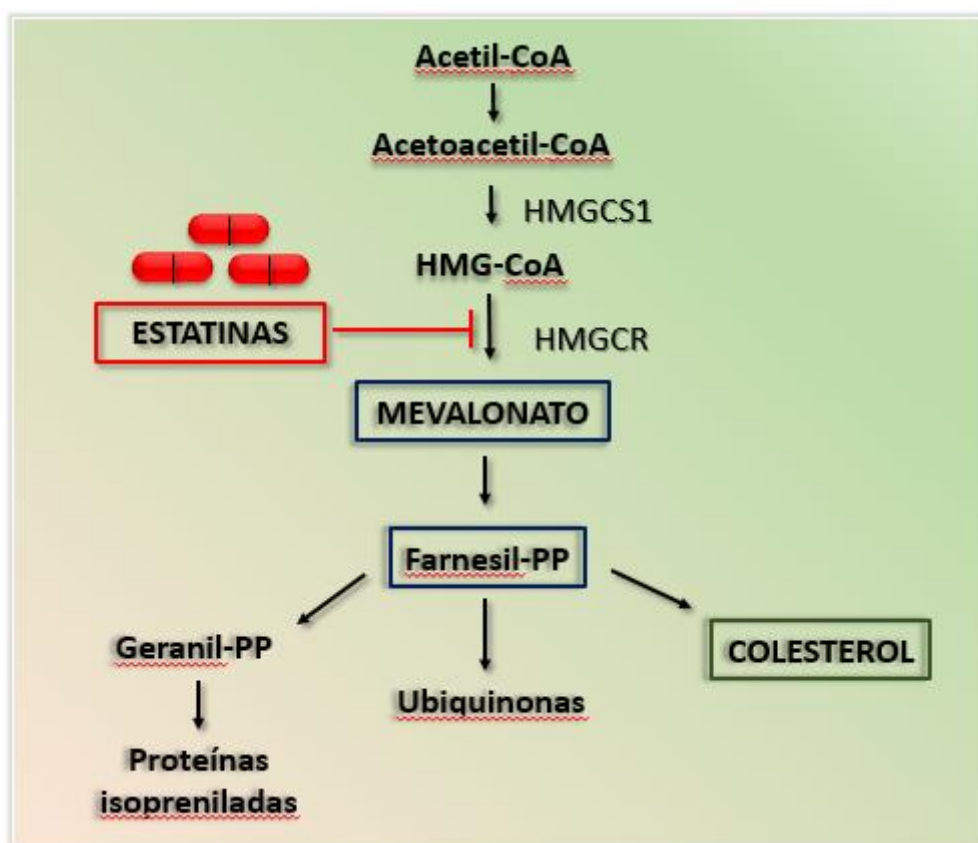
Um grande número de estudos clínicos e epidemiológicos vem investigando as propriedades anticancerígenas das estatinas, mas as evidências ainda são inconsistentes. No entanto, essa é uma área ativa de pesquisa que tem demonstrado que certos subtipos moleculares de câncer são mais vulneráveis à terapia com estatinas do que outros. Por outro lado, as estatinas parecem aumentar a eficácia e contornar as deficiências associadas aos tratamentos convencionais de câncer, sugerindo que elas devem ser consideradas no contexto de terapias combinadas contra o câncer (Jiang et al., 2021b). Há mais de duas décadas as estatinas são amplamente utilizadas para o tratamento de hipercolesterolemia e de doença arterial coronariana aterosclerótica, resultando em uma diminuição acentuada da morbimortalidade cardiovascular em todo o mundo. O extenso uso das estatinas gerou questionamentos sobre sua influência em doenças concomitantes, incluindo os cânceres de mama (Beckwitt et al., 2018a).

As estatinas reduzem os lipídios circulantes, mais especificamente o colesterol presente em lipoproteína de baixa densidade (LDL) e principalmente, nos hepatócitos (local da biossíntese do colesterol). O mecanismo de ação das estatinas se deve a inibição competitiva da hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR) que é uma enzima limitante da síntese do colesterol (**Figura 4**). As estatinas possuem afinidade com a enzima milhares de vezes superior à do substrato natural, determinado assim, uma menor formação de mevalonato, levando a diminuição da concentração de colesterol intracelular. Além do colesterol, outros mediadores a jusante da via biossintética também são afetados, como o farnesil pirofosfato (FPP) que atua

também estimulando a ativação de proteína-G, a proliferação celular e a adesão de moléculas em focos inflamatórios (Beckwitt et al., 2018; Endo, 2010).

Embora todas as estatinas compartilhem o mesmo farmacóforo com afinidade pelo HMGCR, elas apresentam farmacocinética diferente. As estatinas são classificadas como lipofílicas ou hidrofílicas, dependendo de seus coeficientes de partição. As estatinas mais lipossolúveis são a lovastatina e a sinvastatina (SIM) e, quanto mais lipofílica, mais facilmente ela atravessa as membranas celulares, podendo se distribuir nas células dos tecidos extra-hepáticos e afetar a via de síntese do colesterol na maioria das células. Por outro lado, as estatinas hidrofílicas são basicamente inertes para a maioria das células (Fujiwara et al., 2017; Huelsenbeck et al., 2011).

**Figura 4** – Esquema do mecanismo de ação das estatinas na biossíntese do colesterol.



Vários estudos têm sido realizados para investigar a terapia com estatinas em pacientes com câncer. Diversas hipóteses motivam esses estudos, uma vez que, as

estatinas reduzem o LDL, isso pode influenciar a carcinogênese e a progressão do tumor, pois as células em divisão rápida requerem aumento do colesterol para a síntese da membrana celular. Além disso, o colesterol presente na corrente sanguínea participa de vias sinalizadoras envolvidas na proliferação e migração celular. As estatinas reduzem também a secreção de citocinas pró-inflamatórias, as quais são conhecidas na condução a carcinogênese (Cruz et al., 2013; King et al., 2022).

Embora os mecanismos específicos envolvidos na mudança do metabolismo normal do colesterol para a fase neoplásica ainda precisam ser elucidados, os achados clínicos e experimentais sugerem uma aparente necessidade de células e tecidos malignos por quantidades acima do normal de colesterol (Murtola et al., 2012). Duncan e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de mevalonato promove o aumento do crescimento tumoral em camundongos (Duncan et al., 2004). Alguns estudos sugerem fortemente que a inibição da via do mevalonato usando estatinas tem impacto em eventos oncogênicos (Alizadeh et al., 2017; Duncan et al., 2004). Achados adicionais sugerem que células cancerígenas que exibem uma regulação positiva dos receptores do fator de crescimento (como é o caso de alguns cânceres de mama) estão associadas a eventos de sinalização dependentes de colesterol (Chen et al., 2018). Outros ainda, sugerem que a inibição dos produtos da via do mevalonato podem causar autofagia em células tumorais (Mengual et al., 2022).

Embora as estatinas não afetem a incidência da maioria dos cânceres, pesquisas demonstram que elas exercem benefícios significativos na recorrência e sobrevivência em muitos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. É importante ressaltar ainda que esses benefícios são mais fortemente observados em tratamentos com estatinas lipofílicas (Beckwitt et al., 2018a; Desai et al., 2015). Estudos também sugerem que o benefício clínico do tratamento com estatina em pacientes com câncer diagnosticado precocemente ou ressecados pode ser impulsionado por uma redução na formação de novas metástases devido à inibição da transição epitelial-mesenquimal em células cancerígenas de tumores sólidos. Esses dados permitem

inferir que as estatinas interferem na plasticidade celular reduzindo a formação de tumores secundários (Dorsch et al., 2021).

Sabe-se também que a enzima HMGCR é superexpressa em cerca de 80% dos tumores mamários em comparação com glândulas mamárias normais (Signe Borgquist et al., 2018). Desai e colaboradores (2015) reportaram uma semelhança a incidência de câncer de mama entre usuárias e não usuárias de estatina; no entanto, foi observada uma redução do diagnóstico de câncer de mama em estágio avançado em usuários de estatinas lipofílicas. (Desai et al., 2015).

### **2.3.1 Sinvastatina (SIM)**

A SIM é uma estatina altamente lipofílica que vem sendo associada a redução da recorrência e da mortalidade por câncer de mama. Uma revisão de literatura foi publicada recentemente pelo nosso grupo sobre o uso potencial da SIM nos tratamentos de câncer (Duarte et al., 2021).

Um número considerável de evidências pré-clínicas e epidemiológicas endossam que a SIM prejudica a proliferação de células de câncer de mama e reduzem o risco de recorrência. Estudos revelaram uma redução de 10% na recorrência da doença, entre as pacientes com câncer de mama em estágio intermediário que foram tratadas com SIM (Ahern et al., 2011).

Esses achados estão em concordância com os resultados de uma metanálise apresentada por Liu e colaboradores (2017) nos quais a SIM reduziu significativamente a mortalidade específica (cerca de 43%) por câncer de mama (Liu et al., 2017a). Um estudo de coorte com 23.000 pacientes, realizado por Murtola e colaboradores (2014) também concluiu que as pacientes usuárias de SIM apresentaram risco, cerca de 50%, menor de morte por câncer de mama em comparação com as não usuárias de SIM (Murtola et al., 2014).

Há pesquisas pré-clínicas que afirmam que o tratamento com SIM diminui a proliferação e aumenta a apoptose das células de câncer de mama (Borgquist et al., 2018). Foi descrito também que a SIM reduz significativamente o volume do tumor

em carcinoma mamário e que apresenta atividade anticâncer direta *in vitro*, quando comparada com outras estatinas (Campbell et al., 2006).

O mecanismo preciso da SIM em células cancerígenas permanece incerto, no entanto, alguns estudos mostraram que as estatinas podem reduzir o crescimento e a proliferação de células tumorais, induzindo a parada do ciclo celular e morte celular por apoptose. Além disso, existem relatos de supressão da angiogênese (Elmore, 2007).

Em vista disso, a combinação de SIM com diferentes agentes quimioterapêuticos, entre eles DOX, pode ter um efeito sinérgico, proporcionando aumento da morte de células tumorais, sendo portanto potencial para complementar e melhorar os efeitos terapêuticos dos quimioterápicos contra o câncer de mama.

#### **2.4 Associação de sinvastatina e doxorrubicina**

O uso *off-label* de estatinas pode representar uma abordagem farmacológica promissora para obter controle sobre a cardiotoxicidade crônica, interferindo nos mecanismos de morte celular dos cardiomiócitos induzida por antraciclinas (Henninger & Fritz, 2018). Também já foi relatado na literatura que a SIM diminui a incidência de lesão do tecido cardíaco após o tratamento com DOX sem prejudicar a eficácia terapêutica dessa antraciclina (Chotenimitkhun et al., 2015). A SIM pode exercer efeitos cardiovasculares pleiotrópicos benéficos por mecanismos anti-inflamatórios e anti-oxidativos, os quais possivelmente também contribuem para a cardioproteção, uma vez que podem suprimir o estresse oxidativo induzido pela DOX (Y.-H. Kim et al., 2012; Riad et al., 2009).

Em um estudo de coorte clínico retrospectivo foi observado um risco significativamente menor de insuficiência cardíaca em pacientes com câncer de mama que receberam SIM, por via oral, durante quimioterapia com DOX (Cardinale et al., 2010). Outro estudo indicou que indivíduos tratados com DOX que também recebem SIM apresentaram declínio menor na fração de ejeção do ventrículo esquerdo em comparação com aqueles que não recebem a estatina (Seicean et al., 2012).

Em 2000, Felezko e colaboradores testaram o potencial antitumoral da SIM combinada com DOX em três modelos de tumor (células Colon-26, células de sarcoma NIH-3T3 e células de carcinoma de pulmão de Lewis) *in vivo*. Os resultados revelaram que além da SIM melhorar a eficiência antitumoral da DOX, os camundongos que receberam o co-tratamento mostraram menor liberação de troponina T, apontando para efeitos cardioprotetores da estatina (Feleszko et al., 2000). Em outro estudo a SIM potencializou o efeito inibitório da DOX no crescimento do tumor primário e na disseminação metastática em quimioterapia de células de osteossarcoma em modelo murino (Mangelinck et al., 2021).

Essas evidências sugerem que a SIM além de influenciar a carcinogênese, exerce cardioproteção em tratamento concomitante com DOX. Há um ensaio clínico de fase II, com previsão de término para 1 de março de 2023 no qual, 34 pacientes em tratamento contra o câncer de mama recebem conjuntamente DOX e SIM. O objetivo desse ensaio é determinar o quanto a ingestão de SIM ao receber a quimioterapia com DOX pode minimizar os danos ao coração (Identificador NCT02096588).

Embora a terapia antitumoral combinada tenha se mostrado viável, a entrega desses fármacos ao sítio alvo continua sendo um grande desafio. Nesse contexto, a utilização de nanossistemas pode propiciar vantagens como a redução da imunogenicidade, veiculação de compostos hidrofóbicos e hidrofílicos simultaneamente, promoção da captação celular, obtenção de efeito sinérgico e liberação simultânea dos compostos no alvo. Portanto, o uso dos nanossistemas no tratamento combinado é uma estratégia que pode aumentar a eficácia dos agentes antitumorais bem como reduzir sua toxicidade (Eldar-Boock et al., 2013).

Um estudo recente explorou a eficácia de uma nova terapia direcionada que consiste na administração sequencial de lipossomas de longa circulação funcionalizados encapsulando SIM e outros carregados com DOX frente ao modelo murino de melanoma B16.F10, levando à supressão quase completa do crescimento do tumor (Negrea et al., 2022).

## 2.5 Lipossomas

Os lipossomas são nanossistemas lipídicos de grande relevância na veiculação de fármacos antitumorais por via endovenosa, especialmente, por possibilitar o direcionamento passivo desses fármacos para a região tumoral, melhorando assim a eficácia terapêutica. Além disso, os lipossomas são biodegradáveis, biocompatíveis e estáveis em dispersões coloidais o que pode contribuir para a redução da toxicidade dos tratamentos anticâncer (Pandey et al., 2016).

Os lipossomas são constituídos por vesículas esféricas, que podem apresentar uma ou mais bicamadas lipídicas, as quais se formam espontaneamente quando fosfolípides são dispersos em meio aquoso. As bicamadas resultantes desse processo são capazes de acomodar substâncias anfífilas ou lipofílicas, enquanto compostos hidrofílicos podem ser encapsulados no compartimento aquoso interno das vesículas (Torchilin, 2010).

Os lipossomas podem ser classificados em termos de tamanho e número de bicamadas como: (1) vesículas multilamelares (MLV) que compreendem bicamadas lipídicas concêntricas com diâmetros de 1-5  $\mu\text{m}$ ; (2) vesículas unilamelares pequenas (SUV) que são formadas por uma bicamada única com diâmetro médio de 25-100 nm e (3) as vesículas unilamelares grandes (LUV), as quais também possuem uma bicamada única e apresentam diâmetro superior a 100 nm. Os lipossomas também podem ser classificados com relação à composição e ao mecanismo de liberação intracelular, como convencionais, de circulação prolongada e polimórficas, incluindo nessa última classe, os lipossomas pH-sensíveis, termossensíveis e catiônicos (Olusanya et al., 2018).

Os lipossomas convencionais, geralmente, são constituídos por fosfolípides e colesterol, podendo apresentar um fosfolípide carregado positiva ou negativamente a fim de promover a repulsão eletrostática entre as vesículas e, com isso, aumentar a estabilidade. Quando administrados por via endovenosa estes lipossomas podem ter a adsorção de opsoninas na superfície, o que resulta em sua captação pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo fígado, baço e medula óssea, sendo então rapidamente removidos da circulação sanguínea. Já os lipossomas de circulação prolongada podem apresentar diferentes revestimentos da superfície lipossomal,



como os polímeros hidrofílicos sintéticos, os polietilenoglicóis (PEG). A camada hidrofílica desses polímeros dificulta o reconhecimento e a associação de opsoninas. Com isso, os lipossomas são capturados mais lentamente pelos órgãos do SFM, permanecendo por mais tempo em circulação sanguínea. Em geral, o grau de peguilação pode variar entre 0,5% e 15% da razão molar dos lípides totais, sem afetar a estabilidade estrutural da bicamada lipídica (Torchilin, 2010). No entanto, esse efeito de adição de PEG é limitado, normalmente, apenas cerca de 5% dos lipossomas administrados permanecem no sistema circulatório sanguíneo após doze horas da administração intravenosa. A maioria dos nanossistemas é eliminada dentro de algumas horas, pelo fígado, baço e outros órgãos (Li et al., 2019).

A evolução dos lipossomas como carreadores de quimioterápicos, contou com mudanças estruturais que permitiram melhorar as aplicações terapêuticas (Pandey et al., 2016). Na tentativa de aumentar o direcionamento dos sistemas lipossomais para células alvo, bem como aumentar a liberação de fármacos nessas regiões, diversas estratégias foram desenvolvidas. Dentre elas o desenvolvimento de lipossomas polimórficos que apresentam mudanças em sua estrutura como resposta a estímulos, como por exemplo, alterações de temperatura e pH.

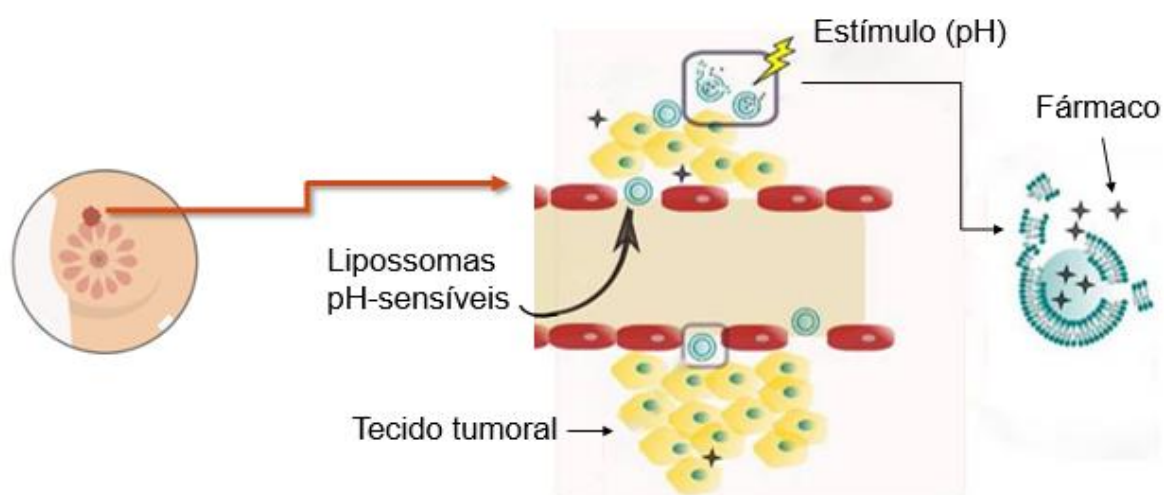
Os lipossomas pH-sensíveis se baseiam no fato do meio extracelular em tecidos acometidos por infecções, inflamações e tumores ser mais ácido que o meio extracelular em tecidos normais. A acidez observada na região tumoral ocorre em razão do clearance ineficiente dos metabólitos ácidos resultantes da glicólise aeróbica intensa que ocorre nas células tumorais (Heinrich et al., 2016). A resposta dos lipossomas pH-sensíveis ocorre devido as características dos seus constituintes fosfolipídicos, que exibem transição de fase, ou seja, desestabilização das vesículas em meio ácido, mas são estáveis em pH fisiológico (pH 7,4) (Kanamala et al., 2016).

Os lipossomas pH-sensíveis são comumente constituídos por fosfolípidos derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, a temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas. Para a formação de lipossomas é necessária a adição de moléculas estabilizantes de

membrana, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterol (CHEMS) (Kanamala et al., 2016).

O CHEMS em pH fisiológico encontra-se sob a forma ionizada e é capaz de se inserir entre as moléculas de fosfolípides, criando repulsões eletrostáticas entre os seus grupamentos carboxila e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecendo a formação de bicamadas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido, como o caso do pH extracelular dos tumores malignos, resulta na protonação das moléculas estabilizantes, levando a desestabilização das vesículas e liberação dos fármacos encapsulado no local de interesse (**Figura 5**).

**Figura 5** – Representação esquemática dos lipossomas pH-sensíveis na região tumoral.



Adaptado de (Franco et al., 2021)

Além de serem mais sensíveis ao pH por características biofísicas (aumento da hidrofobicidade favorecendo interações com as membranas celulares) em comparação a outros lipossomas pH sensíveis, os lipossomas compostos de DOPE:CHEMS ainda são superiores aos lipossomas convencionais, uma vez que são internalizados pelas células de forma mais eficaz, sendo também denominados lipossomas fusogênicos (Simões, 2004). A hipótese mais aceita para essa internalização é de que os lipossomas pH-sensíveis após terem sido endocitados, na periferia do tumor, se fundem com a membrana endossomal, sob a ação do baixo pH

(pH~5), e desestabilizam o endossoma, que por sua vez, libera o seu conteúdo diretamente no citoplasma (Li et al., 2011).

Além disso, sabe-se que a entrega dos fármacos na região tumoral é a chave para alcançar alta eficiência no tratamento do câncer. O efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) é um mecanismo reconhecido desde a década de 80, para a entrada preferencial de nanopartículas no tumor, devido aos vasos sanguíneos fenestrados e sistema de drenagem linfática colapsado no tecido tumoral (Y. Matsumura & Maeda, 1986). No entanto, à medida que mais pesquisadores estudam vários tumores e sistemas diferentes, o efeito EPR tem se mostrado bastante heterogêneo, especialmente em tumores grandes (Fang et al., 2020).

A penetração das nanopartículas nos tumores por meio da transcitose é um processo metabolicamente ativo que requer células endoteliais, com a formação de vesículas que podem absorver nanopartículas, tem sido recentemente considerada como estratégia promissora para a entrega de sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos contra o câncer (Sindhvani et al., 2020; Wei & Moodera, 2020).

### **2.5.1 Lipossomas de doxorubicina**

Os lipossomas de DOX vem sendo estudados desde a década de 80 devido ao seu potencial de diminuir a toxicidade e melhorar parâmetros farmacocinéticos desse fármaco altamente eficaz para vários tipos de tumores. A encapsulação de DOX em lipossomas de circulação prolongada foi promissora e, em 1995, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) o primeiro lipossoma de DOX, comercializado pelo nome Doxil®. Esse lipossoma foi inicialmente aprovado para o uso em portadores de sarcoma de Kaposi e em 2003 foi aprovado para uso em tumores de mama metastáticos (Chanan-Khan et al., 2003).

Atualmente, lipossomas de circulação prolongada (dentre eles, Doxil® e Lipodox®) e lipossomos sensíveis à temperatura (ThermoDox®) são utilizados na clínica. Como descrito anteriormente, a presença de PEG pode prolongar o tempo de circulação sanguínea dos lipossomas, modificando a distribuição da DOX no organismo. No entanto, em ensaios clínicos que contemplam o uso de Doxil® e Lipodox®, foi relatada toxicidades especialmente, cardíaca, hepática e gástrica. Por outro lado, a eficácia

terapêutica do ThermoDox® tem sido questionada (Salvioni et al., 2019; Yeh et al., 2011).

Vários trabalhos, publicados recentemente, demonstraram que os lipossomas pH-sensíveis contendo DOX melhoraram a internalização do fármaco nas células tumorais e diminuíram a resistência das mesmas (Koren et al., 2012; Xia et al., 2013). Pesquisadores desenvolveram lipossomas sensíveis ao pH carregados com DOX e administraram em camundongos acometidos pelo modelo de tumor de mama humano MCF-7. Eles observaram uma maior biodistribuição de DOX nos tumores dos animais tratados com lipossoma em relação aos animais tratados apenas com o fármaco livre (Ding et al., 2017). Li e colaboradores (2019) trataram camundongos portadores de tumor MCF-7 com lipossomas pH-sensíveis contendo DOX e observaram que a administração dessa formulação além de melhorar a captação celular de DOX, manteve a concentração do fármaco em um nível ótimo em células tumorais resistentes, comparativamente com os animais tratados com DOX livre (Li et al., 2019).

Os lipossomas pH-sensíveis contendo DOX também têm potencial de reduzir os efeitos tóxicos causados pela DOX livre (Paliwal et al., 2012; Y. Zhao et al., 2016). Estudos anteriores do grupo também demonstraram que o uso de lipossomas pH-sensíveis contendo DOX e formados por DOPE como fosfolípide estrutural e CHEMS como agente estabilizante podem aumentar o acúmulo de moléculas bioativas na região do tumor (Silva et al., 2016). Observou-se ainda uma redução significativa da toxicidade sistêmica (renal, hepática e intestinal) e morbimortalidade relacionada a DOX em modelos murinos quando estes fármacos foram encapsulados em SpHL (Silva et al., 2018; Ferreira et al., 2017).

Apesar desses sistemas apresentarem melhores parâmetros farmacocinéticos e de segurança, não foram observados aumento significativos na atividade antitumoral em relação a DOX livre (Bozzuto & Molinari, 2015; Yeh et al., 2011). Diante disso, a busca por novas formulações lipossomais que sejam potenciais para o tratamento do câncer continuam como objetivo de estudo por diversos grupos de pesquisa.

### **2.5.2 Lipossomas de simvastatina**

Devido ao caráter lipofílico da SIM a administração endovenosa não seria fácil, entretanto, sua incorporação na bicamada lipossomal pode permitir sua administração por essa via. Recentemente, foi demonstrado que a forma lipossomal da SIM é mais eficaz que a sua forma livre em tratamento em camundongos portadores de carcinoma de cólon C26 (Luput et al., 2018b).

Além disso, alguns trabalhos recentes têm demonstrado que a SIM lipossomal foi capaz de inibir o crescimento de tumores em camundongos acometidos por melanoma B16 (Alupei et al., 2015; Luput et al., 2018a; Matusewicz et al., 2019). Rauca e colaboradores, relataram que lipossomas de SIM contribuíram para supressão da indução de promotores de invasão e metástase em modelo *in vivo* de melanoma B16.F10 (Rauca et al., 2021).

Estudos *in vitro* utilizando linhagens celulares de câncer de mama demonstraram que os lipossomas de SIM induziram apoptose nas células levando a uma diminuição dos valores de  $CI_{50}$  e inibiram o crescimento do tumor em média de 25% em comparação com o controle (Matusewicz et al., 2018).

### **2.5.3 Coencapsulação de fármacos e razões sinérgicas**

A combinação de dois ou mais agentes antitumorais já é prática na rotina da terapia contra o câncer de mama. A exposição sequencial ou simultânea dos agentes ao tecido tumoral pode aumentar a eficácia do efeito terapêutico, assim como reduzir a dose utilizada, minimizando possíveis efeitos adversos e o desenvolvimento da resistência (Chou, 2006; Iannelli et al., 2018).

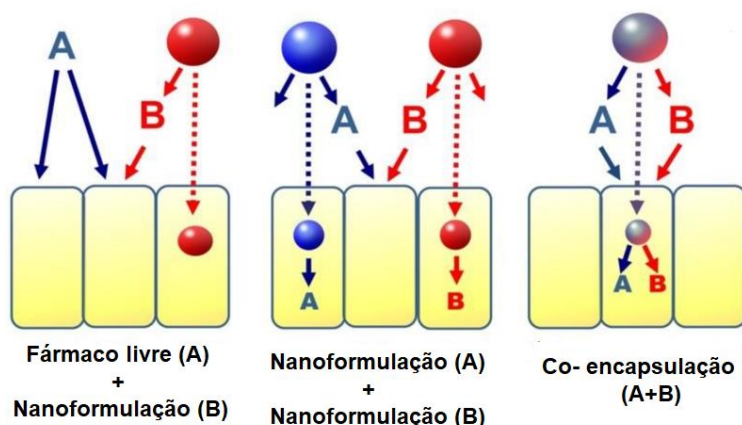
As combinações de fármacos antitumorais podem atuar de maneira sinérgica, aditiva ou antagônica dependendo dos compostos associados, bem como da razão utilizada para a combinação. Essa relação pode ser avaliada *in vitro*, entretanto não exclui avaliações *in vivo*, uma vez que a farmacocinética dos compostos pode ser diferente (Mayer et al., 2006).

Chou e Talalay, em 1984, desenvolveram uma abordagem que envolve a análise do efeito mediano para avaliação de sinergismo e introduziram a terminologia “índice combinatório” (CI) a fim de caracterizar quantitativamente o sinergismo (Chou &

Talalay, 1984). Com a evolução dos algoritmos foi desenvolvido o CalcuSyn, um software que permite a avaliação do sinergismo ou antagonismo em diferentes níveis de dose efeito. Desde então esse tem sido amplamente empregado na pesquisa de combinações de substâncias bioativas (Vakil & Trappe, 2019).

Diferentes abordagens para permitir uma combinação de dois compostos são descritas na literatura. A abordagem menos recomendada é a administração simultânea de fármacos livres, devido a variações entre os fármacos como solubilidade, permeação, estabilidade, meia-vida, metabolismo e distribuição em tumores (Wang & Huang, 2020). A abordagem mais próxima da prática clínica atual seria a administração de um fármaco livre, simultaneamente, a uma nanoformulação (**Figura 6**). Há também a possibilidade de serem administradas concomitantemente dois nanosistemas, no entanto, esses nanocarreadores que carregam fármacos diferentes podem não alcançar as mesmas células, não oferecendo assim o efeito esperado. Existe ainda a abordagem de coencapsulamento, que pode ser mais eficaz em comparação com as demais na coordenação de ações dos fármacos em níveis celulares (Zhang et al., 2016)., garantindo assim, maiores chances de os fármacos alcançarem o destino simultaneamente (Wang & Huang, 2020).

**Figura 6** - Esquema com abordagens para administração combinada de dois fármacos envolvendo nanocarreadores.



Adaptado de (Zhang et al., 2016)

Os lipossomas como nanocarreadores de quimioterápicos já bem estabelecido, nesse contexto, são uma estratégia para a entrega simultânea de compostos para o local de interesse mediante o uso de um único veículo. Os lipossomas têm capacidade superior para coencapsular fármacos com diferentes hidrofobicidades e carregá-los para o mesmo local de ação (Liu et al., 2017b). Recentemente uma formulação lipossomal contendo citarabina e daunorrubicina foi aprovada pela FDA para o tratamento de leucemia mielóide aguda (Nikanjam et al., 2018).

Estudos prévios relatam a capacidade dos lipossomas de manter a combinação dos fármacos encapsulados na proporção de razão estabelecida por várias horas após administração sistêmica em camundongos (Harasym et al., 2006). Por consequência, ao encapsular uma combinação de substâncias bioativas em uma única formulação lipossomal, é possível sincronizar a farmacocinética e biodistribuição dessas substâncias além de controlar a dose dos fármacos que atingem o sítio alvo, como demonstrado na **Figura 6**. Nos últimos anos, pesquisas envolvendo a coencapsulação de agentes antitumorais nesses carreadores ganharam destaque (Franco et al., 2019; Vahed et al., 2017).

Tefas e colaboradores desenvolveram uma formulação lipossomal contendo salinomicina e DOX para o tratamento de células de carcinoma de mama. Essa formulação apresentou maior efeito na inibição do crescimento das células em relação a associação não encapsulada (Tefas et al., 2021). Liu e colaboradores (2014) desenvolveram lipossomas com proporções coencapsuladas de DOX e paclitaxel iguais a 5: 1 e 3: 3 e observaram que essas formulações tiveram melhor eficácia antitumoral, em comparação aos grupos tratados com combinações dos fármacos livres (Liu et al., 2014). Recentemente, nosso grupo de pesquisa também desenvolveu lipossomas contendo DOX e paclitaxel na proporção molar de 10:1 e foi observado melhor eficácia antitumoral em comparação com os tratamentos dos fármacos livres e eficácia semelhante em comparação com a mistura dos fármacos livres na mesma proporção molar 10:1. A grande vantagem dessa formulação foi relacionada ao seu melhor perfil de toxicidade (Franco et al., 2019b).

Existem algumas etapas que devem ser seguidas para o desenvolvimento racional de lipossomas que coencapsulam agentes anticâncer, entre elas: (1) selecionar

fármacos, preferencialmente, com diferentes mecanismos de ação, a fim de evitar resistência a múltiplos fármacos e toxicidades sobrepostas; (2) buscar ausência de interação entre os dois fármacos; (3) realizar estudo *in vitro* de sinergismo, para determinar as razões sinérgicas e antagônicas entre os fármacos; (4) coencapsular uma proporção fixa entre os fármacos. Além disso, as formulações de lipossomas coencapsulando agentes anticâncer em razões sinérgicas normalmente são obtidas por carregamento remoto de um ou de ambos os compostos, ou seja, o fármaco a ser encapsulado é introduzido no meio aquoso contendo lipossomos pré-formados (Franco & Oliveira, 2017; Gabizon et al., 2021).

A incorporação bem-sucedida de DOX e SIM em lipossomas já foi alcançada em dois trabalhos. Um estudo evidenciou que a associação desses fármacos em lipossomas induziu um efeito inibitório mais pronunciado na linhagem celular de câncer de próstata PC3, em comparação com as formas livres. Apesar disso, o estudo apresenta diversos inconvenientes, como a inadequada liberação dos fármacos (Li et al., 2019). Outro estudo, usando modelos matemáticos projetou uma formulação lipossomal com DOX e SIM que se mostrou mais nociva em células C26 de câncer de cólon murino co-cultivadas com macrófagos, quando comparada com as formas livres (Barbălată et al., 2021).

Tendo em vista os diversos estudos citados e sabendo do potencial da coencapsulação de DOX e SIM, esse trabalho propõe desenvolver uma formulação lipossomal contendo esses fármacos, uma vez que esses fármacos apresentam características físico-químicas diferentes, bem como diferentes mecanismos de ação antitumoral. O desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo essas duas substâncias torna-se interessante com a possibilidade de ampliar o efeito terapêutico e reduzir os efeitos cardiotoxicos da DOX.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencialidade de lipossomas pH-sensíveis contendo DOX e SIM para o tratamento do câncer de mama.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver lipossomas pH-sensíveis contendo DOX e SIM (SpHL-D-S) e caracterizá-los quanto a diâmetro médio, potencial zeta, índice de polidispersão das vesículas e teor de encapsulação de DOX e de SIM;
- Obter imagens de crio-microscopia eletrônica de transmissão para avaliar morfologia dos SpHL-D-S;
- Realizar estudos de estabilidade de armazenamento dos SpHL-D-S;
- Avaliar a liberação de DOX e SIM, em pH 5 e em pH 7,4, a partir da formulação SpHL-D-S;
- Avaliar a citotoxicidade dos fármacos individuais, da combinação dos fármacos livres e na forma lipossomal, nas razões molares de 1:1, 1:2 e 2:1 em linhagens celulares tumorais de mama humana (MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3);
- Avaliar e determinar a melhor razão de sinergismo entre DOX e SIM livres e coencapsulados;
- Avaliar o impacto dos diferentes tratamentos na morfologia nuclear das diferentes linhagens celulares tumorais de mama humana;
- Avaliar o efeito anti-migratório dos diferentes tratamentos nas diferentes linhagens celulares tumorais de mama humana;
- Investigar a citotoxicidade, impacto na morfologia e migração celular de diferentes razões molares de DOX e SIM livres ou encapsulados frente a linhagem de tumor de mama murino 4T1;
- Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade dos SpHL-D-S em razão molar de 1:1 administrado por via IV a camundongos BALB/c portadores de tumor de mama da linhagem 4T1 por meio de análises do volume tumoral, histopatológicas e bioquímicas.

## 4 MATERIAIS E METODOS

### 4.1 Materiais

1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)-2000 (DSPE-PEG2000) foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Hemisuccinato de colesterol (CHEMS), solução salina tamponada com fosfato (PBS), hidróxido de sódio, ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico (HEPES), sulfato de amônio e bicarbonato de sódio foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Luís, EUA). O polissorbato 80 (Tween™ 80) foi fornecido pela Croda Inc (Edison, EUA). Clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO) foram fornecidos pela Synth (São Paulo, Brasil). Cloreto de sódio e metanol grau HPLC foram adquiridos da Merck (Frankfurt, Alemanha). O cloridrato de doxorubicina (DOX) foi adquirido da ACIC Chemicals (Ontário, Canadá). A sinvastatina (SIM) foi adquirida da Fagron (São Paulo, Brasil) com pureza superior a 98,0%. A água utilizada nos experimentos foi purificada com o equipamento de destilação e deionização Milli-Q® (Millipore, MA, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

Linhagens celulares de tumor de mama humano (MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3) e tumor de mama murino (4T1) foram adquiridas pela American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA). Os meios de cultura (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM; Minimum Essential Medium, MEM e McCoy), soro fetal bovino (FBS), penicilina e estreptomicina foram obtidos da Gibco Life Technologies (Carlsbad, EUA). Sulforrodamina B (SRB), tris(hidroximetil)aminometano (base Tris) e tripsina foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e Bisbenzimidida (Hoechst 33342) (Thermo Fisher Scientific - Waltham, USA).

### 4.2 Preparo dos lipossomas

Formulações lipossomais sem fármacos (SpHL) e contendo SIM (SpHL-S) foram preparadas pela técnica de hidratação do filme lipídico. Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000 (razão molar 5,8:3,7:0,5, respectivamente; concentração lipídica total de 20 mM) foram transferidas para um balão de fundo redondo. Para SpHL-S, solução clorofórmica de SIM (1 mg/mL) foi adicionada aos lipídios. O solvente foi removido sob pressão reduzida utilizando um Buchi

Labortechnik AG Rotator CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo V-700 da mesma marca (Flawil, Suíça). Após a evaporação total do solvente, adicionou-se NaOH aos filmes lipídicos na proporção molar NaOH:CHEMS 1:1, seguido da adição de solução de sulfato de amônio pH 7,4 sob agitação vigorosa.

O diâmetro das vesículas lipossomais foi calibrado pela técnica de ultrassom (modelo CPX 500; 500W, Cole-Parmer Instruments, Vernon Hills, IL, EUA), utilizando-se uma haste Stepped microtip S&M 630-0418, com 21% de amplitude, por 5 minutos, em banho de gelo. As preparações foram purificadas para eliminar o sulfato de amônio externo por meio de ultracentrifugação (Ultracentrifuge Optima® L-80XP, Beckman Coulter, Brea, EUA) a 150.000 x g, 4°C, por 120 min. Os pellets foram ressuspensos com solução de NaCl 0,9% (p/v), mantendo a concentração lipídica inicial.

Para o preparo de lipossomas contendo DOX, SpHL ou SpHL-SIM foram incubados com solução de DOX (1 ou 2mg/mL) por 2 horas a 4°C, e o encapsulamento foi realizado pelo método de gradiente de sulfato de amônio transmembrana para obter a dispersão final de SpHL-D e SpHL-D-S, respectivamente.

### **4.3 Caracterização físico-química de lipossomas**

#### ***4.3.1 Diâmetro da vesícula, Índice de Polidispersidade (IP) e Potencial Zeta***

O diâmetro médio das vesículas e o índice de polidispersão (IP) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) a 25°C e ângulo fixo de 90°. O potencial zeta foi determinado pela mobilidade eletroforética associada ao DLS. Todas as amostras foram diluídas em solução de NaCl a 0,9% (p/v) na proporção de 1:100 (v/v) e medidas foram realizadas usando o equipamento Zetasizer NanoZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

#### **4.4 Determinação do conteúdo DOX e SIM**

A quantificação de DOX e SIM foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para a determinação de DOX, as condições experimentais foram: fase móvel composta por metanol e tampão fosfato pH 3,0 (65:35 v/v) em uma coluna ACE® C8 25 cm x 4,6 mm com tamanho de partícula de 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha), volume de injeção de 20 µL, fluxo da fase móvel igual a 1,0 mL/min e a detecção foi realizada à temperatura ambiente com um detector de fluorescência modelo 2475

(Waters Instruments, Milford, MA, EUA) em comprimentos de onda de excitação e emissão de 470 nm e 555 nm, respectivamente.

A quantificação da SIM foi realizada no equipamento Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, EUA) utilizando uma fase móvel composta por metanol e solução de ácido fosfórico a 0,1% (90:10 v/v), coluna de fase reversa C18 25 cm x 4,6 mm e tamanho de 5 µm (LichroCar, Merck, Alemanha). Foi utilizado o volume de injeção de 10 µL, vazão de 1,0 mL/min e detecção com detector de arranjo de diodos G4212B (Santa Clara, EUA) em comprimento de onda de 238 nm e temperatura ambiente.

O preparo da amostra consistiu na ruptura da membrana lipídica com metanol 1:5 v/v, respectivamente, seguida de diluição na respectiva fase móvel. As formulações lipossomais foram quantificadas antes (lipossomas não purificados) e após a purificação (lipossomas purificados) e a porcentagem de encapsulação (PE) foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$PE (\%) = \frac{[\text{Fármaco}] \text{ lipossomas purificados}}{[\text{Fármaco}] \text{ lipossomas não purificados}} \times 100$$

#### 4.5 Liofilização

A liofilização foi realizada nas formulações SpHL-S previamente à adição de DOX. Os lipossomas SpHL-S foram preparados como descrito acima, exceto para a etapa de remoção de sulfato de amônio em que a diálise contra solução salina tamponada com HEPES pH 7,4 foi realizada.

Em seguida, as formulações foram transferidas para frascos âmbar e crioresistentes contendo glicose como crioprotetor na relação açúcar:lipídio de 2:1 (p/p). Os frascos foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados em um ciclo de 24 horas usando um liofilizador Modulo (Thermo Electron Corporation, EUA). Após o ciclo de liofilização, os frascos foram selados a vácuo e armazenados ao abrigo da luz em temperatura de -15 a -20°C.

No momento do uso, o lipossoma liofilizado foi reconstituído com água ultrapura. Após determinação da concentração de SIM nestes lipossomas por CLAE, a DOX foi incubada a fim de se obter SpHL-D-S em uma razão 2:1. Essa proporção foi definida

em função dos melhores resultados encontrados frente às linhagens de câncer de mama humano e foi utilizada nos demais experimentos de caracterização físico-química apresentados nesse trabalho.

#### **4.6 Crio-microscopia eletrônica de transmissão**

As imagens SpHL-D-S 2:1 foram obtidas por crio-microscopia eletrônica de transmissão (crio-TEM) usando um microscópio eletrônico FEI Tecnai Spirit G2-12 (FEI, Hillsboro, OR, EUA) operando a 120 kV. Uma alíquota de 3  $\mu$ L da amostra foi depositada em uma grade de carbono, previamente descarregada. As grades foram secas com papel filtro por 5 s e vitrificadas por imersão em etano líquido. As amostras vitrificadas foram armazenadas sob nitrogênio líquido antes de serem transferidas para o microscópio eletrônico.

#### **4.7 Estabilidade de armazenamento**

Para determinar o tempo de armazenamento, SpHL-D-S na razão molar de 2:1 foram mantidos em atmosfera de nitrogênio e protegidos da luz a 4-8°C na forma de dispersão lipossomal. Após 0, 7, 14, 30, 60 e 90 dias de preparo, alíquotas foram coletadas e as características físico-químicas foram medidas conforme mencionado acima.

Além disso, SpHL-S na forma liofilizada foram armazenados a temperatura de -15 a -20°C e nos dias 0, 7, 14, 30, 60 e 90 dias de preparo foram ressuspensos e incubados com DOX e avaliados quanto às características físico-químicas previamente mencionadas. Em ambos os estudos, os valores médios obtidos nos diferentes tempos foram comparados com os obtidos no tempo zero.

#### **4.8 Estudo de liberação**

O estudo de liberação foi realizado em pH 7,4 e 5,0 (corrigido pela adição de ácido clorídrico 1 mol/L). Alíquotas de 1 mL de SpHL-D-S 2:1 foram transferidas em uma membrana de diálise de tamanho de poro igual a 10 KDa (Sigma, EUA) com extremidades seladas. A membrana de diálise foi colocada em um frasco âmbar contendo 100 mL de tampão HEPES acrescido de Tween 80 (0,1% p/v) para garantir a condição Sink para ambos os fármacos. Os frascos foram mantidos sob agitação a 156 rpm e 37 °C em uma incubadora controle IKA KS 4000 i (Xangai, China). A cada

tempo de investigação (0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas), uma amostra foi retirada e caracterizada quanto aos parâmetros de diâmetro médio, IP e conteúdo de liberação. Para o último parâmetro, a quantificação de DOX e SIM foi avaliada por CLAE, e os dados foram plotados como porcentagens cumulativas de liberação do fármaco ao longo do tempo para três experimentos independentes avaliados.

#### **4.9 Cultura de células**

Células de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR-3 foram cultivadas em DMEM, MEM suplementado com 0,01 mg/mL de insulina e meio McCoy, respectivamente, e linhagem de câncer murino 4T1 foi cultivada em RPMI. Todos os meios foram suplementados com 10% de FBS. As linhagens celulares foram cultivadas na presença de penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada. Antes dos experimentos, todas as linhagens celulares foram rastreadas quanto à contaminação por micoplasma por meio de teste de reação em cadeia da polimerase (PCR), com resultados negativos.

#### **4.10 Estudos de citotoxicidade**

A viabilidade das células tumorais foi medida usando o ensaio de sulforrodamina B (SRB). As células MDA-MB-231, MCF-7 ou SK-BR-3 foram semeadas em placas de 96 poços (1 × 10<sup>4</sup> células/poço), enquanto as células 4T1 foram plaqueadas em uma densidade de 5 × 10<sup>3</sup> células/poço. Após 24 h de incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, DOX livre, SIM livre, DOX:SIM livre em razões molares de 1:1, 1:2 ou 2:1, SpHL-D, SpHL-S ou SpHL-D-S em razões molares de 1:1, 1:2 ou 2:1, foram adicionados aos poços. A DOX foi dissolvida em solução NaCl 0,9% (p/v) enquanto a SIM livre foi dissolvida em DMSO, sendo a concentração desse solvente inferior a 1% v/v em todos os tratamentos realizados. Após 48 h de incubação, ácido tricloroacético (TCA) a 10% foi adicionado a cada poço para fixar as células por 1 h. As placas foram então lavadas com água ultrapura para remover o TCA e em seguida, foram coloradas com SRB por 30 min. Após esse período, as placas foram lavadas com 1% v/v de ácido acético para remover o corante não ligado e por fim, foi adicionada solução de Tris-Base 10 mM (pH 10,5) para solubilizar o corante ligado à proteína. A densidade óptica foi lida a 510 nm usando um espectrofotômetro de microplacas Spectra Max Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA). Os valores de absorbância obtidos dos poços

nos quais as células foram mantidas apenas no meio de cultura, sem tratamento, foram considerados como 100% de viabilidade celular para cálculo da porcentagem de alteração da viabilidade induzida pelos tratamentos. Os resultados foram plotados como porcentagem de viabilidade celular *versus* concentração. A partir desses dados foi determinado o valor de  $CI_{50}$ , que corresponde à concentração dos fármacos capaz de induzir 50% de morte celular.

#### **4.11 Determinação do Índice de Combinação (IC)**

Para as diferentes razões molares das formas livre ou lipossomal de DOX:SIM, a porcentagem de células viáveis foi submetida à análise de efeito e os valores do índice de combinação (IC) foram determinados usando CalcuSyn® (Biosoft, Ferguson, MO, EUA). O software CalcuSyn® permite a simulação de sinergismo e antagonismo em todos os níveis de dose e efeito usando o algoritmo de efeito mediano. Os valores adotados para determinação dos efeitos foram: efeito sinérgico,  $IC < 0,9$ ; efeito aditivo  $IC$  entre 0,9 e 1,45 e efeito antagônico  $IC > 1,45$  (Chou, 2006).

#### **4.12 Análises morfométricas nucleares (NMA)**

Para avaliar as alterações morfológicas nucleares após os tratamentos, as diferentes linhagens celulares foram plaqueadas a uma densidade de  $2,0 \times 10^5$  células/poço em placas de 6 poços e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com 2 mL dos mesmos tratamentos utilizados para o estudo de viabilidade celular (DOX, SIM e a combinação de DOX:SIM 1:1; 1:2 ou 2:1 nas formas livre e encapsulada) todos tratamentos a uma concentração total de 80 nM. Após 48 h de incubação, as células foram fixadas com formaldeído a 4% por 10 minutos e coradas com Hoescht 33342 (0,2 µg/mL), por 10 minutos, à temperatura ambiente e mantidas em ambiente escuro. As imagens fluorescentes dos núcleos foram capturadas usando um microscópio AxioVert 25 com um módulo de fluorescência Fluo HBO 50 conectado à câmera Axio Cam MRC (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A análise foi realizada em 300 núcleos por tratamento, utilizando o software Image J 1.50i (National Institutes of Health, Bethesda, EUA) e o plugin “NII\_Plugin” disponível em <http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/>. A partir dessa análise foi possível extrair dados para classificar núcleos em populações: normal (N), irregular (I), pequeno e regular (SR) e grande e regular (LR). Essas alterações na morfologia nuclear podem sugerir células em estágios apoptóticos ou em senescência.

#### 4.13 Teste de migração

Para estudar a migração bidimensional (2D), as células foram plaqueadas a uma densidade de  $2,0 \times 10^5$  células/poço em placas de 12 poços e incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, uma ferida reta foi feita em poços individuais com uma ponta de pipeta de 10 µL. Este ponto foi considerado a “ferida zero” e foi fotografado usando um microscópio AxioVert 25 com uma câmera Axio Cam MRC acoplada (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Após a obtenção das feridas, os poços receberam 1 mL de meio com 1% de FBS contendo os diferentes tratamentos (DOX, SIM e a combinação de DOX:SIM 1:1; 1:2 ou 2:1 no livre e encapsulada) todos a uma concentração total de 80 nM. A concentração de 80 nM foi fixada arbitrariamente, afim de garantir uma quantidade suficiente de células para serem fotografadas ao microscópio. Após 24 h de incubação a 37 °C, as células foram fixadas com formaldeído a 4%, por 10 minutos. Imagens ao longo das “feridas tratadas” também foram obtidas em contraste de fase. As áreas de todas as feridas foram obtidas usando o *plugin MRI Wound Healing Tool* para a versão gratuita do software Image J 1.45 (National Institutes of Health, Bethesda, EUA). A porcentagem de migração foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de migração (\%)} = 100 - \frac{\text{área ferida tratada} \times 100}{\text{área ferida zero}}$$

#### 4.14 Estabilidade biológica *in vitro*

A estabilidade biológica *in vitro* de SpHL-D-S foi investigada na razão molar 1:1 (razão escolhida em função dos melhores resultados encontrados frente à linhagem de câncer de mama murino) foi investigada em diferentes fluidos para simular o comportamento das vesículas em ensaios biológicos (*in vitro* e *in vivo*). O SpHL-D-S 1:1 foi diluído 4 vezes em NaCl (0,9% p/v), meio de cultura RPMI suplementado com 10% (v/v) de SFB e plasma murino. SpHL-D-S 1:1 não diluído também foi avaliado como controle do estudo.

As preparações e controle foram incubados a 37°C sob agitação de 156 RPM, por 24h. Em tempos pré-determinados, alíquotas foram coletadas e análise de tamanho e IP foram realizadas, conforme descrito anteriormente.



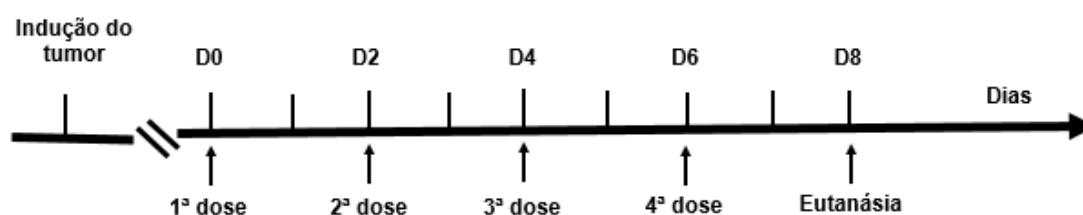
#### 4.15 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas (18–22 g) foram obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG). Os camundongos foram alojados em gaiolas de plásticos com livre acesso à comida e água e mantidos em estantes ventiladas em ambiente com controle de ciclo de luz e temperatura. Todos os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o protocolo número CEUA 190/2021.

#### 4.16 Atividade antitumoral

Para o estabelecimento do tumor de mama xenográfico nos animais, uma suspensão de células 4T1 ( $1 \times 10^6$  células/mL) foi preparada em tampão fosfato (PBS). Alíquotas de 100  $\mu$ L dessa suspensão foram injetadas por via subcutânea no flanco direito dos camundongos BALB/c com seringa de insulina e agulha 13mm x 0,33mm. Sete dias após a indução do tumor, quando o volume do tumor atingiu, aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos (n = 8 para cada grupo) como representado na **Tabela 2**. Para os tratamentos dos grupos B ao G, os animais receberam as doses de DOX e/ou SIM conforme descrito na **Tabela 2**, em um total de quatro administrações, a cada dois dias pela veia da cauda (**Figura 7**). As soluções dos fármacos livres foram preparadas imediatamente antes da injeção. A DOX foi dissolvida em solução NaCl 0,9% (p/v) na concentração de 2 mg/mL. Para o preparo de SIM, inicialmente o fármaco foi solubilizado em 10% polietilenoglicol 400 e álcool etílico 96° GL (10:1). Essa solução foi então diluída em NaCl 0,9% (p/v), obtendo assim a solução final (0,5 mg/mL). A razão molar escolhida foi DOX/SIM 1:1, em função dos melhores resultados encontrados frente à linhagem de câncer de mama murino.

**Figura 7** Esquema do protocolo experimental



Ao longo do estudo, os tumores foram medidos com um paquímetro (Mitutoyo, MIP/E-103) a cada dois dias, desde o primeiro dia de tratamento (D0) até dois dias após a última administração (D8). O volume tumoral (VT) foi calculado a partir da seguinte equação, em que d1 e d2 são o menor e o maior diâmetro, respectivamente:

$$VT = (d1)^2 \times d2 \times 0,5$$

O volume relativo do tumor (VRT) foi calculado com a equação:

$$VRT = \frac{VT \text{ em } D8}{VT \text{ em } D0}$$

No D8 os camundongos foram anestesiados, usando cetamina e xilazina (80 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente) e, em seguida, eutanasiados por exsanguinação. O sangue coletado na presença de EDTA foi utilizado para avaliação de parâmetros bioquímicos de função cardíaca, renal e hepática. Tumor primário, pulmões, coração, rins e fígado foram coletados para análise histopatológica.

**Tabela 2** Doses dos fármacos a cada administração dos diferentes tratamentos por via IV a camundongos BALB/c fêmeas transplantados subcutaneamente com células de câncer de mama 4T1.

Grupo	Tratamento	Dose
A (Controle)	SpHL branco	–
B	SIM livre	3,85 mg/kg
C	SpHL-S	3,85 mg/kg
D	DOX livre	5 mg/kg
E	SpHL-D	5 mg/kg
F	DOX:SIM (1:1)	DOX 5 mg/kg + SIM 3,85 mg/kg
G	SpHL-D-S (1:1)	DOX 5 mg/kg + SIM 3,85 mg/kg

#### 4.17 Análise histopatológica

Tumor, pulmões, coração, rins e fígado foram armazenados em formol tamponado a 10% (v/v) por 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em álcool e incluídas em blocos de parafina, seccionados com espessura de 5 µm, colocados em lâminas de vidro e corados com hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram avaliadas pelo Prof. Dr. Geovanni Cassali, do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas e as imagens foram capturadas por uma câmera conectada a um microscópio óptico Olympus BX-40 (Olympus - Tóquio, Japão). O número de focos

de metástase nos pulmões foi contado em animais individuais e expresso pelo seguinte escore semiquantitativo: 0, nenhuma metástase detectada; +, 1–3 focos metastáticos; ++, 4–7 focos metastáticos; +++ , 8–10 focos metastáticos; +++ +, > 10 focos metastáticos nos pulmões.

#### **4.18 Avaliação de toxicidade**

A toxicidade dos diferentes tratamentos foi observada avaliando as mudanças no peso corporal, mortalidade e parâmetros bioquímicos. O peso corporal dos camundongos foi monitorado a cada 2 dias, juntamente com o tratamento até a eutanasia. As variações de peso foram expressas como a porcentagem de variação em relação ao peso corporal inicial.

Para as análises bioquímicas, no último dia do estudo, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo anticoagulante (0,1 % p/v EDTA). O sangue total coletado foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 min. O plasma obtido foi utilizado para a quantificação dos parâmetros hepáticos, renais e cardíacos. Para a determinação da função hepática foram realizadas dosagens de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST). A nefrotoxicidade foi determinada mediante medidas da concentração de uréia e creatinina. A função cardíaca foi avaliada por meio da dosagem de creatino quinase isoforma MB (CK-MB). Todos os testes bioquímicos foram realizados mediante análise espectrofotométrica em analisador semiautomático modelo Bioplus BIO-2000 (São Paulo, Brasil) utilizando kits comerciais (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) e seguindo o método preconizado pelos fornecedores.

#### **4.19 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Software Prism (versão 6.00, La Jolla, Califórnia, EUA). A normalidade e a homocedasticidade da variância foram testadas por D'Agostino e Pearson e Brown-Forsythe, respectivamente. Variáveis sem distribuição normal foram transformadas [ $\log(x+1)$ ]. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey. Os estudos *in vitro* de morfologia nuclear foram avaliados por Two-way, seguido de teste Bonferroni. As diferenças foram

consideradas significativas quando o valor de  $p$  foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SD de pelo menos três experimentos independentes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão do documento foi dividida em dois capítulos que representam uma possível organização dos dados para apresentação de dois artigos científicos, a saber:

Capítulo I: Estudo do potencial antitumoral da associação de doxorubicina e sinvastatina livres ou coencapsuladas em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada: Avaliação *in vitro* frente linhagens celulares de câncer de mama humano.

Esse primeiro capítulo aborda as etapas de desenvolvimento e caracterização química e físico-química da formulação lipossomal coencapsulando DOX e SIM bem como a avaliação da atividade antitumoral *in vitro* utilizando linhagens celulares de câncer de mama humano, as quais representam diferentes perfis de expressão gênica. Essas diferenças podem implicar em resposta diferente ao tratamento quimioterápico, o que justifica, portanto, a escolha dessas linhagens celulares.

Capítulo II: Investigação da atividade antitumoral de lipossomas pH-sensíveis coencapsulando doxorubicina e sinvastatina em um modelo murino de câncer de mama triplo negativo.

O segundo capítulo apresenta os dados de avaliação de atividade e eficácia antitumoral em modelo de tumor de mama murino da linhagem 4T1, o qual representa um tumor de mama murino triplo negativo. Estudos mostram que esse modelo 4T1 apresenta considerável semelhança ao câncer de mama humano, uma vez que demonstra uma disseminação progressiva com capacidade de promover a metastatização para sítios distintos do organismo (DuPre´ et al., 2007).

## CAPÍTULO I:

### **ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DA ASSOCIAÇÃO DE DOXORRUBICINA E SINVASTATINA LIVRES OU COENCAPSULADAS EM LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA: AVALIAÇÃO *IN VITRO* FRENTE À LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA HUMANO.**

Embora a quimioterapia tenha desempenhado um papel central no tratamento do câncer de mama, a capacidade dos fármacos de matar as células cancerígenas com dano mínimo ao tecido saudável é um dos principais requisitos para o sucesso da terapia do câncer. Sabe-se que a maioria dos quimioterápicos, como a DOX, causa efeitos adversos, potencialmente fatais ao paciente. O efeito tóxico mais relevante e, por vezes, irreversível da DOX é a cardiomiopatia. Para melhorar o perfil de segurança desse fármaco antineoplásico, o encapsulamento em nanocarreadores lipossomais tem sido considerado uma alternativa promissora, pois pode promover um aumento na seletividade do fármaco, uma vez que, se acumula preferencialmente no tecido alvo, reduzindo os danos aos tecidos saudáveis. O medicamento comercializado com o nome de Doxil® foi a primeira formulação lipossomal aprovada para o tratamento do câncer de mama e mostrou ser capaz de minimizar a cardiotoxicidade e a mielossupressão induzidas pela DOX. Apesar dessas vantagens, ainda há relatos de toxicidade cardíaca em 11% dos pacientes tratados com essa medicação. Nosso grupo de pesquisa mostrou que lipossomas pH-sensíveis compostos de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG carregando DOX associados a outras substâncias com potencial antitumoral são benéficos em comparação com formulações lipossomais semelhantes ao Doxil® (Boratto et al., 2020; Silva et al., 2019).

Estudos recentes também relataram que a SIM apresenta atividade anticancerígena, uma vez que, pode influenciar a proliferação, migração e sobrevivência das células cancerígenas. Há também indícios de fatores protetores durante a quimioterapia do câncer em pacientes que usam SIM (Di Bello et al., 2020).

Com base nesses dados, no presente trabalho foi proposto o encapsulamento de SIM e DOX em lipossomas pH-sensíveis com o objetivo de aumentar a eficácia antitumoral

e diminuir a cardiotoxicidade. Aqui, relatamos o desenvolvimento e caracterização físico-química desta formulação, bem como o efeito da exposição de células de câncer de mama humano (MDA-MB-231, MCF-7 e SK-BR-3) a diferentes proporções dos fármacos.

### **1 Desenvolvimento de formulação e caracterização físico-química**

Primeiramente, avaliou-se a capacidade da bicamada lipídica em acomodar adequadamente a SIM, preparando formulações contendo apenas este fármaco (SpHL-S) na concentração de 1 mg/mL. Os dados demonstraram valores adequados das características físico-químicas compatíveis com formulações monodispersas e um teor de encapsulação próximo de 80%, sugerindo uma potencial associação de SIM ao sistema. Na sequência, formulações contendo ambos os fármacos foram preparadas em diferentes concentrações. As características físico-químicas dessas formulações lipossomais estão resumidas na **Tabela 1**.

Todas as formulações apresentaram valores médios de diâmetro variando de 110 a 150 nm, o que pode permitir alta entrega de DOX e SIM na região tumoral. Além disso, apresentam IP inferior a 0,3 e potencial zeta próximo a -3,0 mV, o que sugere, respectivamente, homogeneidade adequada e potencial reduzido para interação com proteína plasmática quando injetados por via intravenosa. Nesse último caso, os dados estão de acordo com o esperado para formulações contendo PEG em sua bicamada (Barbălată et al., 2021).

Não houve diferença significativa entre SpHL e SpHL-D para todos os parâmetros avaliados, e os valores obtidos foram consistentes com os relatados anteriormente (Franco et al., 2019; Roque et al., 2019). Em relação ao SpHL-S, não foi observada diferença significativa no IP e potencial zeta em relação ao SpHL e SpHL-D; entretanto, os valores médios do diâmetro das vesículas foram significativamente maiores. Este fato pode ser atribuído à natureza hidrofóbica da SIM que favorece sua interação com a bicamada lipídica e aumenta o tamanho das vesículas (M. J. Chen et al., 2018). Esta possível deformação elástica dos lipossomas estaria de acordo com a teoria da elasticidade das bicamadas lipídicas proposta por Helfrich (Helfrich, 1973). O tamanho vesicular, IP e potencial zeta não foram afetados nas formulações

contendo os dois fármacos em comparação com SpHL-S, em nenhuma das razões molares analisadas.

Em relação à eficiência de encapsulação, foram obtidos valores próximos a 100% e acima de 60% para DOX e SIM, respectivamente, nas diferentes razões molares estudadas. Para a SIM, os dados evidenciaram que um aumento na concentração não resultou em um aumento proporcional do fármaco encapsulado, sugerindo a possibilidade de saturação da bicamada. A eficiência de encapsulação na 2 mg/mL foi cerca de 16% menor em comparação com 1 mg/mL. Por outro lado, não foi observada diferença significativa após a encapsulação de DOX em todas as formulações avaliadas, demonstrando que a coencapsulação de SIM não alterou a capacidade do sistema lipossomal de carrear DOX. Os valores de razão molar (DOX: SIM) calculados para formulações contendo ambos os fármacos foram iguais a 1:1, 1:1,7 e 1,2:1 quando as formulações foram preparadas com 1mg/mL de cada fármaco, 1 mg/mL de DOX e 2 mg/mL de SIM, e 2 mg/mL de ambos os ativos, respectivamente.



**Tabela 1** Características físico-químicas (diâmetro, IP, potencial zeta, PE e concentração do fármaco) para as diferentes formulações lipossomais contendo os fármacos individuais ou coencapsulados.

Formulações	[Fármaco]* teórico (mg/mL)		Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	[Fármaco]* experimental (mg/mL)		PE (%)		Razão molar DOX:SIM
	DOX	SIM				DOX	SIM	DOX	SIM	
SpHL	0	0	113 ± 9	0,07 ± 0,03	-3,5 ± 0,80	-	-	-	-	-
SpHL-D	0	1	123 ± 5	0,12 ± 0,03	-3,6 ± 0,90	0,99 ± 0,02	-	99 ± 0,1	-	-
SpHL-S	0	1	139 ± 2,6 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,02	-3,72 ± 0,17	-	0,76 ± 0,06	-	76 ± 6	-
SpHL-D-S	1	1	145 ± 3,7 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,03	-3,63 ± 0,14	0,98 ± 0,01	0,74 ± 0,05	98 ± 0,5	74 ± 0,5	1:1
	1	2	140 ± 1,1 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,06	-3,39 ± 0,44	0,97 ± 0,01	1,26 ± 0,02	98 ± 0,5	63 ± 1,2	1:1,7
	2	2	147 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02	-3,33 ± 0,32	1,97 ± 0,01	1,28 ± 0,02	99 ± 0,3	64 ± 0,7	1,2:1

<sup>a</sup> Representa uma diferença significativa em relação à formulação contendo SpHL e SpHL-D. \*Concentração expressa em mg/mL. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). n=3.

Com base nesses resultados, definiu-se a concentração inicial de SIM em 1mg/mL para preparar todas as formulações contendo os fármacos coencapsulados nas razões molares DOX:SIM 1:1, 1:2 e 2:1 para serem utilizadas nas avaliações *in vitro*. As mesmas investigações físico-químicas foram realizadas (**Tabela 2**) e não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados em comparação àqueles apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 2** Características físico-químicas para as diferentes formulações.

Razão molar SpHL-D-S	Diâmetro médio (nm)	IP	Zeta potencial (mV)	[DOX] (mg/mL)	[SIM] (mg/mL)
1:1	139 ± 2,6	0,22 ± 0,03	-3,39 ± 0,28	0,93 ± 0,06	0,72 ± 0,05
1:2	140 ± 1,3	0,19 ± 0,02	-3,56 ± 0,55	0,50 ± 0,07	0,76 ± 0,04
2:1	136 ± 6,9	0,21 ± 0,04	-3,68 ± 0,76	1,97 ± 0,11	0,77 ± 0,10

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). n=3.

## 2 Viabilidade celular e análise de sinergismo

Sabe-se que o câncer de mama apresenta múltiplos subtipos com morfologias e implicações clínicas distintas. Evidências sugerem que diferenças histopatológicas e biológicas levam a diferentes respostas ao tratamento; assim, estratégias terapêuticas distintas podem ser necessárias. Os marcadores imuno-histoquímicos clássicos incluem receptores hormonais como o receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) ou outras proteínas (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, HER2) e permitem distinguir subtipos como luminal A e B (ER+/PR+/HER2- ou ER+ /PR-/HER2-) e câncer de mama triplo negativo do tipo basal (ER-/PR-/HER2) (Yousefnia et al., 2019).

No presente estudo, o ensaio de SRB foi escolhido para investigar a citotoxicidade e triagem de sinergismo, efeito aditivo ou antagonismo entre DOX e SIM nas formas livres ou coencapsuladas em diferentes subtipos de células de câncer de mama humano, sendo selecionadas duas linhagens celulares de subtipo luminal, sendo MCF-7 (ER+/PR+/HER2-) e SK-BR-3 (ER-/PR-/HER2+) e uma linhagem celular de subtipo basal, MDA-MB-231 (ER-/PR-/HER2-) (Park et al., 2012).

Todas as três linhagens celulares testadas foram sensíveis ao tratamento com DOX e SIM. No entanto, DOX apresentou maior citotoxicidade do que SIM, como pode ser observado pelos valores da concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) sumarizados na **Tabela 3**.

Para a linhagem MDA-MB-231, foi possível observar que a combinação de DOX:SIM livre na razão molar de 2:1 foi duas vezes mais citotóxica do que a DOX em monoterapia e a associação na razão molar de 1:1. Além disso, a combinação dos fármacos levou a um efeito inibitório significativamente maior do que a monoterapia com SIM em todas as combinações propostas (1:1, 1:2 e 2:1). A encapsulação de DOX em lipossomas pH-sensíveis não alterou, significativamente, sua citotoxicidade frente à MDA-MB-231 em comparação com a forma livre. A análise de SpHL-D-S em razões molares 1:2 e 2:1 demonstrou efeitos citotóxicos mais pronunciados (cerca de 2,1 e 2,4 vezes, respectivamente) do que SpHL-D e SpHL-S. No entanto, não houve diferença significativa entre as três razões molares avaliadas na forma lipossomal. Wu e colaboradores, sugeriram que o tratamento com SIM induziu apoptose e inibiu a proliferação por desregulação das cascatas de caspases (Wu et al., 2009). Wang e colaboradores também observaram que a SIM aumentou a atividade da caspase-3 de forma dose-dependente, após 48 h de tratamento frente à célula MDA-MB-231 (T. Wang et al., 2016).

A linhagem celular SK-BR-3 foi a linhagem mais sensível ao tratamento com DOX e SIM, demonstrado pelos valores de  $CI_{50}$  inferiores aos obtidos para MDA-MB-231. Estudos prévios reportam que as células MDA-MB-231 são mais eficientes na reparação de lesões de DNA induzidas por DOX devido a presença de p53 mutante, isso poderia explicar a diferença de sensibilidade entre as linhagens (S Ramadan et al., 2020). Ao contrário do observado para MDA-MB-231, a combinação dos fármacos não aumentou a atividade citotóxica da DOX tanto na forma livre quanto na forma coencapsulada para a linhagem SK-BR-3. Isso poderia ser explicado pela presença do fator nuclear NF- $\kappa$ B que é descrito como regulador de processos como a proliferação celular e associado ao aumento da agressividade e do potencial metastático em carcinomas (Karin, 2006). Campbell e colaboradores relataram que as estatinas lipofílicas inibiram a proliferação celular de maneira mais efetiva em

linhagens de células de câncer de mama que apresentaram níveis endógenos mais elevados de NF- $\kappa$ B, como é o caso das linhagens triplo negativas (Campbell et al., 2006).

Para a linhagem MCF-7, foi detectada menor sensibilidade comparada às demais linhagens avaliadas, principalmente após os tratamentos com as formulações lipossomais. Vale ressaltar que o grupo controle (SpHL) não apresentou efeitos na viabilidade celular e foi semelhante às células não tratadas, indicando toxicidade insignificante dos excipientes da formulação (dados não apresentados). Não houve diferença significativa entre a DOX livre e a combinação DOX:SIM na forma livre em todas as razões molares avaliadas. No entanto, a coencapsulação de DOX e SIM em 1:1 e 1:2 reduziu significativamente a atividade citotóxica em comparação com SpHL-D. Isso poderia ser explicado devido a menor sensibilidade de células ER positivas às estatinas lipofílicas (Campbell et al., 2006). Além disso, as células MCF-7 são deficientes na expressão de caspase-3 o que possivelmente contribui para a menor sensibilidade à SIM (Wang et al., 2016).

**Tabela 3** Valores de  $CI_{50}$  obtidos para as linhagens celulares tumorais de mama, expostas a diferentes proporções de DOX e SIM na forma livre ou coencapsulada em lipossomas, por 48 horas.

Tratamentos	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)		
	MDA-MB-231	SK-BR-3	MCF-7
DOX	0,80 $\pm$ 0,19	0,20 $\pm$ 0,07	0,71 $\pm$ 0,14
SIM	1,53 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	0,85 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	1,95 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>
DOX:SIM (1:1)	0,96 $\pm$ 0,27 <sup>b,e</sup>	0,33 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	1,15 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>
DOX:SIM (1:2)	0,71 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>	0,19 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,91 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>
DOX:SIM (2:1)	0,44 $\pm$ 0,07 <sup>a,b</sup>	0,19 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,99 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
SpHL-D	0,73 $\pm$ 0,14	0,32 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,32
SpHL-S	0,86 $\pm$ 0,23	0,83 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	4,28 $\pm$ 0,99 <sup>c</sup>
SpHL-D-S (1:1)	0,47 $\pm$ 0,24	0,35 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	3,98 $\pm$ 0,87 <sup>c,f</sup>
SpHL-D-S (1:2)	0,35 $\pm$ 0,12 <sup>c,d</sup>	0,35 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>	2,39 $\pm$ 1,07 <sup>c,d,f</sup>
SpHL-D-S (2:1)	0,31 $\pm$ 0,08 <sup>c,d</sup>	0,23 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>	0,87 $\pm$ 0,34 <sup>d</sup>

Dados expressos como média  $\pm$  DP. As letras representam diferença significativa em comparação com: <sup>a</sup>DOX livre, <sup>b</sup>SIM livre, <sup>c</sup>SpHL-D, <sup>d</sup>SpHL-S e <sup>e</sup>DOX:SIM (2:1), <sup>f</sup>SpHL-D-S (2:1). Diferença significativa foi considerada para valores  $p < 0,05$  (teste de Tukey).

Em conjunto, os dados de viabilidade celular sugerem que a combinação de DOX e SIM 2:1, seja na forma livre ou coencapsulada em lipossomas, apresentou melhor resultado frente a linhagem celular MDA-MB-231, mas não se observou ganhos dessa combinação em relação às demais linhagens celulares.

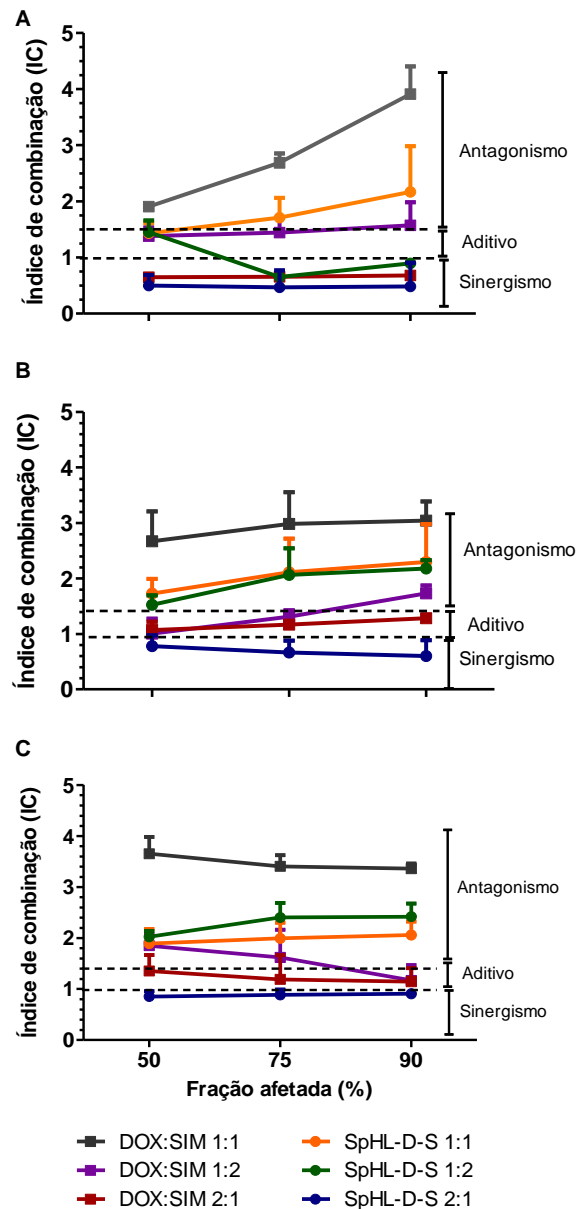
A **Figura 1** mostra os índices de combinação (IC) obtidos para os diferentes tratamentos frente as linhagens celulares MDA-MB-231, SK-BR-3 e MCF-7, em três concentrações de inibição (50, 75 e 90% das células). Para MDA-MB-231, a combinação de DOX e SIM 2:1 mostrou um potencial efeito sinérgico nas formas livre e coencapsulada (**Figura 1A**). Os valores de IC para DOX:SIM 2:1 e SpHL-D-S 2:1 foram, respectivamente, aproximadamente 0,7 e 0,5 para todas as concentrações de inibição celular analisadas. Além disso, o tratamento SpHL-D-S 1:2 foi parcialmente sinérgico, apresentando um IC próximo a 0,9 para maiores frações de inibição 75 e 90% enquanto o tratamento com DOX:SIM 1:2 livre apresentou efeito aditivo.

O efeito sinérgico também foi observado para SK-BR-3 após tratamento DOX:SIM 2:1 coencapsulado em lipossomas, apresentando IC entre 0,6 e 0,77, dependendo da fração afetada. Por outro lado, a mesma razão molar dos fármacos livres resultou em efeito aditivo com IC variando de 1,0 a 1,3 (**Figura 1B**). Resultados semelhantes foram obtidos para a linhagem celular MCF-7. Os valores de IC obtidos para DOX:SIM 2:1 nas formas lipossomal e livre foram 0,8-0,9 e 1,1-1,3, respectivamente (**Figura 1C**). A associação de fármacos na proporção de 1:1 na forma livre ou coencapsulada em lipossomas levou ao antagonismo (IC próximo a 2) para todas as linhagens celulares investigadas.

Estudos anteriores também relataram que a SIM tem um efeito citotóxico potente, resultando na morte de linhagens celulares de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 (O'Grady et al., 2022; Rezano et al., 2021). A atividade citotóxica da SIM pode estar relacionada aos seus efeitos moduladores sobre as espécies reativas de oxigênio (ROS) que desempenham um papel fundamental na proliferação de células cancerígenas (Barbălată et al., 2021). Além disso, sabe-se que as células cancerosas geralmente apresentam altos níveis de 3-hidroxi-3metil-glutaril-coenzima A redutase (HMGCR) para suprir sua demanda por isoprenóides e lipídios, o que as tornam sensíveis ao SIM. Estudos também relatam que a adição de mevalonato

reverte o efeito das estatinas na viabilidade das células tumorais da mama e indicaria uma atividade do SIM relacionada à inibição do HMGCR (Bai et al., 2019; Xie et al., 2021).

**Figura 1** Fração afetada IC para combinações livres e formulações SpHL-D-S, sendo (A) MDA-MB-231; (B) SK-BR-3 e (C) MCF-7



Todos os dados representados como média  $\pm$  DP (n = 3).

Em relação ao mecanismo de ação da DOX em células cancerosas, a intercalação e a interrupção do reparo do DNA mediado pela topoisomerase II é o mais comumente descrito (Thorn et al., 2011). Por terem mecanismos diferentes frente as células tumorais, a combinação DOX e SIM têm possibilidades de sinergismo e de minimizar o desenvolvimento de resistência a DOX (Franco & Oliveira, 2017).

Li e colaboradores, relataram que a terapia combinada de DOX e SIM interrompeu, significativamente, o crescimento de células de câncer de próstata por meio de múltiplos mecanismos de aumento dos níveis de ROS intracelular, indução de apoptose e promoção de autofagia celular e antiangiogênese (Li et al., 2019). Como mencionado anteriormente, as linhagens celulares de câncer de mama utilizadas neste estudo possuem, além de diferentes perfis moleculares, diferentes tempos de duplicação, expressão de outros receptores de fatores de crescimento, o que pode explicar as diferentes respostas a uma mesma terapia (Ayoub et al., 2017; Mondal et al., 2019). Buranrat e colaboradores, relataram que a combinação de DOX e SIM aumentou a expressão da proteína do citocromo c e a atividade da caspase-3 em comparação com cada fármaco isoladamente, sugerindo que o SIM sensibiliza as células tumorais de mama MCF-7, potencializando a ação da DOX (Buranrat et al., 2017a). No entanto, suposições que explicam a melhor resposta para uma determinada combinação de fármacos não são facilmente validadas, principalmente devido à falta de conhecimento preciso dos mecanismos de ação envolvidos (Malyutina et al., 2019).

Além disso, Machado e colaboradores sugeriram que as células MCF-7 são mais resistentes ao dano oxidativo causado por ROS em comparação com as células MDA-MB-231, sofrendo assim menos apoptose (Machado et al., 2020). Este fato poderia explicar os resultados aqui obtidos em que os valores de  $CI_{50}$  para MCF-7 foram maiores que as células MDA-MB-231, principalmente após tratamento com formulações lipossomais. Por outro lado, vale ressaltar que, diferentemente das linhagens MCF-7 e SK-BR-3, a linhagem MDA-MB-231 expressa a proteína Ras que apresenta alta taxa de proliferação celular (Park et al., 2012). Sabendo-se que um dos efeitos pleotrópicos da SIM relatado na literatura envolve a redução da translocação da proteína Ras para a membrana celular, uma possível hipótese que

poderia explicar a potencialização da atividade da DOX na presença de SIM nessa linhagem MDA-MB-231 está relacionada com essa via de inibição da Ras.

Sobre o sinergismo, vale ressaltar que o efeito da associação de dois ou mais fármacos para o tratamento do câncer não é apenas o aumento da citotoxicidade, mas também, pode promover uma melhora na eficácia, assim como uma redução na dose administrada e na toxicidade sistêmica (Duarte et al., 2021; Franco & Oliveira, 2017). Assim, o foco principal das terapias anticâncer é identificar sinergias de combinação de substâncias em todas as frações de inibição com o objetivo de matar a maioria das células tumorais (Harasym et al., 2010). Além disso, foi relatado que os perfis de efeito da combinação podem mudar com a coencapsulação dos fármacos (Franco & Oliveira, 2017). Esta observação foi claramente demonstrada na avaliação das células MCF-7. No entanto, ainda é necessário um melhor entendimento dos mecanismos de ação pelos quais a DOX e a SIM atuam tanto isoladamente quanto associadas para esclarecer as diferenças encontradas entre os níveis de combinação. Mais estudos deverão ser realizados para elucidar os mecanismos por trás da melhor capacidade antitumoral de uma razão molar em relação à outra.

### **3 Análises morfométricas nucleares (NMA)**

O núcleo corresponde a aproximadamente 10% do volume celular e vários mecanismos celulares afetam sua morfologia o que pode, portanto, ser usado para avaliar certos processos celulares. A análise da morfologia nuclear permite a quantificação de populações nucleares apresentando características tipicamente vistas na senescência, apoptose, bem como em outras irregularidades nucleares relacionadas à morte celular (Adami et al., 2021). Filippi-Chiela e colaboradores desenvolveram a ferramenta analítica que permite extrair dados morfométricos para classificar núcleos em populações: normal (N), irregular (I), pequeno e regular (SR) e grande e regular (LR). Essas modificações incluem uma condensação e fragmentação nuclear observada na apoptose (SR), um aumento no tamanho nuclear observado na senescência (LR) e um aumento na irregularidade nuclear sob estresses químicos ou físicos (I) (Filippi-Chiela et al., 2012).

Os dados de NMA obtidos após diferentes tratamentos estão representados na **Figura 2**. Não houve quantidade significativa de núcleos irregulares após diferentes

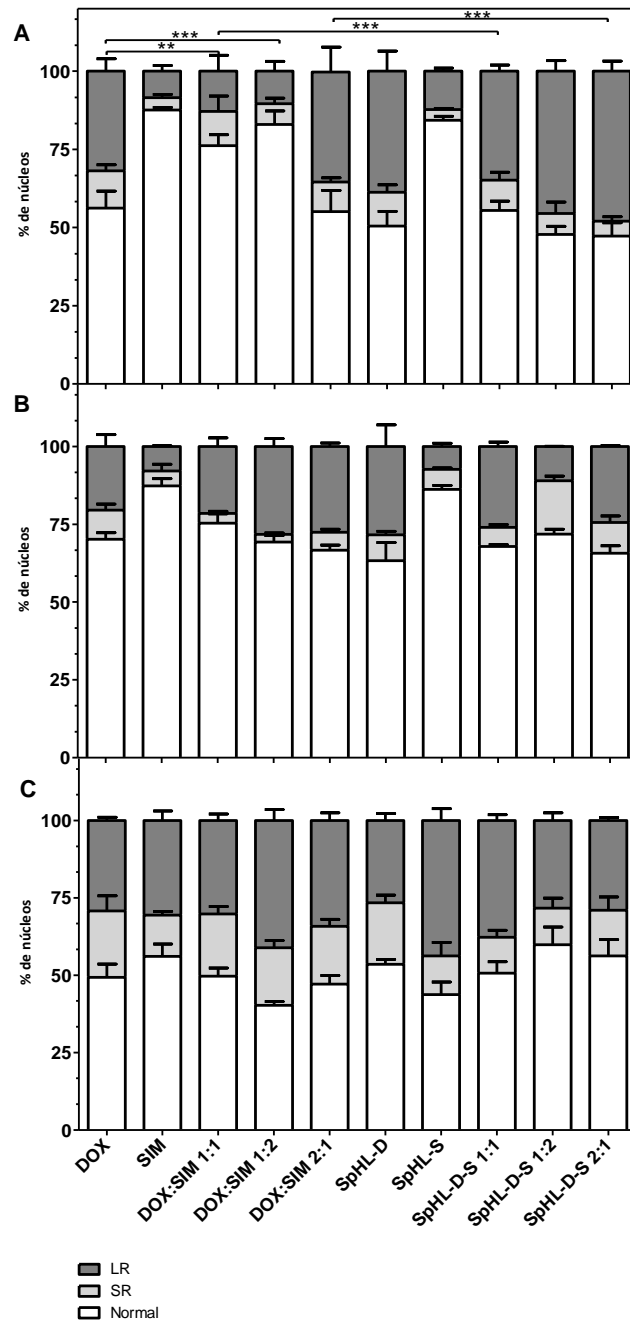


tratamentos em todas as linhagens celulares estudadas. Além disso, os eventos de apoptose (núcleos SR) mostraram uma extensão semelhante para as três linhagens celulares. A análise dos dados da linhagem MDA-MB-231 mostrou para o tratamento com DOX, seja na forma livre ou SpHL-D, presença de núcleos N variando de 55 a 65%, SR igual a 10% e LR variando de 25 a 35%. Por outro lado, os valores obtidos após o tratamento com SIM em ambas as formas foram iguais a 85%, 3% e 12% para N, SR e LR, respectivamente. Esses achados estão de acordo com estudos de viabilidade celular e reforçam a menor atividade citotóxica da SIM. Verificou-se uma redução significativa de núcleos LR seguida de aumento de núcleos N, após tratamento com DOX:SIM 1:1 ou 1:2 em relação a DOX livre, compatível com o efeito de antagonismo observado nessas razões molares. Em contraste, um aumento significativo de núcleos LR foi detectado após os tratamentos SpHL-D-S 1:2 e 2:1. Observou-se também que a encapsulação de DOX:SIM 1:1 e 1:2 resultou em aumento significativo ( $p < 0,001$ ) nos núcleos LR em relação à forma livre na mesma proporção. O aumento na proporção de núcleos LR sugere um aumento na indução da senescência (Filippi-Chiela et al., 2012).

A senescência induzida pela terapia também é um dos mecanismos subjacentes pelos quais as terapias contra o câncer exercem atividade antitumoral (Prasanna et al., 2021). Esse fato pode ser um dos fatores que explicaria a maior citotoxicidade e sinergismo da razão 2:1 sobre as demais. Portanto, investigações adicionais para entender as vias moleculares que regulam a senescência em células tumorais podem fornecer mais respostas.

Para células SK-BR-3, a porcentagem de distribuição dos tipos de núcleos foi semelhante a MDA-MB-231 após tratamento com SIM e DOX. Além disso, o tratamento com SIM tem um efeito citotóxico menos pronunciado em comparação com os tratamentos com DOX. Não foi observada diferença significativa entre a DOX livre ou lipossomal isolada ou associada a SIM em todas as razões molares avaliadas. No entanto, o SpHL-D-S 1:2 apresentou redução de núcleos LR em comparação com SpHL-D-S 2:1 e 1:1. Esses resultados encontrados para MDA-MB-231 e SK-BR-3 são condizentes com os resultados discutidos em viabilidade celular.

**Figura 2** Distribuição morfométrica nuclear das linhagens celulares (A) MDA-MB-231; (B) SK-BR-3 e (C) MCF-7, expostas a 80 nM de diferentes tratamentos por 48 horas.



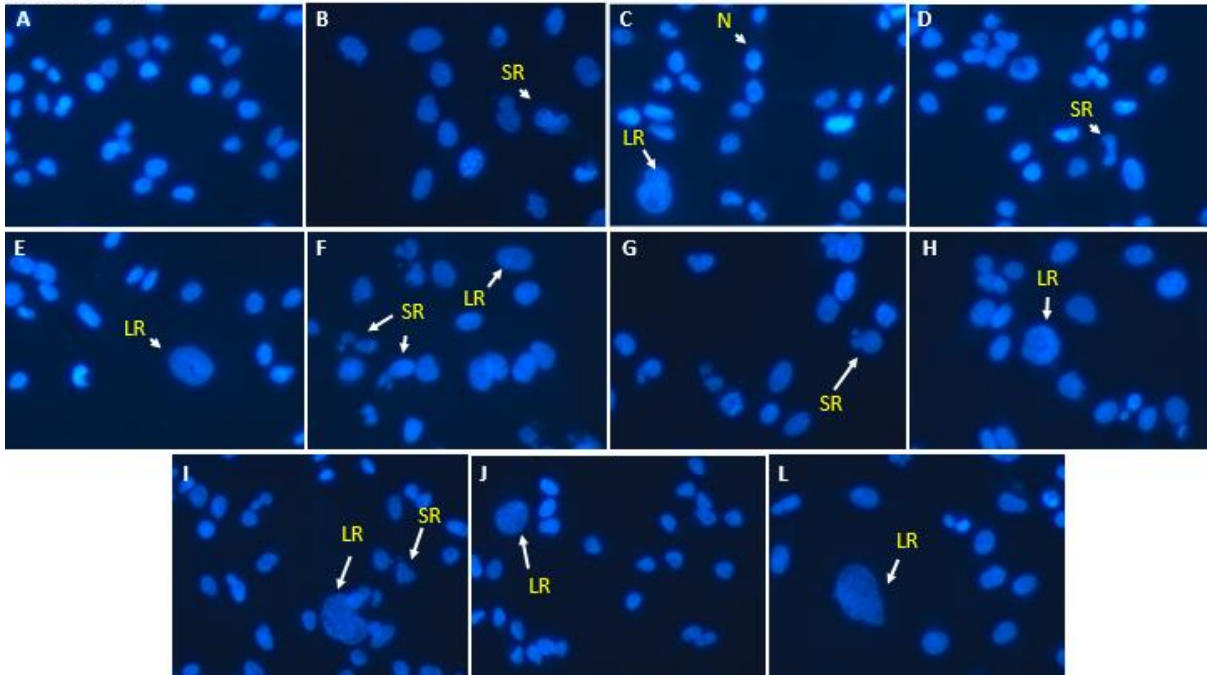
Os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.; \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) representam diferença significativa em relação aos núcleos normal e LR (teste de Bonferroni).

Para a linhagem celular MCF-7, não foi detectada diferença significativa entre DOX livre e outros tratamentos de forma livre ou lipossomal. Semelhante à linhagem SK-BR-3, a encapsulação de DOX:SIM nas diferentes razões molares avaliadas não alterou a distribuição dos núcleos. Além disso, não foram observadas diferenças entre razões molares avaliadas na forma lipossomal. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de indução de senescência pelos fármacos. Matsumura e colaboradores demonstraram que a indução de senescência está relacionada com a inibição de  $\gamma$ -glutamylciclotransferase nas células cancerígenas, e que essa inibição pode variar de acordo com a linhagem celular. Segundo eles, a depleção de  $\gamma$ -glutamylciclotransferase na linhagem MDA-MB-213 se dá pela regulação positiva de p16<sup>INK4A</sup>, em contraste com a linhagem MCF-7 é mediada pela p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (Matsumura et al., 2016). Essa regulação positiva de inibidores de quinase (p16<sup>INK4A</sup> ou p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) podem estar relacionados com as diferenças de respostas encontradas, com relação a proporção de núcleos senescentes entre as linhagens analisadas nesse trabalho.

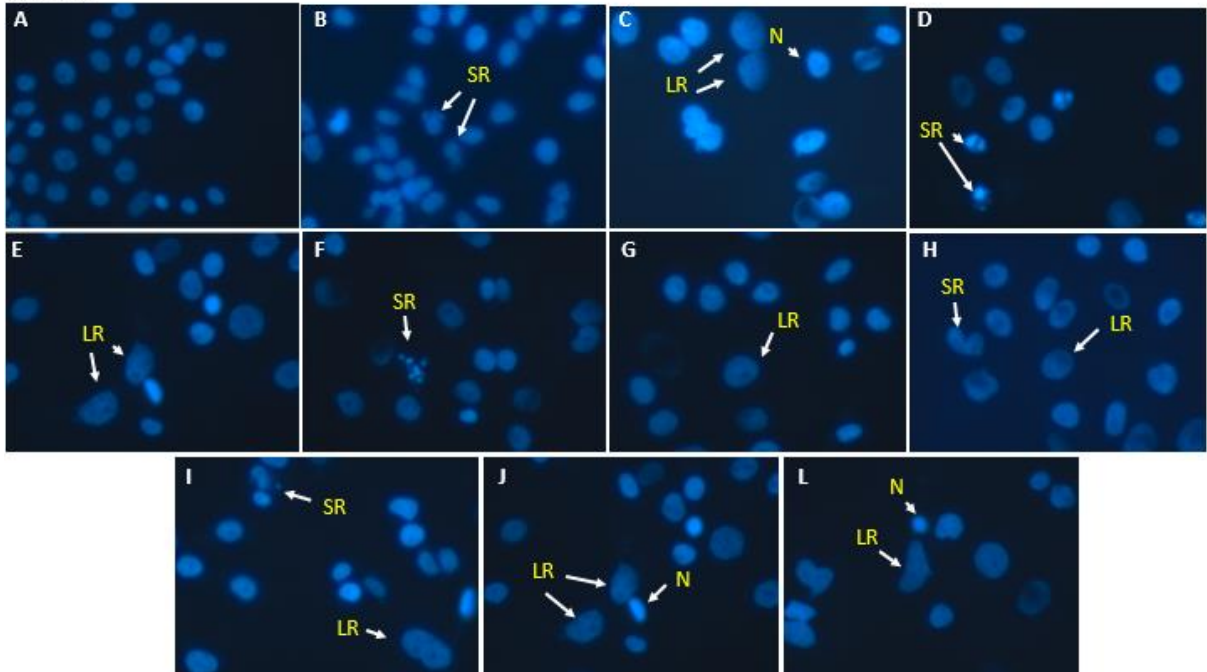
A **Figura 3** representa as fotomicrografias de fluorescência dos núcleos MDA-MB-231, SK-BR-3 e MCF-7 coradas com Hoescht 33342, nas quais podemos observar um aumento evidente para as células expostas aos diferentes tratamentos quando comparadas às células não tratadas. Essas características correspondem à morfologia fenotípica típica da senescência. Também é possível observar as diferentes distribuições dos núcleos LR e SR em relação ao controle N que não recebeu tratamento medicamentoso.

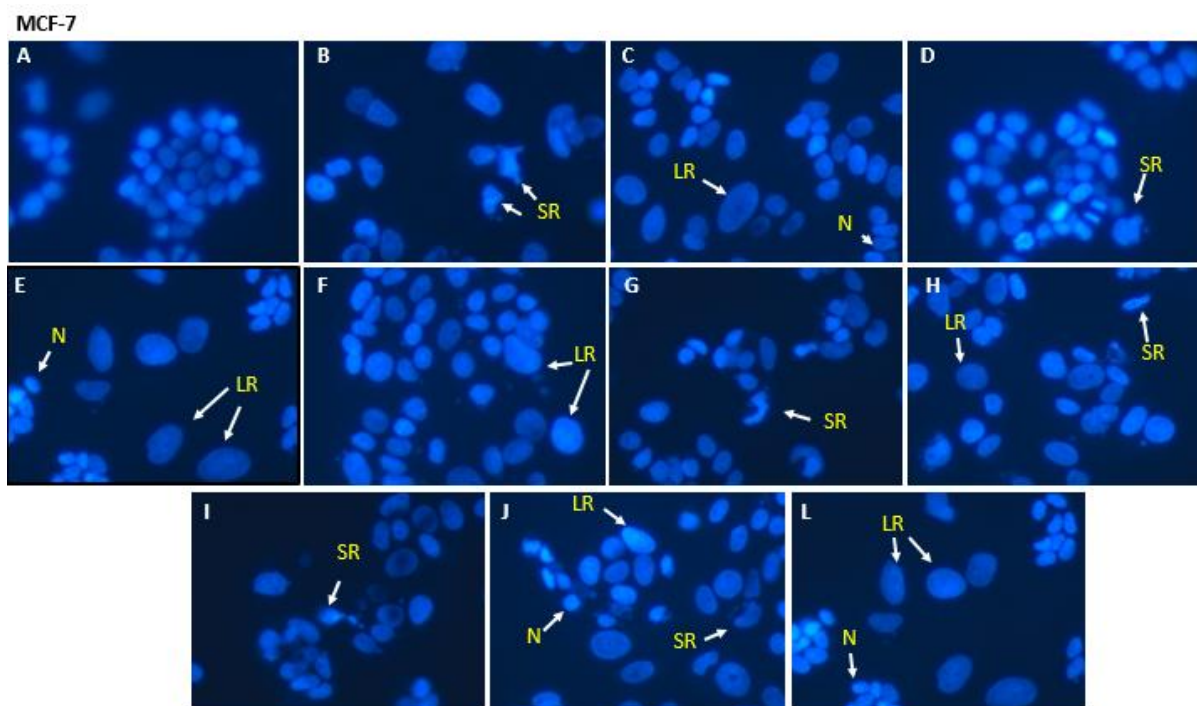
**Figura 3** Fotomicrografias representativas de fluorescência de núcleos de células de câncer de mama das diferentes linhagens, coradas com Hoechst 33342, Controle – sem tratamento (A) ou após tratamentos na concentração de 80 nM: DOX livre (B); SIM livre (C); DOX:SIM (1:1) (D); DOX:SIM (1:2) (E); DOX:SIM (2:1) (F) SpHL-D (G); SpHL-S (H); SpHL-D-S (1:1) (I); SpHL-D-S (1:2) (J) ou SpHL-D-S (2:1) (L), por 48 h.

MDA-MB-231



SK-BR-3





Alguns dos diferentes fenótipos morfométricos de núcleos observados são indicados. N, normal; SR, apoptótico; LR, senescente. Imagens um representante de três experimentos independentes. Aprimoramento 40x.

#### 4 Ensaio de migração

A migração celular está envolvida em vários processos cruciais para células normais, como reparo e regeneração de tecidos. No entanto, as células cancerosas são caracterizadas por uma migração celular aberrante que leva à invasão de tecidos adjacentes e metástases (Suarez-Arnedo et al., 2020).

O movimento das células cancerosas para o tecido ao redor do tumor e para a vasculatura é o primeiro passo para a instalação de cânceres metastáticos. Estratégias que inibem a motilidade celular podem reduzir a disseminação de células cancerosas (Sahai, 2005). Existem diversos mecanismos que as células podem empregar para iniciar e progredir a invasão de tecidos adjacentes e os tratamentos farmacológicos podem influenciar esses processos (Hulkower & Herber, 2011).

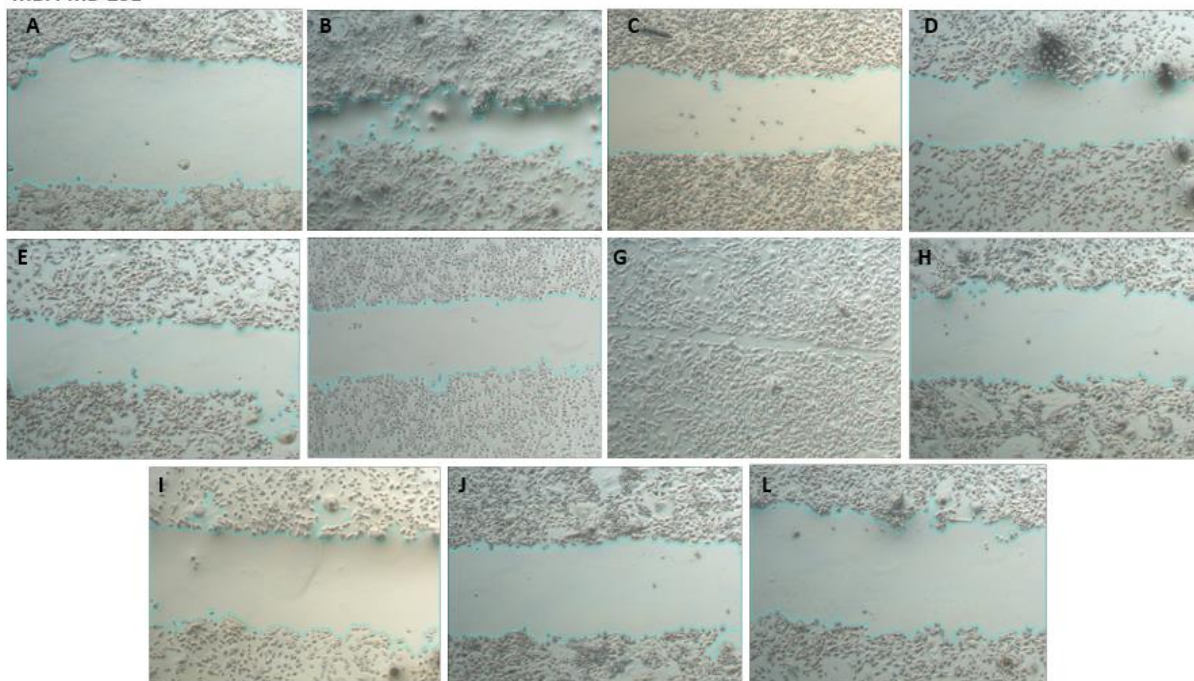
O ensaio de migração tem sido utilizado para prever a influência de tratamentos contra o câncer em que a inibição da motilidade celular é de grande importância (Silva et al., 2019). Este ensaio, também conhecido como “cicatrização de feridas”, permite a observação da migração celular bidimensional (2D) em culturas de monocamadas

de células confluentes. Assim, a migração 2D torna possível prever alguns mecanismos subjacentes do movimento celular, incluindo contratilidade, adesão e rearranjo do citoesqueleto (Galarza et al., 2020). Aqui, os experimentos foram realizados em condições de “inanição celular” usando FBS a 1% para garantir o fechamento da ferida por migração e não por proliferação celular. Além disso, as feridas foram avaliadas em 24 horas, pois períodos de estudo mais longos podem não permitir a distinção entre proliferação e migração celular (Franco et al., 2019).

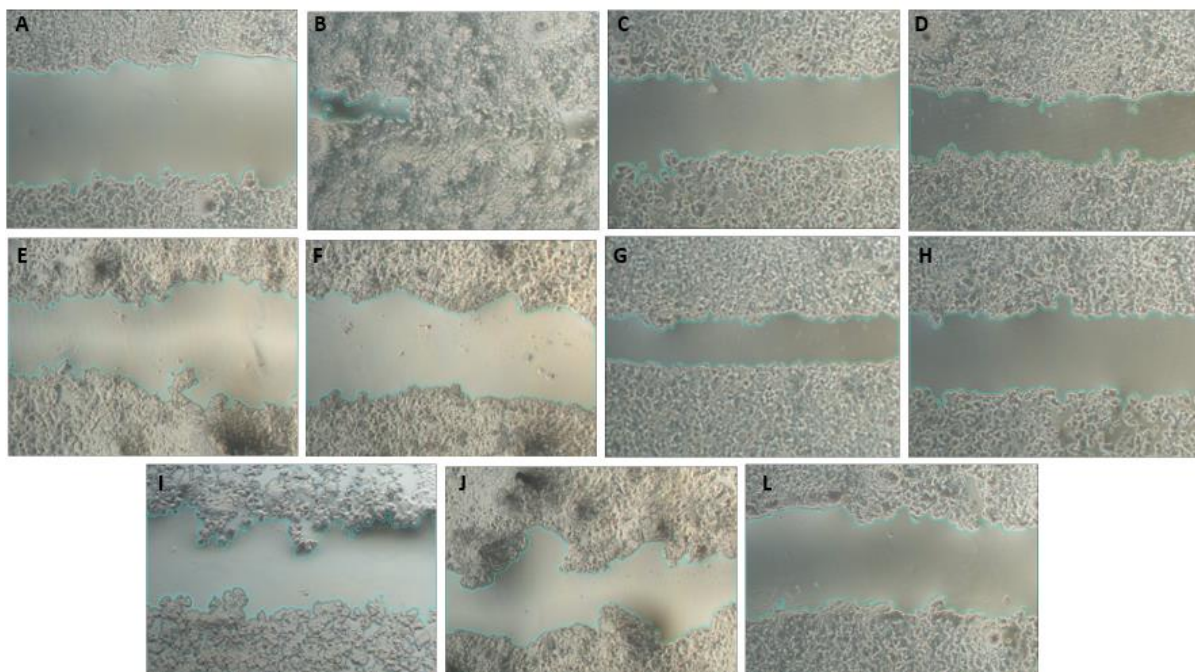
Fotomicrografias de contraste de fase representativas das feridas de controle e após 24 horas de exposição aos tratamentos de lipossomas, na linhagem MDA-MB-231, são mostradas na **Figura 4**. Na **Tabela 4** estão resumidos os resultados dos tratamentos com DOX e SIM livre ou encapsulado.

**Figura 4** Fotomicrografias de contraste de fase representativas de linhagens de células MDA-MB-231 e MCF-7 expostas a “ferida zero” (A) ou expostas 80 nM de tratamentos: DOX livre (B); SIM livre (C); DOX:SIM (1:1) (D); DOX:SIM (1:2) (E); DOX:SIM (2:1) (F) SpHL-D (G); SpHL-S (H); SpHL-D-S (1:1) (I); SpH-D-S (1:2) (J) ou SpHL-D-S (2:1) (L), por 24h.

MDA-MB-231



MCF-7



As imagens são representativas de três experimentos independentes. Ampliação 5x.

**Tabela 4** Porcentagem de migração celular em relação ao controle para as diferentes linhagens celulares avaliadas quando expostas a diferentes proporções de fármacos livres ou coencapsulados em lipossomas.

Tratamentos	MDA MB 231	MCF7
DOX	89,8 ± 6,0	90,1 ± 6,0
SIM	39,7 ± 5,0 <sup>a</sup>	37,9 ± 4,3 <sup>a</sup>
DOX:SIM (1:1)	47,9 ± 10,5 <sup>c</sup>	49,2 ± 3,7
DOX:SIM (1:2)	42,1 ± 6,7 <sup>a</sup>	22,0 ± 7,8 <sup>a</sup>
DOX:SIM (2:1)	27,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	28,3 ± 8,1 <sup>a</sup>
SpHL-DOX	90,6 ± 5,8	87,9 ± 3,0
SpHL-SIM	24,5 ± 2,4 <sup>b</sup>	32,6 ± 8,8 <sup>b</sup>
SpHL-D-S (1:1)	25,2 ± 2,2 <sup>b</sup>	41,9 ± 5,4 <sup>b</sup>
SpHL-D-S (1:2)	24,8 ± 4,6 <sup>b</sup>	42,9 ± 1,3 <sup>b</sup>
SpHL-D-S (2:1)	15,5 ± 5,7 <sup>b</sup>	24,7 ± 2,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>diferença significativa comparado ao tratamento com DOX livre; <sup>b</sup> diferença significativa comparado ao tratamento com SpHL-D; <sup>c</sup>diferença significativa comparado ao tratamento com DOX:SIM 2:1. Os dados para as linhagens celulares MDA-MB-231 e MCF-7 foram transformados como  $y = \log(\text{valor}+1)$ . Diferença significativa foi considerada para valores de  $p < 0,05$  (teste de Tukey).

Como pode ser visto na **Tabela 4**, DOX livre ou SpHL-D não inibiram a migração celular para MDA-MB-231 e MCF-7. No entanto, todos os tratamentos contendo SIM reduziram, significativamente, a porcentagem de migração celular em relação aos tratamentos contendo apenas DOX para ambas as linhagens celulares, exceto o tratamento DOX:SIM 1:1 que não apresentou diferença significativa em relação a DOX livre. Na linhagem MDA-MB-231, observou-se que os tratamentos combinados DOX:SIM 1:2 e 2:1 na forma livre inibiram, respectivamente, 2 e 3 vezes mais a migração celular em relação à DOX livre. Enquanto a terapia SpHL-D-S nas razões molares 1:1 e 1:2 foi cerca de 3 vezes mais inibitória, e para a razão 2:1, cerca de 6 vezes mais inibitória, quando comparadas com SpHL-D.

Quanto à linhagem MCF-7, observou-se que os tratamentos combinados DOX:SIM 1:2 e 2:1 foram, respectivamente, 4 e 3 vezes mais inibidores de migração em relação a DOX livre. O SpHL-D-S 1:1 e 1:2 inibiram 2 vezes mais; enquanto SpHL-D-S 2:1 inibiu a migração celular 3 vezes mais do que SpHL-D.

Em resumo, o ensaio de migração mostrou que o tratamento com DOX isoladamente não foi capaz de inibir a migração celular e, de acordo com os achados da literatura, a DOX poderia favorecer a mobilidade celular. Mas a adição de SIM ao tratamento com DOX permitiu uma inibição significativa dessa migração. Considerando as combinações de DOX e SIM em diferentes razões molares, foi observada diferença significativa na porcentagem de migração somente no tratamento DOX:SIM 1:1 em relação ao DOX:SIM 2:1, na linhagem MDA-MB-231. Entre todos os outros tratamentos associando DOX e SIM livres ou em lipossomas não foi observada diferença significativa, em ambas as linhagens celulares (MDA-MB-231 e MCF-7).

O envolvimento da SIM na inibição da migração celular ainda precisa ser melhor elucidado, mas já foi demonstrado que esse fármaco é capaz de impedir o movimento das células tumorais. Mandal e colaboradores, demonstraram que a SIM atenuou a migração e invasão de células tumorais MDA-MB-231 por mecanismos dependentes da via do mevalonato (Mandal et al., 2011). A SIM pode inibir proteínas de sinalização celular que estão associadas a propriedades de migração de células tumorais, como RhoA, NF- $\kappa$ B e metaloproteinase-9 de matriz. Além disso, a SIM também pode induzir a desorganização do citoesqueleto de actina e o desaparecimento do local de adesão



focal (Beckwitt et al., 2018b; Buranrat et al., 2017b, 2022; Wu et al., 2009). Também foi descrito que a SIM pode inibir a migração celular reprimindo a expressão da proteína 61 rica em cisteína (Cyr61) (Chen et al., 2017).

Em contraste, há relatos de que a capacidade migratória das células do câncer de mama aumentou após o tratamento com DOX. Liu e colaboradores, relataram que houve um aumento de 1,56 vezes na capacidade migratória das células MCF-7 após o tratamento com DOX (Liu et al., 2019). Isso ocorre possivelmente porque a DOX aumenta os níveis de TGF- $\beta$ , o que leva ao aumento da motilidade celular e da invasividade (Biswas et al., 2007). Sung e colaboradores sugerem que a quimioterapia com DOX pode aumentar o risco de metástase de células de câncer de mama ao ativar o DCAF13 (Sung et al., 2021).

O câncer de mama humano SK-BR-3 é não metastático, em tentativas de ensaios de invasão, essa linhagem celular não mostrou invasividade, portanto, não foi utilizada nessa etapa do estudo (Liu et al., 2019; Miskey et al., 2022).

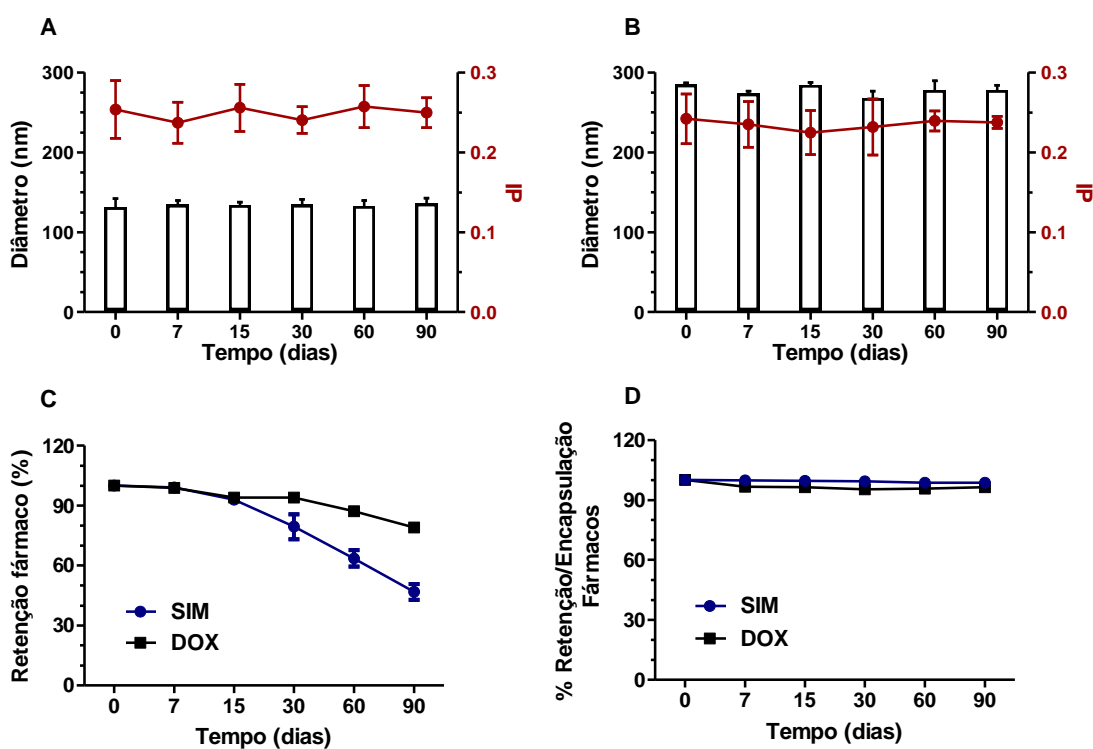
Esses estudos celulares *in vitro* mostraram claramente a diferença de resposta das linhagens celulares aos tratamentos. Além disso, foram importantes como triagem para selecionar a melhor razão molar em DOX e SIM para prosseguir com as caracterizações da formulação e orientar futuras investigações. Como relatado previamente, o tratamento com SpHL-D-S 2:1 mostrou efeito sinérgico em todas as frações avaliadas e frente todas as linhagens tumorais de mama humana avaliadas, portanto essa razão foi utilizada para uma caracterização mais detalhada no que diz respeito à estabilidade e avaliação morfológica.

## 5 Estabilidade de armazenamento

O estudo da estabilidade física dos lipossomas é extremamente relevante pois permite conhecer sobre o extravasamento dos fármacos encapsulados e possíveis fenômenos de agregação e fusão das vesículas e, ambos os processos podem afetar a efetividade terapêutica (Pentak et al., 2022). Dessa forma, a estabilidade da dispersão líquida do SpHL-D-S foi verificada em termos de teor de encapsulação, diâmetro médio, IP e potencial zeta, durante 90 dias de armazenamento. Não foram observadas alterações notáveis no tamanho da vesícula, IP (**Figura 5A**) e potencial

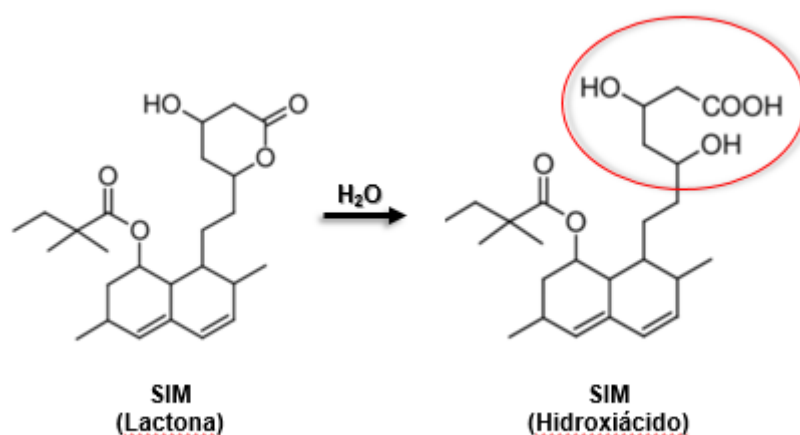
zeta (dados não mostrados) por pelo menos 90 dias a 4°C. Em relação à estabilidade da retenção de DOX e SIM, ambas se mantiveram estáveis durante os primeiros 15 dias. No entanto, a partir do 15º dia, observou-se uma redução gradual e significativa de SIM, chegando a cerca de 50% em 90 dias. A concentração de DOX não foi alterada ao longo do tempo.

**Figura 5** Tamanho e IP de SpHL-D-S 2:1 (A) mantido a 4°C na forma líquida; (B) SpHL-D-S preparado por reconstituição de SpHL-S liofilizado e % de retenção dos fármacos (C) mantido a 4°C na forma líquida e (D) reconstituição de SpHL-S liofilizado, por 90 dias.



Essa redução no conteúdo pode ser devido à sensibilidade da SIM à umidade, uma vez que, contém um anel de lactona lábil à hidrólise. O composto hidrolisado da SIM é um hidroxiácido (**Figura 6**) que apresenta menor lipofilicidade do que a SIM comprometendo sua interação na bicamada lipossomal (Chen et al., 2012). Portanto, é essencial evitar a hidrólise. A estratégia deste trabalho foi o armazenamento de SpHL-S na forma liofilizada para reconstituição no momento do uso.

**Figura 6** Estrutura química da SIM e seu mecanismo de hidrólise.



A forma liofilizada fornece uma solução para problemas de estabilidade de armazenamento de dispersões lipossomais aquosas, na medida em que produz um produto seco que pode ser armazenado por um longo tempo e hidratado imediatamente antes do uso (Lee, 2020). Desta forma, contornamos a instabilidade química causada pela hidrólise nas moléculas de SIM, **Figura 5C**.

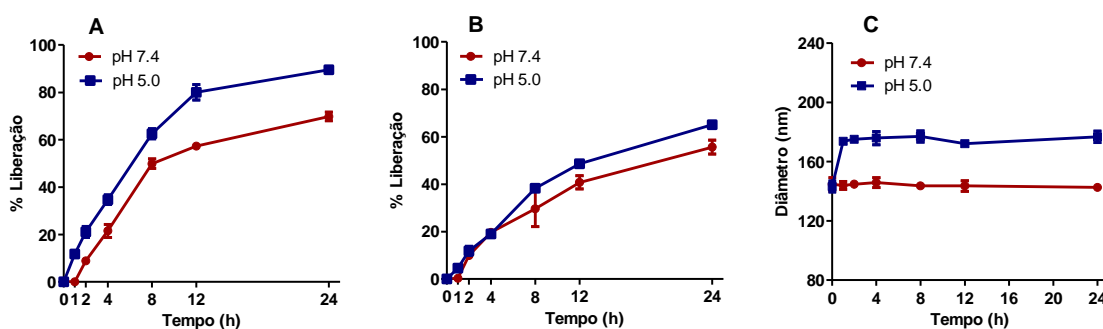
O processo de liofilização, mesmo com o uso de lioprotetores, pode causar estresse às vesículas lipossomais e, no momento da reconstituição, as partículas podem se agregar, gerando um diâmetro maior como visto na **Figura 5B** (Mura et al., 2021). Mesmo com o aumento do diâmetro, as vesículas passaram a ter  $277 \pm 9$  nm e, portanto, permanecem adequadas para administração intravenosa. O IP, por outro lado, permanece estável durante o armazenamento, indicando a manutenção da homogeneidade e no potencial zeta não foram observadas alterações significativas em relação à dispersão coloidal. Os valores de tamanho de vesícula, IP e potencial zeta permaneceram inalterados durante pelo menos 90 dias de armazenamento a  $-20$  °C. Além disso, o conteúdo de SIM permaneceu próximo a 100 %, assim como a capacidade de encapsulamento de DOX, por pelo menos 90 dias (**Figura 5D**).

## 6 Estudo de liberação

Um perfil de liberação *in vitro* revela informações importantes acerca do comportamento da formulação em pH diferentes (Hua, 2014). O perfil de liberação DOX e SIM a partir do SpHL-D-S (2:1) foi avaliado pelo método de diálise em dois

valores de pH (7,4 e 5,0). Conforme mostrado na **Figura 7**, a liberação do fármaco foi dependente do pH do meio e do tempo. Após 1 h, SpHL-D-S incubado em pH 5,0 já apresentava maior liberação de DOX em relação ao pH 7,4. Após 24 h,  $89,5 \pm 0,8\%$  de DOX foi liberada em pH 5,0, enquanto apenas  $69,8 \pm 1,5\%$  de DOX foi liberada em pH 7,4. Em relação a SIM encapsulada, sua liberação foi mais controlada, porém também foi mais significativa em pH 5,0 em relação ao pH 7,4, após 4h. Após 24 h,  $65,1 \pm 2,1\%$  de SIM foi liberado em pH 5,0, enquanto em pH 7,4 caiu para  $55,6 \pm 2,3\%$  de SIM.

**Figura 7** Perfil de liberação de SpHL-D-S em pH 7,4 (A) e pH 5,0 (B) e avaliação do diâmetro da vesícula (C) em diferentes tempos.



Mudanças significativas no diâmetro da vesícula também foram observadas em pH 5,0 a partir de 1h (**Figura 7C**). Em pH 7,4; o tamanho da vesícula não foi alterado por 24 h, enquanto um aumento significativo foi observado no diâmetro das vesículas a partir de 1h, em pH 5,0 ( $142,6 \pm 1,9$  nm no tempo 0 e  $176,7 \pm 3,1$  nm no tempo 24 h). O aumento do tamanho da vesícula também é indicativo de que o SpHL-D-S responde à variação do pH, uma vez que o pH baixo leva à agregação das vesículas e/ou fusão da membrana (Paliwal et al., 2012).

Alterações no comportamento de liberação de DOX e SIM, bem como uma mudança significativa no diâmetro das vesículas em pH 5,0 sugerem que a sensibilidade ao pH dos lipossomas ao meio ácido foi preservada, mesmo com a adição de SIM à bicamada lipídica. Assim, o SpHL-D-S tem potencial para entregar DOX na região tumoral, visto que essas vesículas serão capazes de liberar seu conteúdo quando em contato com a região tumoral mais ácida (Gomes et al., 2022). O CHEMS sofrerá

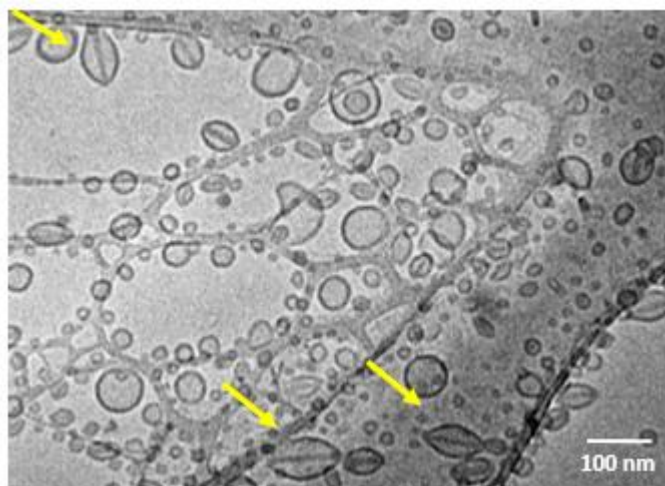
protonação em ambiente ácido, principalmente nos endossomos, causando desestabilização da bicamada lipídica, levando à liberação do fármaco (Kang et al., 2017).

Além disso, pode-se supor que no ambiente não tumoral o pH seja fisiológico (pH 7,4) uma maior proporção dos fármacos permaneceria circulando retidos nos lipossomas por mais tempo e, com isso, poderia levar a uma menor toxicidade em tecidos normais (Roque et al., 2019).

### **7 Crio-TEM**

A análise morfológica das vesículas SpHL-D-S foi realizada por crio-TEM (**Figura 8**). A crio-TEM é adequada para estudar a integridade da bicamada lipídica, bem como, as mudanças de forma devido à incorporação de fármacos (Meister & Blume, 2017). Em geral, as vesículas são esféricas, unilamelares e de diâmetro razoavelmente uniforme (**Figura 8**). Podem ser observados cristais no interior das vesículas, essas estruturas foram denominadas, em 1992, de “grãos de café” e representam os cristais de sulfato de DOX dentro dos lipossomas (Lasic et al., 1992). Esta descoberta confirma a DOX intra-lipossomal na forma de cristal de sulfato de DOX. Outro detalhe na estrutura do SpHL-D-S que pode ser notado pelas imagens crio-TEM (Figura 8), são as formas das vesículas não esféricas. Isso também se deve à presença de cristais de DOX que forçam uma mudança na forma das vesículas de esféricas para não esféricas (Barenholz, 2012).

**Figura 8** Fotomicrografia CryoTEM de SpHL-D-L 2:1



Setas amarelas indicando cristais de sulfato de DOX dentro dos lipossomas

## 8 Conclusão

Neste estudo, desenvolvemos uma nova formulação de lipossomas sensíveis ao pH contendo DOX e SIM. Nossos resultados mostram que este sistema é estável na forma liofilizada por pelo menos 90 dias e responde a mudanças no pH. Os dados de viabilidade, CI e NMA apontam que os fármacos na razão molar 2:1 podem atuar sinergicamente melhorando os resultados inibitórios da proliferação e indução da morte das células do câncer de mama. Além disso, os resultados da migração reforçam que a combinação de DOX e SIM melhora significativamente a inibição da proliferação celular. No entanto, mais estudos são necessários para entender os mecanismos moleculares envolvidos.

Em resumo, o presente estudo identificou uma nova estratégia para potencial terapia combinada, utilizando uma formulação com propriedades físico-químicas, comportamentos de liberação e potencial resposta antitumoral para terapia *in vivo* do câncer de mama.

## CAPÍTULO II

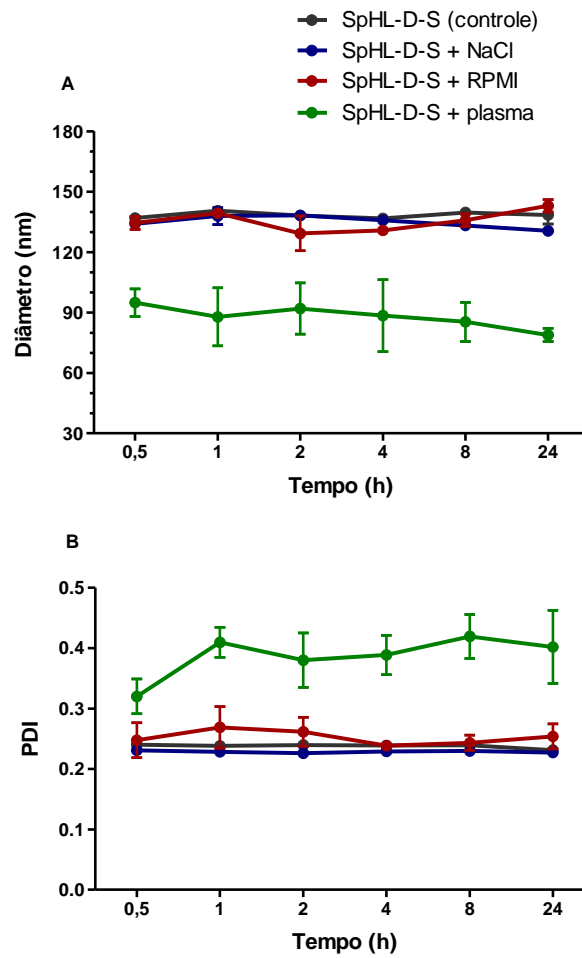
## INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS COENCAPSULANDO DOXORRUBICINA E SINVASTATINA EM UM MODELO ANIMAL DE CÂNCER DE MAMA MURINO.

### 1 Estabilidade biológica *in vitro*

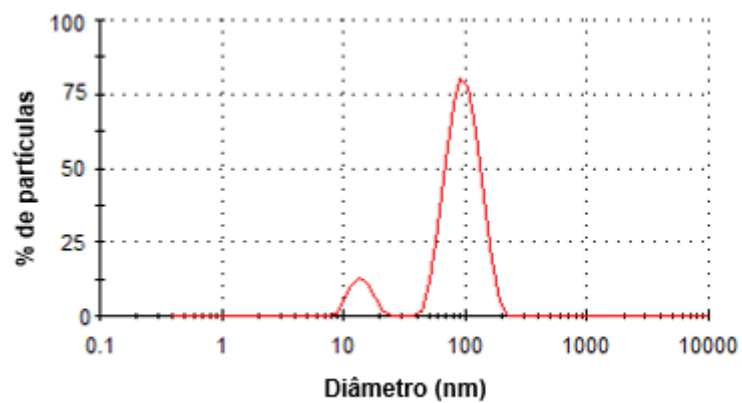
A estabilidade biológica *in vitro* é um pré-requisito para o uso de lipossomas como carreadores de fármacos *in vivo*, uma vez que eles devem circular e reter o fármaco por tempo suficiente para o acesso efetivo e interação com o tecido alvo (Nakhaei et al., 2021). O tamanho e o IP de SpHL-D-S 1:1 após incubação em NaCl (0,9% p/v) e RPMI mostrou estabilidade adequada em simulações de condições biológicas (pH 7,4 e 37°C), por até 24h. Não houve alteração no tamanho de vesículas entre controle, e os incubados em NaCl e RPMI, sendo, respectivamente, valores de diâmetro durante as 24h de  $138 \text{ nm} \pm 0,7$ ;  $135 \text{ nm} \pm 0,8$  e  $135 \text{ nm} \pm 1,5$  e IP abaixo de 0,3 permanecendo um sistema monodisperso (**Figura 1A e B**).

Por outro lado, as medições após incubação em plasma sanguíneo murino apresentaram um diâmetro cerca de 1,5 vezes inferior aos demais meios de incubação, bem como um IP cerca de 1,6 vezes maior. Isso se deve a presença de duas populações com diâmetros diferentes sendo, aproximadamente, 90% das partículas com 137 nm e 10% com diâmetro de 20 nm, como representado na **Figura 2**. Sabe-se que soluções contendo mais de 0,07% de plasma sanguíneo apresentam ruído que tornam inconclusivas as medidas por DLS, pois a presença de componentes do próprio plasma sanguíneo dificultava a determinação do sinal das partículas (Bannon et al., 2021). Com base nisso, podemos sugerir que a presença de partículas menores no plasma levou a um abaixamento do diâmetro médio e ao aumento do IP. Portanto, pode-se inferir que o SpHL-D-S apresentou boa estabilidade, independente do meio, sem alteração significativa no diâmetro médio das partículas em 24 h e pode ser considerado adequado para ensaios *in vitro* e *in vivo*.

**Figura 1** Ensaio de estabilidade biológica em vários fluidos biológicos, SpHL-D-S diluído quatro vezes em NaCl, RPMI ou plasma murino. A) Diâmetro B) IP



**Figura 2** Gráfico da distribuição das partículas nas soluções contendo plasma.





## 2 Estudo de viabilidade celular e sinergismo em linhagem 4T1

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em células tumorais de câncer de mama murino 4T1, essa linhagem pertence ao subtipo de câncer de mama triplo negativo, que é agressivo e metastático (Arroyo-Crespo et al., 2019). Vale destacar que essa é a primeira vez que um estudo de viabilidade celular entre DOX e SIM frente a linhagem celular 4T1 é descrito.

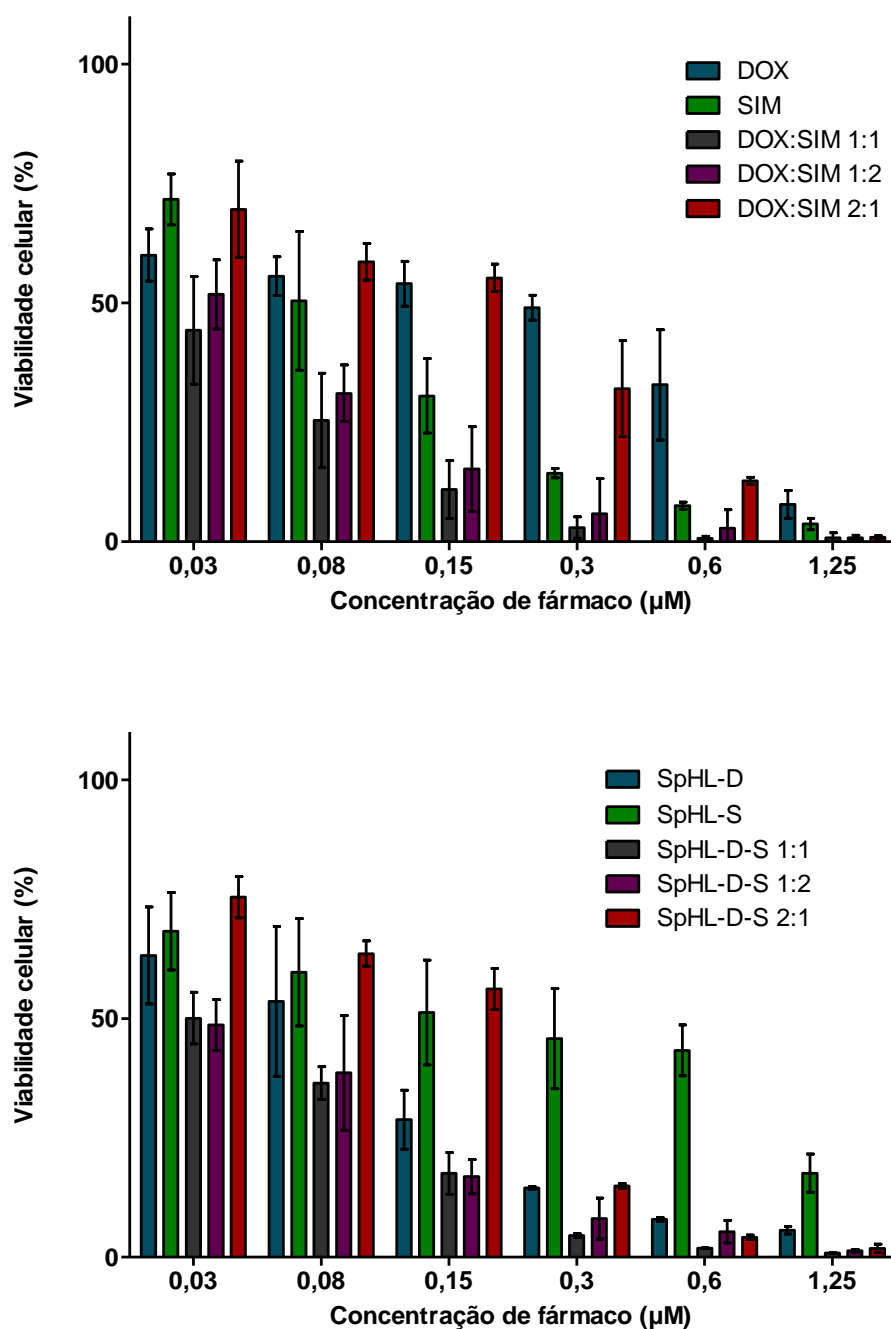
Conforme demonstrado na **Tabela 1** o tratamento com apenas um dos fármacos, DOX ou SIM, induziu um efeito na inibição do crescimento celular. Embora os valores de  $CI_{50}$  para os tratamentos contendo apenas DOX não apresentem diferenças significativa para as combinações DOX:SIM, em concentrações mais altas ( $> 0,15\mu\text{M}$ ), a coadministração, para as razões 1:1 e 1:2, apresenta maior citotoxicidade do que a DOX isolada (**Figura 3**). Os valores de  $CI_{50}$  não apresentam diferença significativa entre as razões molares investigadas, no entanto, é possível observar (**Figura 3**) que a citotoxicidade dos tratamentos com DOX:SIM 2:1 nas concentrações mais altas foi inferior em relação as demais razões molares, exceto na concentração de  $1,25\mu\text{M}$ . Sadeghi-Aliabadi e colaboradores avaliaram a associação de DOX e SIM livres frente a linhagem celular Hela e concluíram que a associação pode resultar em maior taxa de apoptose do que cada fármaco isoladamente (Sadeghi-Aliabadi et al., 2010).

**Tabela 1** Valores de  $CI_{50}$  obtidos para linhagem celular 4T1 quando expostas a diferentes razões molares entre DOX e SIM livres e coencapsuladas em SpHL, por 48h.

Tratamentos (razão molar)	Forma livre $CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	SpHL $CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
DOX	$0,1026 \pm 0,07$	$0,1643 \pm 0,09$
SIM	$0,0770 \pm 0,02$	$0,0680 \pm 0,02$
DOX/SIM (1:1)	$0,0262 \pm 0,01$	$0,0276 \pm 0,01$
DOX/SIM (1:2)	$0,0386 \pm 0,01$	$0,0380 \pm 0,01$
DOX/SIM (2:1)	$0,1081 \pm 0,05$	$0,1028 \pm 0,05$

Foram realizados três experimentos independentes em dias e passagens celulares diferentes. Os valores são expressos como média  $\pm$  DP.

**Figura 3** Citotoxicidade de diferentes tratamentos com fármacos (DOX e SIM) livres ou encapsulados em lipossomas frente as células tumorais de mama murino 4T1



Os valores de  $CI_{50}$  também permitem constatar que o encapsulamento dos fármacos em lipossomas não alterou a citotoxicidade frente à linhagem celular 4T1 quando comparada com os tratamentos livres. Esse resultado está de acordo com estudos prévios nos quais não foi observada citotoxicidade em células tratadas com

lipossomas brancos de DSPE-PEG, DOPE e CHEMS, sugerindo que esse veículo não é tóxico (Silva et al., 2018; Franco et al., 2019).

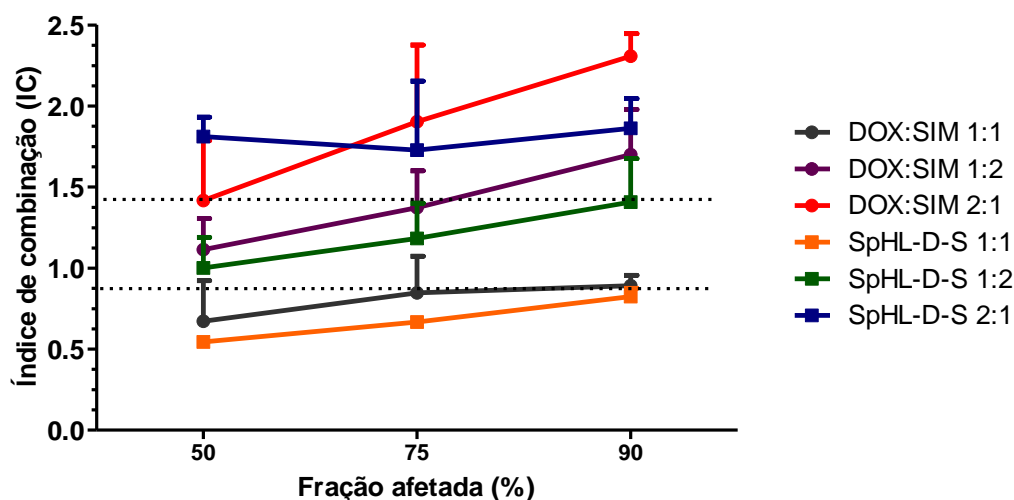
Apesar de os lipossomas contendo DOX e SIM não exibirem superioridade frente à linhagem 4T1 em relação as mesmas razões nas formas livres, a literatura relata importantes ganhos da entrega simultânea de fármacos a partir de nanocarreadores para as células tumorais. Entre as possíveis vantagens desses estão o aumento da eficácia terapêutica e a redução da toxicidade, uma vez que, eles possibilitam os fármacos alcançarem os alvos celulares nas razões sinérgicas esperadas (Harasym et al., 2010).

Para analisar de forma abrangente a possível sinergia entre DOX e SIM os dados obtidos no estudo de citotoxicidade foram submetidos à análise de efeito mediano utilizando o software CalcuSyn para as diferentes proporções molares tanto dos fármacos livres quanto coencapsulados. A classificação do IC encontrado para as combinações de DOX e SIM foi baseada nos diferentes graus estabelecidos por CHOU, sendo considerado efeito sinérgico  $IC < 0,9$ ; efeito aditivo  $IC$  entre  $0,9$  e  $1,45$  e efeito antagônico  $IC > 1,45$  (Chou, 2006).

Na **Figura 4** é possível verificar os valores dos índices de combinação nas concentrações de inibição celular de 50, 75 e 90%. Sabe-se que para terapias anticâncer o ideal seria o sinergismo em todas as concentrações de inibição celular (Feng et al., 2014). Para os tratamentos com DOX:SIM 1:1 foi observado efeito sinérgico para todas as concentrações de inibição. Para a combinação 1:1 na forma livre e coencapsuladas o IC médio foi  $0,80 \pm 0,09$  e  $0,67 \pm 0,14$ ; respectivamente.

Portanto, a razão molar 1:1 se mostrou mais relevante para o tratamento da linhagem 4T1 tanto na forma livre, quanto na formulação lipossomal. Vale novamente mencionar, que mesmo que a formulação lipossomal tenha tido efeito sinérgico semelhante à combinação de fármacos livres na razão 1:1, os lipossomas pH-sensíveis podem apresentar as vantagens, como a entrega da razão pretendida na região tumoral e a redução da toxicidade (Zhao et al., 2016). Esses resultados permitem sugerir que a adição equimolar de SIM ao tratamento com DOX, melhora a atividade frente células 4T1.

**Figura 4** Gráfico representando fração afetada *versus* índice de combinação (IC) para combinações DOX e SIM livres ou coencapsuladas em lipossomas.



Todos os dados representados como média  $\pm$  DP (n = 3)

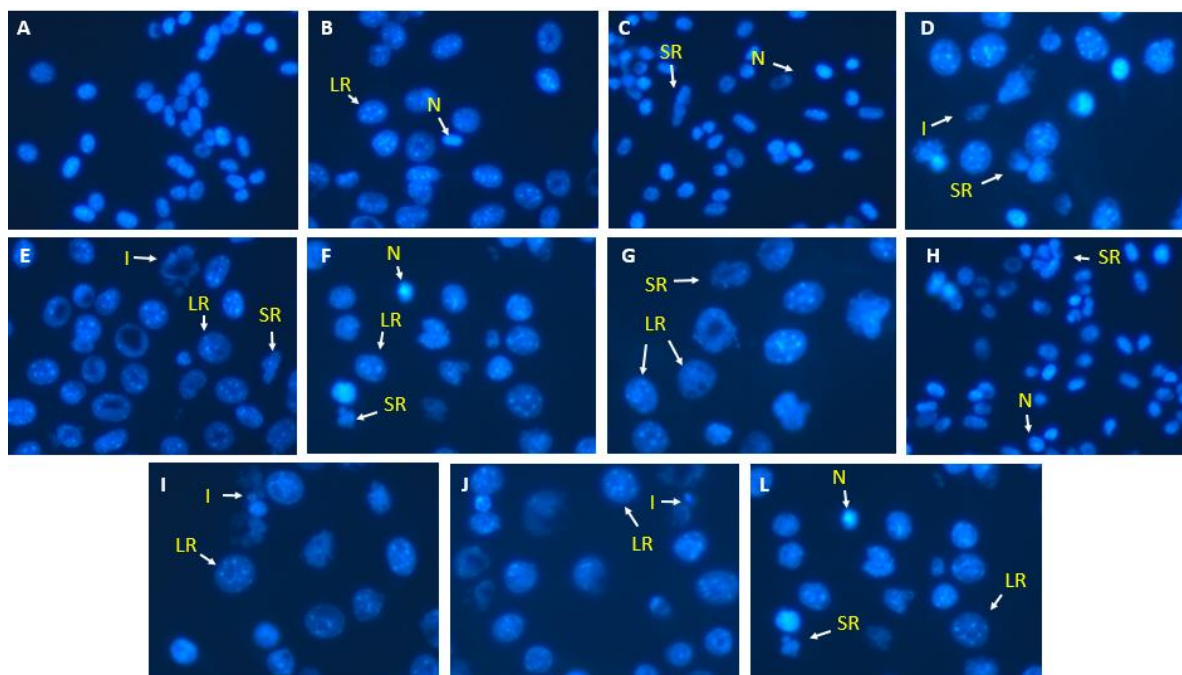
### 3 Análises morfométricas nucleares (NMA)

Como relatado anteriormente, os núcleos das células após exposição aos diferentes tratamentos foram classificados em: núcleos normais, núcleos SR, os quais correspondem tipicamente à células apoptóticas, núcleos I característicos de células mitóticas danificadas, e LR os quais correspondem a núcleos de células senescentes (Adami et al., 2021).

A **Figura 5** apresenta fotomicrografias de fluorescência de núcleos 4T1 corados com Hoescht 33342, em que o aumento nuclear para células expostas aos diferentes tratamentos é visível quando comparado a células não tratadas. Além disso, encontramos um aumento de núcleos irregulares, principalmente elípticos.

A análise morfométrica do tamanho e da irregularidade dos núcleos na linhagem celular 4T1 confirma um aumento no percentual de núcleos LR após os tratamentos que contém DOX, o que, portanto, sugere o aumento de senescência. O alargamento nuclear é uma característica que ocorre frequentemente em resposta à quimioterapia, conhecida como senescência induzida por terapia, a qual é processo de envelhecimento das células acelerado, que leva a interrupção do ciclo celular limitando assim a sua proliferação descontrolada (Morales-Valencia & David, 2021).

**Figura 5** Fotomicrografias de fluorescência de núcleos de células de câncer de mama 4T1 coradas com Hoescht 33342, Controle – sem tratamento (A); após diferentes tratamentos na concentração de 80 nM: DOX livre (B); SIM livre (C); DOX:SIM (1:1) (D); DOX:SIM (1:2) (E); DOX:SIM (2:1) (F) SpHL-D (G); SpHL-S (H); SpHL-D-S (1:1) (I); SpH-D-S (1:2) (J) ou SpHL-D-S (2:1) (L), por 48 h.

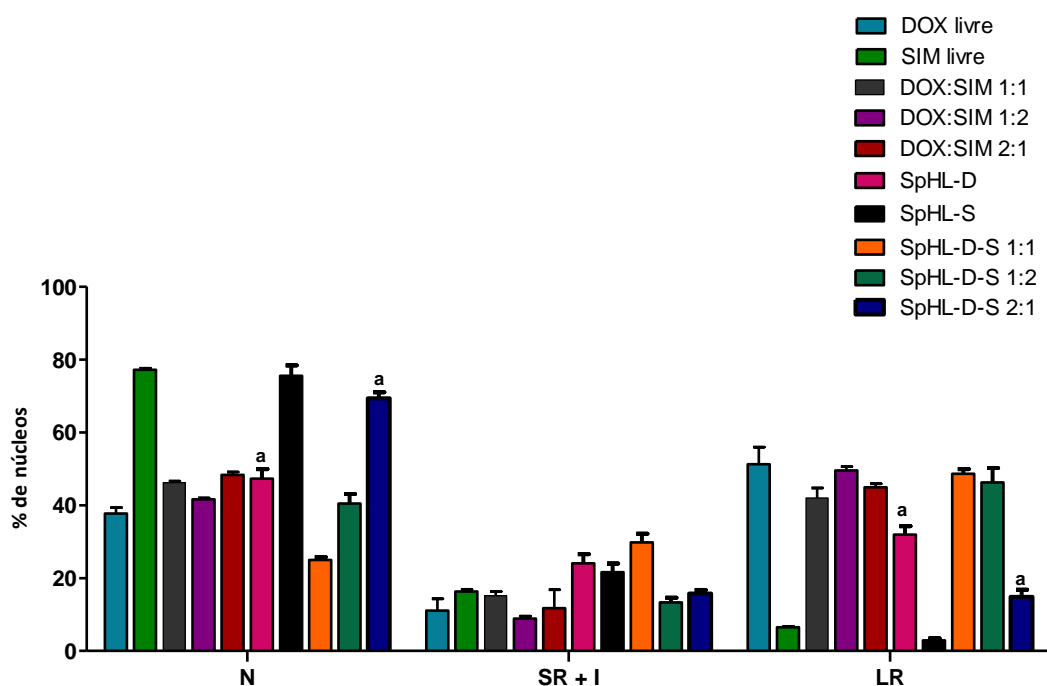


N, normal; LR, grande e regular; SR, pequeno e regular e I, irregular. As imagens são representativas de três experiências independentes. Ampliação 40X.

Na **Figura 6** é possível observar que cerca de 37% dos núcleos das células tratadas com DOX livre apareceram com morfometria normal, enquanto que para SIM livre os núcleos N corresponderam a cerca de 77%. Em relação aos núcleos LR observamos em torno de 51% para tratamentos com DOX e apenas 6% para o tratamento com SIM livre, sugerindo menor influência na alteração nuclear após o tratamento com SIM comparado à DOX. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos combinando DOX:SIM e DOX nas formas livres. Por outro lado, a encapsulação da DOX (SpHL-D) induziu um aumento significativo de células apoptóticas e redução de células em senescência quando comparado com o tratamento com a DOX livre.

Em relação às células tratadas com SpHL-D o percentual de núcleos normais foi de, aproximadamente, 47%; contra 75% para o tratamento com SpHL-S. E no que se refere aos núcleos LR foram encontrados cerca de 31% e 2% para as células tratadas com SpHL-D e SpHL-S, respectivamente. Todos os outros tratamentos variaram em uma faixa de 9 a 23% de núcleos SR, conforme mostrado na **Figura 6**.

**Figura 6** Distribuição morfométrica nuclear de núcleos de células de câncer de mama 4T1 expostas a 80 nM de diferentes tratamentos por 48 h.



Os dados apresentados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes. <sup>a</sup> representa diferença significativa do tratamento SpHL-D-S 1:1 (teste Bonferroni).

Já o co-tratamento (SpHL-D-S) potencializou o alargamento nuclear induzido pela DOX nas razões molares 1:1. No tratamento SpHL-D-S 1:1 ocorreu uma diminuição de 2 vezes na porcentagem de núcleos N e um aumento significativo de 1,5 vezes nos núcleos LR, em relação ao SpHL-D. No entanto, a razão molar 2:1 apresentou um resultado inverso, no qual a porcentagem de núcleos N foi 1,5 vezes superior e a de LR foi 2 vezes menor, em comparação ao tratamento com SpHL-D. Além disso, o tratamento com SpHL-D-S 1:1 aumentou a porcentagem de núcleos grandes e regulares e reduziu a porcentagem de núcleos normais, em relação a razão molar 2:1

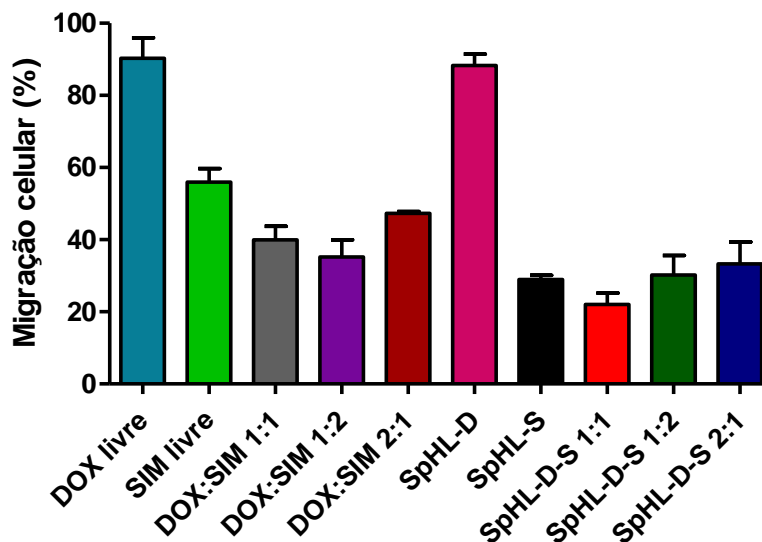
em cerca de 3 vezes. Esses resultados estão de acordo com o encontrado no teste de sinergismo, uma vez que, a razão molar 1:1 se mostrou sinérgica e a 2:1 antagônica.

#### **4 Ensaio de migração**

Na biologia celular experimental, migração e invasão são fenômenos distintos. A migração é o movimento direcionado das células sem passar por barreiras obstrutivas, enquanto a invasão requer atravessar barreiras e, portanto, é necessariamente acompanhada de remodelação da matriz extracelular (Kramer 2012). A migração celular é parte integrante em praticamente todas as etapas da complexa cascata metastática, por isso, mesmo que isoladamente, sua investigação *in vitro* é útil na triagem de inibidores (Liang et al., 2007).

Portanto, determinar a capacidade migratória de células tumorais é relevante para novas estratégias de prognóstico e tratamento do câncer. O ensaio de cicatrização de feridas, realizado nesse trabalho, permite a observação da migração celular bidimensional (2D) em culturas de monocamadas células confluentes. Portanto, o fechamento das feridas foi avaliado 24 h após a exposição aos diferentes tratamentos e para garantir que os resultados fossem devidos exclusivamente à migração celular e não à proliferação celular, os experimentos foram realizados em menor concentração de SFB (1%). Os efeitos dos tratamentos no teste de migração estão representados na **Figura 7**.

**Figura 7** Porcentagem de migração celular em relação ao controle para as células 4T1 avaliadas quando expostas a diferentes tratamentos na concentração total de 80 nM por 24 horas.

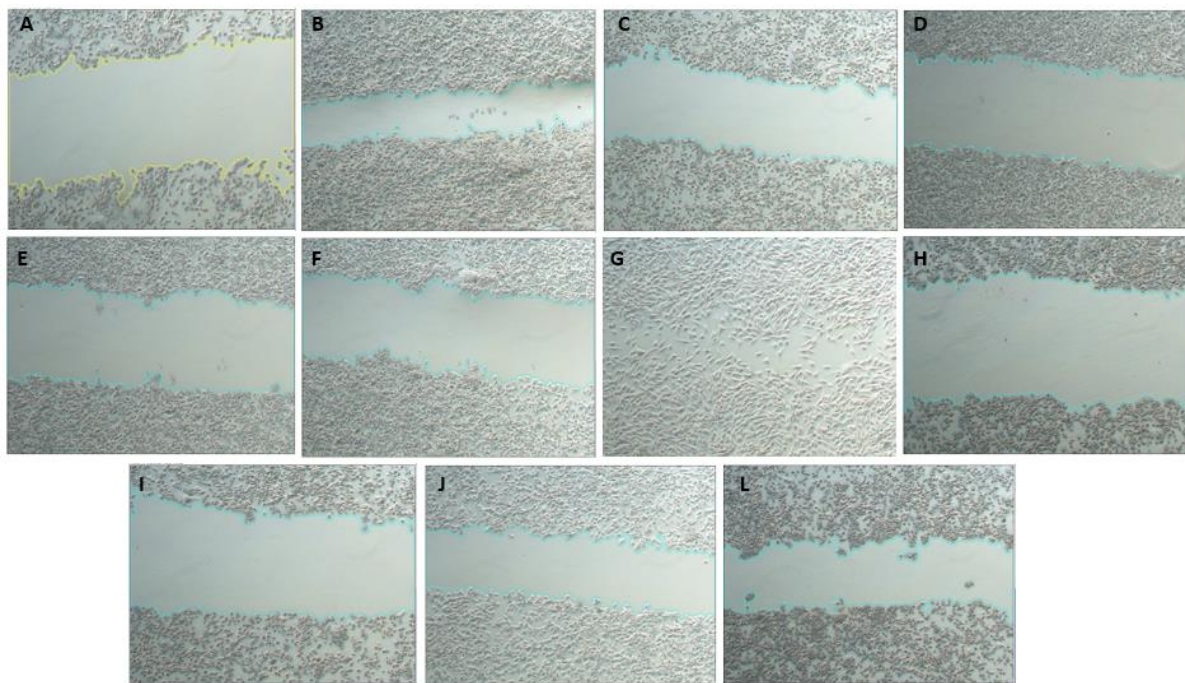


O tratamento com DOX livre suprimiu a migração de células 4T1 cerca de 1,6 vezes menos em comparação com SIM livre. Na forma lipossomal a diferença foi de 3 vezes entre SpHL-D e SpHL-S. Fotomicrografias de contraste de fase representativas dos arranhões após 24 h de exposição aos tratamentos são apresentadas na **Figura 8**. É descrito que a DOX pode causar o aumento da atividade metaloproteinases de matriz, especialmente a MMP-9, que estão envolvidas nas etapas críticas na migração de células 4T1 (Yunita et al., 2020).

Todos os tratamentos combinados de DOX:SIM, seja na forma livre quanto em lipossomas reduziram significativamente a porcentagem de migração celular em comparação com os grupos DOX ou SpHL-D. Mas não foram observadas diferenças estatisticamente diferentes entre as razões molares testadas. Quando as células foram tratadas com SIM, a porcentagem de migração em relação ao controle foi de  $55,9 \pm 3$ . E foi significativamente menor que a coadministração livre DOX:SIM nas razões 1:1 e 1:2, sendo respectivamente,  $39,9 \pm 3,0$  e  $35,3 \pm 4$ . Nenhuma diferença na migração foi observada entre o tratamento com SpHL-S e as combinações SpHL-D-S em todas as razões molares investigadas. Esses resultados sugerem que a combinação DOX:SIM pode inibir a migração induzida pela DOX.



**Figura 8** Fotomicrografias de contraste de fase das feridas de células de câncer de mama 4T1 da “ferida zero” (A) ou expostas a 80 nM de DOX livre (B); SIM livre (C); DOX:SIM (1:1) (D); DOX:SIM (1:2) (E); DOX:SIM (2:1) (F) SpHL-D (G); SpHL-S (H); SpHL-D-S (1:1) (I); SpHL-D-S (1:2) (J) ou SpHL-D-S (2:1) (L), por 24h.



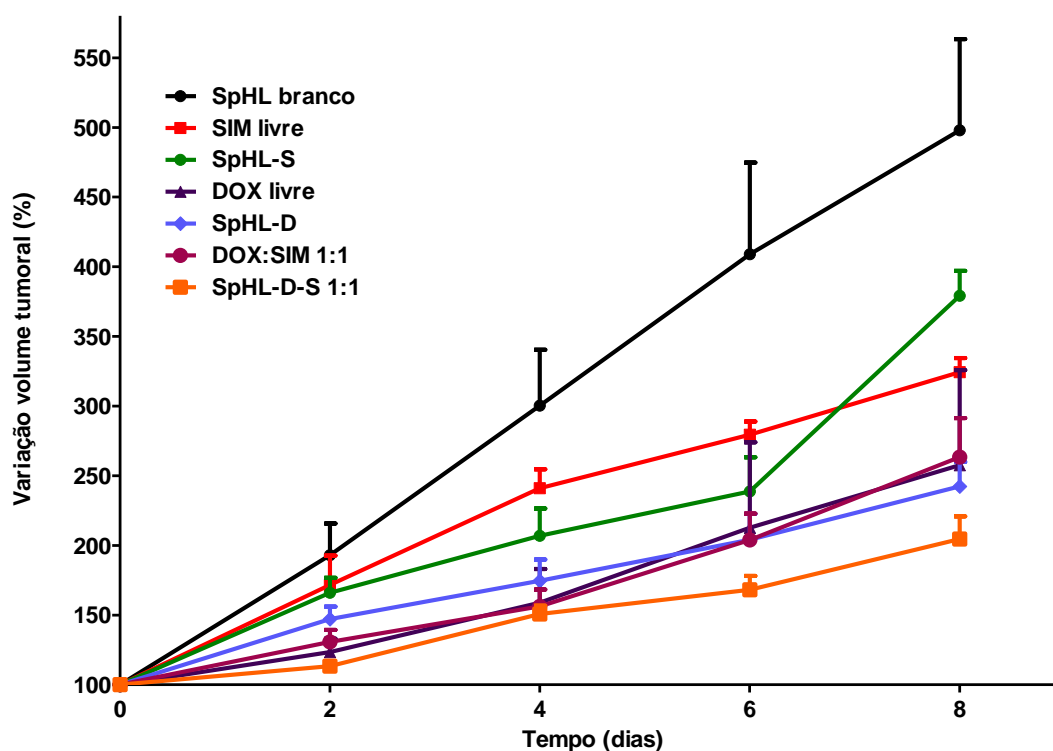
As imagens são representativas de três experiências independentes. Ampliação 5X.

### 5 Atividade antitumoral *in vivo*

O desempenho terapêutico *in vivo* dos diferentes tratamentos foi estudado em camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1 em um total de quatro doses (nos dias D0, D2, D4 e D6), conforme descrito na metodologia desse trabalho. O grupo controle, tratado com SpHL branco, apresentou perfil de crescimento tumoral rápido atingindo um volume tumoral de aproximadamente 500 mm<sup>3</sup> no D8, dada a agressividade e alta taxa de proliferação celular dessa linhagem. Todos os demais tratamentos suprimiram o crescimento do tumor em comparação com o grupo controle (**Figura 9**).

Nenhuma diferença significativa foi observada no volume tumoral dos animais que receberam DOX livre, SIM livre ou SpHL-S. O grupo tratado com SpHL-D-S apresentou a menor taxa de crescimento tumoral, no D8 em relação ao grupo DOX:SIM, mas não apresentou diferença significativa em relação ao grupo SpHL-D.

**Figura 9** Efeito de diferentes tratamentos no crescimento tumoral de camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1.

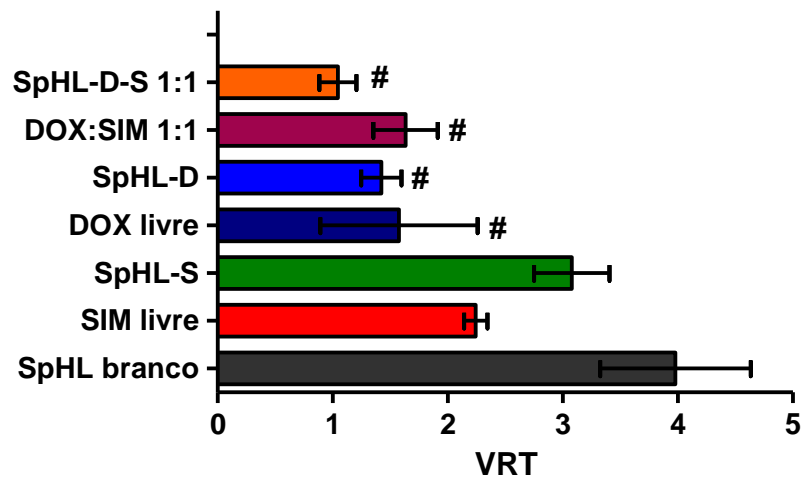


Todos os dados representados como média  $\pm$  SEM.

Entre as possíveis vantagens da coencapsulação em relação a forma livre tem-se a possibilidade de os fármacos alcançarem os alvos celulares simultaneamente. E ainda que não exista diferença significativa entre SpHL-D-S e SpHL-D em relação ao volume tumoral, sabe-se que a SIM tem potencial de manter a eficácia terapêutica com redução da toxicidade (Duarte et al., 2021; Zhang et al., 2016). Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo que avaliou o efeito de DOX e SIM combinados no combate às células cancerígenas 4T1, sendo necessários mais estudos para investigar os mecanismos envolvidos nesse processo.

Os dados de VRT foram apresentados na **Figura 10**. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos DOX livre, SpHL-D, DOX:SIM e SpHL-D-S, todos eles foram significativamente menores em relação ao controle.

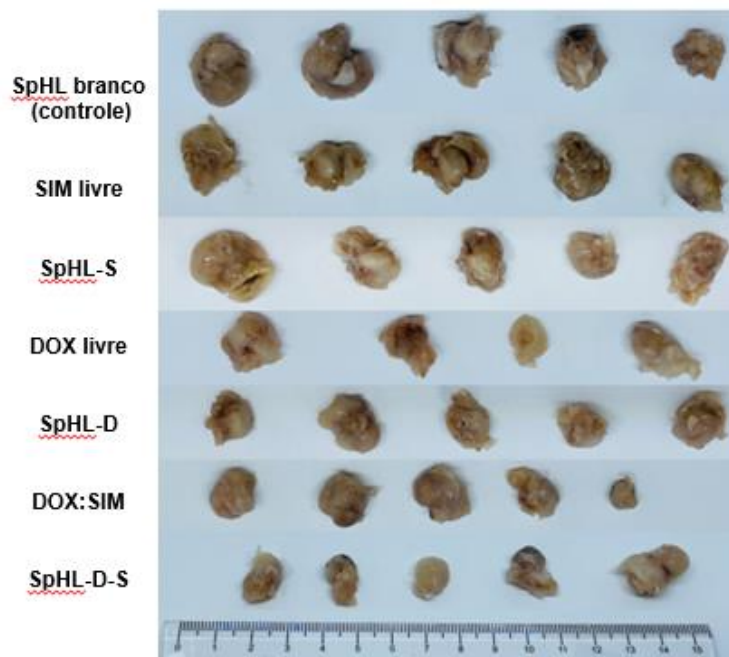
**Figura 10** Análise de volume relativo do tumor (VRT) para cada tratamento.



# representa diferença significativa em relação ao grupo controle (SpHL branco).

A **Figura 11** representa os tumores removidos dos camundongos após os tratamentos. Essa imagem confirma os valores de VRT, os tumores do grupo controle e tratados apenas com SIM (livre ou encapsulada) são visivelmente maiores que os demais grupos.

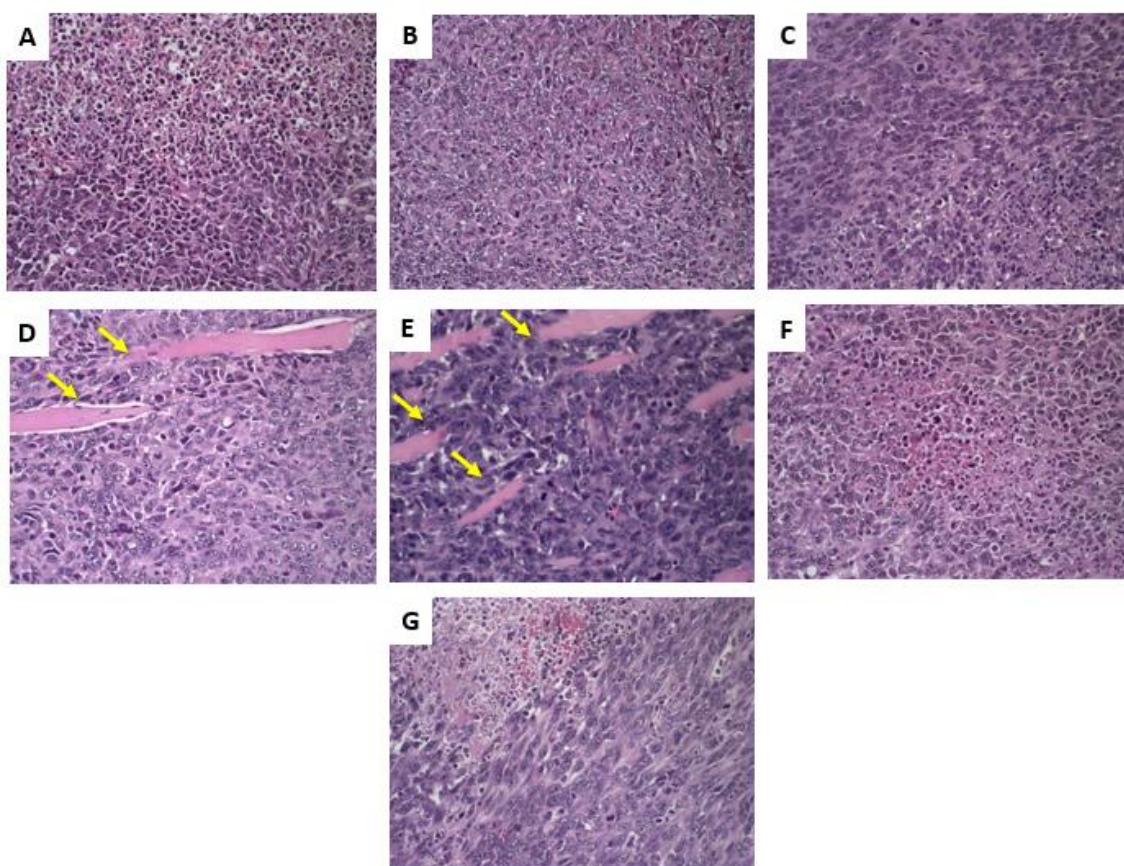
**Figura 11** Fotografias dos tumores após dissecação.



## 6 Análise histopatológica

A análise histológica para identificação de áreas de necrose e metástase foi realizada no tumor primário, coração, pulmões, fígado e rins em todos os grupos experimentais. Os tumores apresentaram necrose, independente dos tratamentos, como pode ser observado na **Figura 12**.

**Figura 12** Fotomicrografias de tecido tumoral de camundongos no (A) grupo controle; (B) SIM livre; (C) SpHL-S; (D) DOX livre; (E) SpHL-D; (F) DOX:SIM livre e (G) SpHL-D-S.



Setas amarelas indicam infiltração de células tumorais em fibras musculares do tecido adjacente ao tumor primário. Coloração HE, amplificação 40X.

Além disso, é possível observar nas imagens dos tumores dos grupos tratados apenas com DOX (**Figura 12 D e E**) infiltração celular invasora de células tumorais entre as fibras musculares.

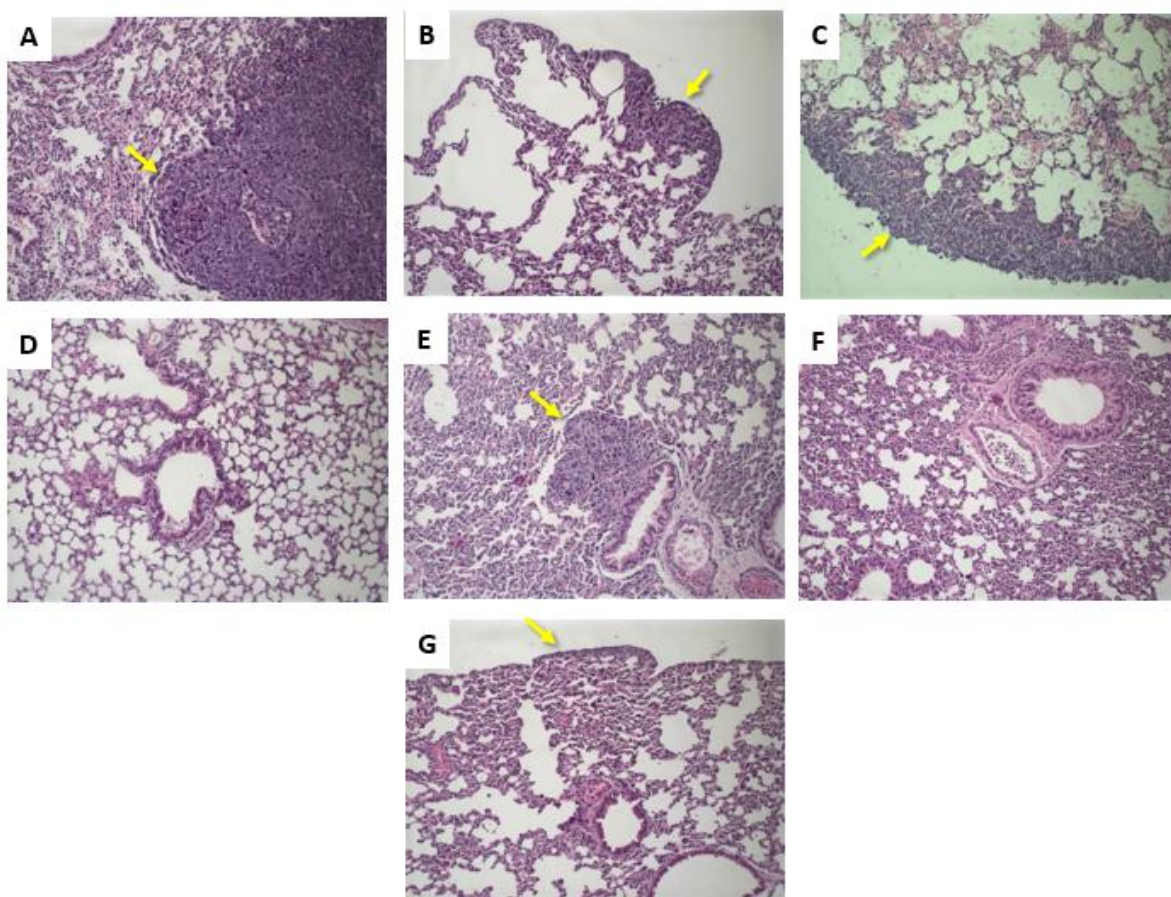
O câncer de mama 4T1 é altamente tumorigênico, invasivo e capaz de metastatizar espontaneamente do tumor primário para órgãos distantes, sendo considerado um modelo que compartilha características moleculares substanciais com o TNBC humano (Schrörs et al., 2020). A análise histológica dos pulmões (**Tabela 2** e **Figura 13**) mostraram focos de metástases extensos e múltiplos em camundongos em todos os grupos, com exceção apenas dos grupos que receberam DOX livre e SpHL-D-S.

**Tabela 2** Focos metastáticos em pulmões após administração intravenosa dos diferentes tratamentos em camundongos BALB/c transplantados subcutaneamente com células de câncer de mama 4T1.

	Animal	SpHL	SIM	SpHL-S	DOX	SpHL-D	DOX:SIM	SpHL-D-S
Pontuação	1	+++	0	++	0	+	++	+
	2	++	+	+	0	++	+	+
	3	++++	++	+	0	+	0	+
	4	++++	0	++	0	+	+	+

Os dados foram expressos por pontuação: 0, nenhuma metástase detectada; +, 1–2 focos metastáticos; ++, 3-4 focos; +++, 7-8 focos; + + + + >, 9 focos metastáticos nos pulmões.

**Figura 13** Cortes histológicos de pulmões de camundongos BALB/c fêmeas portadoras de tumor de mama 4T1 sendo no (A) grupo controle; (B) SIM livre; (C) SpHL-S; (D) DOX livre; (E) SpHL-D; (F) DOX:SIM livre e (G) SpHL-D-S.

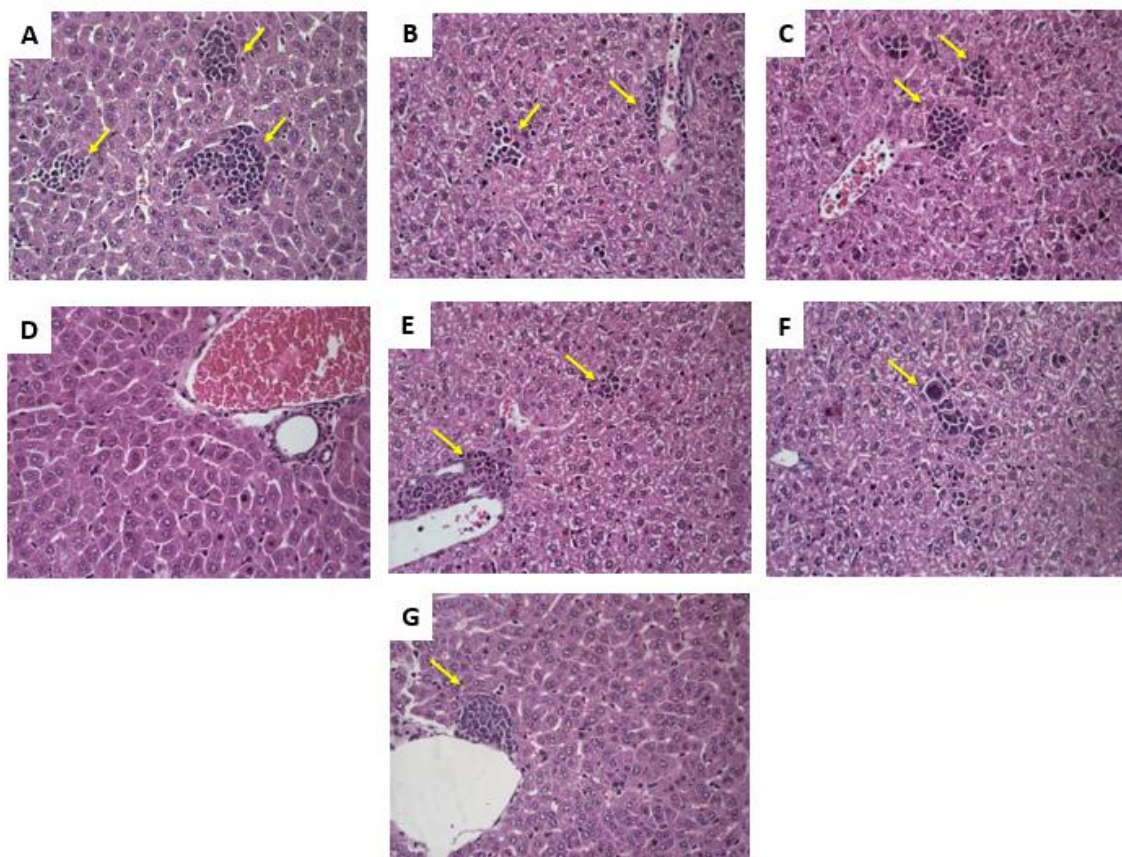


As setas amarelas indicam focos metastáticos. Coloração HE, ampliação de 20X.

O tratamento com DOX livre foi capaz de prevenir metástases pulmonares, enquanto o tratamento com SpHL-D-S apresentou cerca de 45% menos focos metastáticos, em comparação ao controle.

Com relação ao fígado, foram observados múltiplos focos de metástase nos animais dos grupos controle e nos tratados com SIM livre, SpHL-S e SpHL-D (**Figura 14**). Já os animais tratados com DOX livre, DOX:SIM e SpHL-D-S foram observados focos metastáticos raros, indicando uma melhor capacidade destes tratamentos para controlar a propagação de metástases.

**Figura 14** Cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c fêmeas portadoras de tumor de mama 4T1 tratados com A= controle; B= SIM livre; C= SpHL-S; D= DOX livre; E= SpHL-D; F= DOX:SIM livre e G= SpHL-D-S.



As setas amarelas indicam focos metastáticos. Coloração HE, ampliação de 40X.

Não foram observados focos metastáticos nos rins e no coração dos animais de qualquer grupo de tratamento. Além da ausência de focos metastáticos à histopatologia renal de todos os grupos apresentaram tecidos preservados com arquitetura típica (dados não mostrados).

## 7 Avaliação preliminar de toxicidade

Sabendo do potencial da SIM na redução da toxicidade, foram realizadas investigações quanto a mortalidade, perda de peso dos animais e parâmetros bioquímicos.

Metade dos animais do grupo DOX livre morreram durante o tratamento, enquanto nenhuma morte ocorreu no grupo SpHL-D-S (**Tabela 3**). Uma morte ocorreu no grupo SIM livre e no grupo DOX:SIM livre durante a administração, possivelmente ocasionada por embolia devido a viscosidade do veículo utilizado. Esses dados

sugerem que o SpHL-D-S podem não apenas aumentar a atividade antitumoral, mas também reduzir a toxicidade da DOX.

**Tabela 3** Mortalidade de camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1 após diferentes tratamentos. Cada tratamento foi administrado por via intravenosa, na dose de 5 mg/kg de DOX e 3,85 mg/kg de SIM.

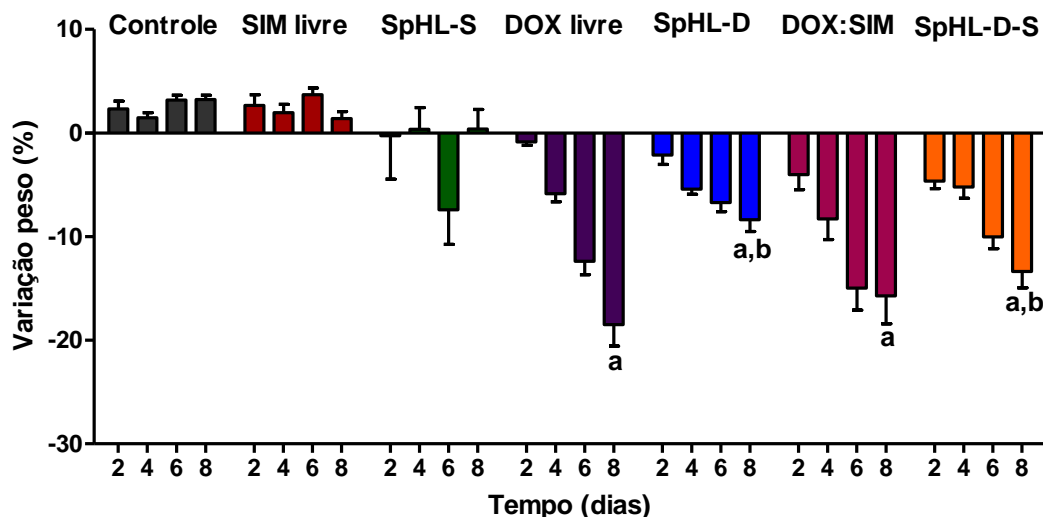
Grupo (n = 8)	Mortalidade (%)	Dia da morte
SpHL branco	0	-
SIM livre	12,5	D0
SpHL-S	0	-
DOX livre	50	D5 e D7
SpHL-D	0	-
DOX:SIM livre	12,5	D7
SpHL-D-S	0	-

O peso corporal dos camundongos foi monitorado a cada dois dias ao longo do estudo e os resultados são mostrados na **Figura 15**. Não foi observada diferença significativa em relação a variação de peso no D8 entre os camundongos tratados com SpHL branco, SIM livre e SpHL-S, o que sugere a segurança desses tratamentos. Em contraste, todos os tratamentos contendo DOX, induziram perda de peso significativa em relação ao controle. Além disso, os animais que recebem DOX em formulações lipossomais (SpHL-D e SpHL-D-S) apresentaram uma perda de peso significativamente menor que os camundongos tratados com DOX livre.

A análise bioquímica também foi realizada para investigar a toxicidade cardíaca, hepática e renal (**Tabela 4**). A presença de lesão cardíaca pode ser caracterizada por aumento significativo dos níveis séricos de CK-MB. A DOX forma ROS que induzem os cardiomiócitos a liberarem estes biomarcadores de insuficiência cardíaca (Syahputra et al., 2021).

**Figura 15** Percentual de variação do peso corporal de camundongos BALB/c transplantados subcutaneamente com células de câncer de mama 4T1 após os diferentes tratamentos, durante 8 dias.





<sup>a</sup> Representa diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle. <sup>b</sup> Representa diferença significativa ( $P < 0,05$ ) em relação ao tratamento DOX livre. Os dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média ( $n = 8$ ).

**Tabela 4** Parâmetros bioquímicos avaliados em camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1 após diferentes tratamentos.

Parâmetros	Tratamentos						
	SpHL branco	SIM livre	SpHL-S	DOX livre	SpHL-D	DOX:SIM	SpHL-D-S
AST (U/L)	100 $\pm$ 19	228 $\pm$ 34 <sup>a</sup>	166 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	333 $\pm$ 48 <sup>a</sup>	261 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	281 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	189 $\pm$ 34 <sup>a,b,d</sup>
ALT (U/L)	16 $\pm$ 4	16 $\pm$ 3	28 $\pm$ 9	91 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	88 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	86 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	47 $\pm$ 7 <sup>a,b,c</sup>
Uréia (mg/dL)	68 $\pm$ 4	62 $\pm$ 6	52 $\pm$ 6	63 $\pm$ 7	44 $\pm$ 11	63 $\pm$ 9	45 $\pm$ 6
Creatinina (mg/dL)	0,31 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,23	0,30 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,34	0,36 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,11	0,48 $\pm$ 0,30

**a** Representa diferença significativa em relação ao grupo controle; **b** Representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com DOX livre; **c** Representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com SpHL-D; **d** Representa diferença significativa em relação ao grupo tratado com DOX:SIM livre.

Com relação à toxicidade hepática, há relatos que a DOX também aumenta os níveis séricos de AST e de ALT em camundongos (Alkhatib et al., 2021). A lesão hepática induzida pela DOX é, igualmente, consequência da formação de radicais livres e geração de espécies reativas de oxigênio que promovem danos oxidativos às células.

Estas alterações levam à apoptose ou necrose dos hepatócitos e aumento expressivo de enzimas hepáticas no sangue, principalmente ALT e AST (Jacevic et al., 2017).

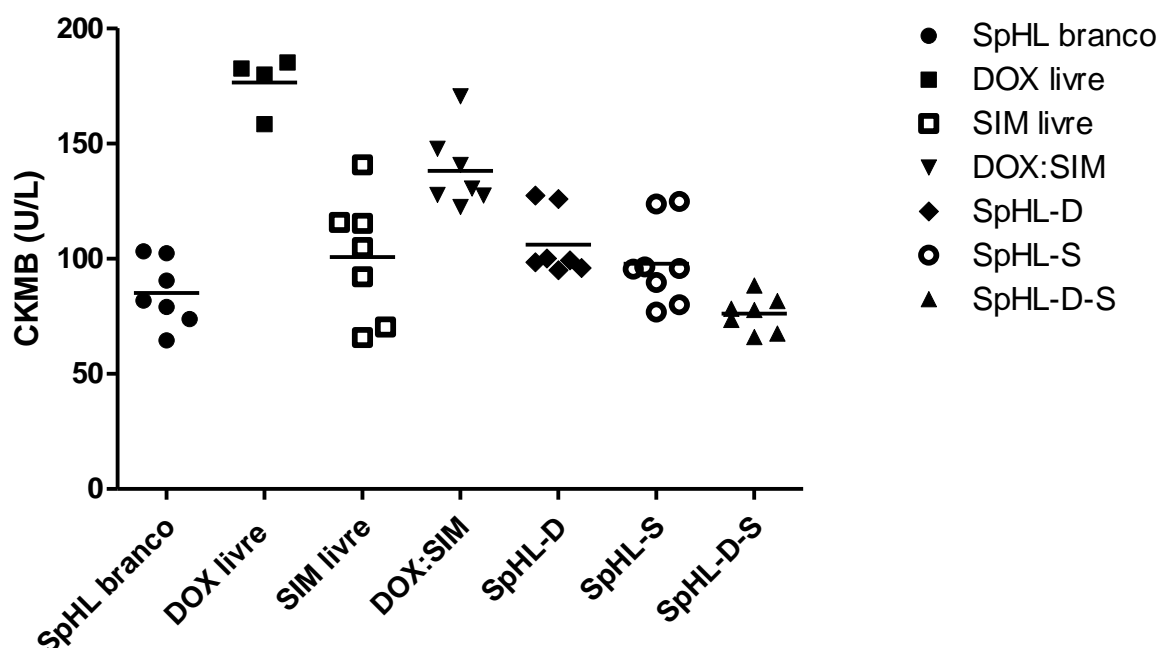
Observa-se na **Tabela 4** que atividade enzimática da transaminase AST foi significativamente maior em todos os grupos em relação ao controle. Embora o uso da SIM seja seguro, em alguns ensaios clínicos foram observadas elevações de AST até 3 vezes que o limite superior normal (Kim et al., 2016; Zhao et al., 2004). As estatinas têm sido associadas com elevações dos valores de AST, essas anomalias são clinicamente insignificantes, com raras lesões hepáticas e geralmente reversíveis sem qualquer intervenção (Averbukh et al., 2022). Mesmo com o aumento dos níveis de AST causado pela SIM, os animais tratados com SpHL-D-S apresentaram valores de AST cerca de 1,8 vezes menores que os tratados com DOX livre e 1,6 vezes menores que os tratados com DOX:SIM.

Já os níveis de ALT foram significativamente superiores para todos os grupos tratados com DOX. Vale ressaltar que não foram observadas alterações na concentração sérica destes marcadores para os animais tratados com SIM livre. O grupo SpHL-D-S apresentou níveis de ALT significativamente inferiores (cerca de 1,9 vezes), tanto em comparação com a DOX livre, quanto com o SpHL-D. Sugerindo, mais uma vez, que o SpHL-D-S contribui para a diminuição da hepatotoxicidade causada pela DOX.

Na análise dos parâmetros de toxicidade renal (níveis de uréia e creatinina), não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos tratados em relação ao controle. Esses dados estão de acordo com a histopatologia renal, uma vez que todos os grupos apresentaram animais com tecidos preservados e com arquitetura típica.

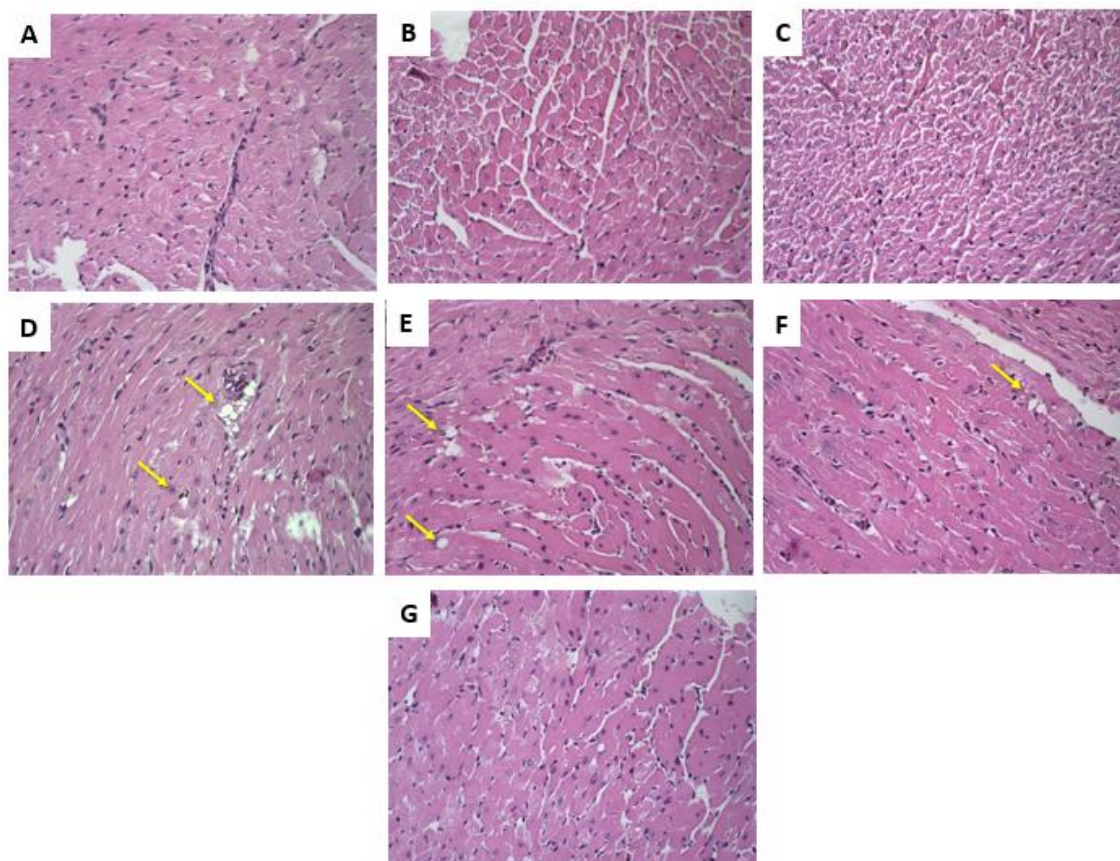
No presente estudo, também observou-se aumento significativo de CK-MB nos animais tratados com DOX livre e DOX:SIM em relação ao controle (**Figura 16**). Sendo que os níveis de CK-MB para o grupo DOX livre foi 1,9 vezes maior e para o grupo DOX:SIM foi cerca 1,5 vezes maior, em relação ao grupo controle. Já os valores de CK-MB nos animais tratados com as formulações lipossomais SpHL-D (cerca de 1,8 vezes) e SpHL-D-S (cerca de 1,5 vezes) foram significativamente menores, em relação a DOX livre e DOX:SIM respectivamente.

**Figura 16** – Níveis de CK-MB avaliados em camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1 após diferentes tratamentos.



Estudos prévios mostram que a encapsulação de DOX em lipossomas pH-sensíveis leva a uma diminuição da sua toxicidade cardíaca (de Oliveira Silva et al., 2018). Ainda é possível observar que os animais tratados com SpHL-D-S apresentaram um declínio de cerca de 1,5 vezes nos níveis de CK-MB quando comparados aos tratados com SpHL-D. Esses dados sugerem o efeito protetor da SIM na toxicidade cardíaca induzida pela DOX. Dados da literatura descrevem que as estatinas reduzem o estresse oxidativo induzido pela DOX mediante muitos efeitos antioxidantes, incluindo diminuição da NADPH oxidase, supressão do desacoplamento endotelial de óxido nítrico sintase e inibição de danos ao DNA induzidos por peróxido de hidrogênio (Alkhatib et al., 2021; Rajangam et al., 2022). Estes dados corroboram com a histologia do tecido cardíaco, em que também foi possível sugerir um efeito cardioprotetor da SIM aos efeitos adversos da DOX. As imagens histológicas do músculo cardíaco revelam que animais dos grupos controle e tratados com SIM livre ou encapsulada mostraram tecido cardíaco com arquitetura normal. Nos grupos tratados com DOX livre e SpHL-D foram observadas grandes áreas de vacuolização dos cardiomiócitos, em contraste, nos grupos tratados com a combinação dos fármacos, em que a vacuolização foi discreta ou ausente (**Figura 17**).

**Figura 17** Cortes histológicos de coração de camundongos BALB/c fêmeas portadoras de tumor de mama 4T1 tratados com (A) SpHL branco; (B) SIM livre; (C) SpHL-S; (D) DOX livre; (E) SpHL-D; (F) DOX:SIM livre e (G) SpHL-D-S.



As setas amarelas indicam vacuolização dos cardiomiócitos. Coloração HE, ampliação de 40X.

As presenças de vacúolos dentro das fibras miocárdicas podem indicar degeneração vacuolar do cardiomiócito induzida por DOX (Alhazzani et al., 2021). Essa redução na vacuolização dos cardiomiócitos pode estar relacionada aos efeitos cardiovasculares pleiotrópicos benéficos exercidos pela SIM, por meio de mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes, uma vez que, podem suprimir o estresse oxidativo induzido pela DOX (Kim et al., 2012). A possível contribuição para a cardioproteção da SIM é também descrita em um estudo clínico de coorte, em que foi observado risco significativamente menor de insuficiência cardíaca em pacientes com câncer de mama que receberam SIM durante a quimioterapia com DOX (Cardinale et al., 2010).

## 8 Conclusão

A avaliação da atividade *in vitro* demonstrou que o SpHL-D-S 1:1 favorece o sinergismo e conseqüentemente sugere maior citotoxicidade quando comparado ao DOX livre ou ao SpHL-D. No estudo *in vivo* a formulação SpHL-D-S demonstrou menor toxicidade quando comparada a DOX livre ou a SpHL-D. Sugerindo um efeito protetor potencial da SIM devido à atenuação dos distúrbios cardíacos e hepáticos. Além disso, a perda de peso corporal para animais tratados com SpHL-D-S foi significativamente menos pronunciada em comparação com animais tratados DOX livre. Diante do exposto, pode-se concluir que a coencapsulação de DOX e SIM em lipossomas pH-sensíveis é uma alternativa promissora para contornar os problemas de toxicidade gerados pela DOX, durante o tratamento de câncer de mama.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres e afeta uma em cada sete em todo o mundo (Gadaleta et al., 2022). Apesar dos avanços consideráveis na medicina oncológica, as taxas de mortalidade ainda são elevadas e o tratamento do câncer continua sendo uma área desafiadora (Decker & Schmidt, 2022). A complexidade dos mecanismos moleculares que regulam a progressão do tumor determina a heterogeneidade do câncer de mama, que representa um desafio no tratamento e prognóstico da doença (Kawiak, 2022).

A DOX está entre os agentes quimioterápicos mais utilizados devido ao seu amplo espectro de ação. Apesar disso, as desvantagens da terapia são relacionadas aos efeitos tóxicos, especialmente no coração, o que limita seu uso a longo prazo. O mecanismo de ação da toxicidade cardíaca induzida pela DOX difere do seu mecanismo antitumoral, pois envolve aumento do estresse oxidativo e indução de apoptose de cardiomiócitos (Johnson-Arbor & Dubey, 2022). Conforme discutido ao longo deste trabalho, a associação DOX e SIM apresenta potencial para o tratamento do câncer de mama (Duarte et al., 2021). A SIM proporciona melhor resposta terapêutica devido aos seus efeitos pleiotrópicos, ou seja, antiproliferativo, anti-inflamatório e antioxidante (Mohammadkhani et al., 2019).

A coencapsulação em lipossomas permite a entrega dos fármacos de forma simultânea diretamente no tecido tumoral, possibilitando melhores resultados terapêuticos em relação a administração da combinação dos fármacos livres (Franco et al., 2019). Apenas dois estudos de coencapsulação de DOX e SIM já publicados e apresentaram diversos inconvenientes relacionados a apresentação e estabilidade das formulações, além da falta de investigação em relação aos tumores de mama (Barbălată et al., 2021). Tendo em vista esse contexto e ao fato de o nosso grupo ter bem estabelecida a utilização de lipossomas pH-sensíveis como uma plataforma promissora para entrega de fármacos na terapia do câncer, seguimos o planejamento dessa tese que se baseou em responder as seguintes perguntas:

- É possível coencapsular DOX e SIM em lipossomas pH-sensíveis?
- A SIM tem atividade frente células tumorais de mama?
- A associação DOX e SIM é sinérgica?

- A SIM é capaz de reduzir a toxicidade gerada pela DOX?

Para responder estas perguntas o objetivo geral deste trabalho consistiu em: (i) desenvolver e caracterizar os lipossomas contendo DOX e SIM; (ii) avaliar *in vitro* a atividade antitumoral e o sinergismo entre os fármacos; (iii) avaliar *in vivo* a atividade antitumoral destes lipossomas, bem como a toxicidade do tratamento.

A primeira etapa deste trabalho envolveu o desenvolvimento, a caracterização físico-química e morfológica, estudos de estabilidade e liberação das formulações lipossomais. Os resultados desses estudos foram satisfatórios com o desenvolvimento de uma formulação inédita, gerando um depósito de patente (BR1020210177152). Esses lipossomas apresentaram características adequadas para serem utilizados em etapas posteriores e em estudos *in vivo*.

A próxima etapa do trabalho consistiu em avaliações *in vitro* que permitiram sugerir que há benefício em associar SIM para aumento de efeitos antitumorais da DOX nas linhagens tumorais de mama humana (MDA-MB-231, SKBR-3 e MCF-7). Foi possível encontrar relações sinérgicas entre DOX e SIM. Além disso, a associação de SIM com DOX permitiu um aumento da porcentagem de inibição da migração celular e de células em senescência. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos da atuação da SIM nas células tumorais.

Na última etapa deste trabalho foram realizados os estudos de viabilidade celular *in vitro* e estudos da eficácia antitumoral *in vivo* em modelo tumoral murino 4T1, sendo que a formulação (SpHL-D-S) apresentou eficácia antitumoral equivalente ao obtido com SpHL-D, mas reduziu significativamente os efeitos tóxicos gerados pelo tratamento com DOX. A perda de peso observada para animais tratados com SpHL-D-S foi significativamente menos pronunciada comparativamente àquela observada para animais tratados com DOX livre. Nenhuma morte foi observada ao longo do estudo em animais tratados com SpHL-D-S, enquanto que houve morte de 50% dos animais tratados com DOX livre. Além disso, foi observado que os tratamentos contendo SIM preveniram danos cardíacos associados a DOX, com a diminuição da vacuolização do tecido cardíaco e com redução dos valores de CK-MB.

Tayyari e colaboradores relataram que os tumores triplo negativos, como MDA-MB-321 e 4T1, apresentaram aumento da síntese de pirimidina e níveis elevados de mioinositol e taurina (Tayyari et al., 2018). Esse achado foi confirmado por Arroyo-Crespo e colaboradores, que por meio de análise metabolômica de extratos orgânicos forneceram mais evidências sobre a progressão dos tumores triplo negativos relatando que eles também apresentaram maiores concentrações de colesterol (Arroyo-Crespo et al., 2019). Essas alterações refletem a avidez dessas células cancerígenas proliferativas por colesterol, uma característica diretamente relacionada com a agressividade do tumor (Beloribi-Djefafia et al., 2016). Esse fato ajudaria explicar o melhor desempenho da SIM, nesse trabalho, frente as linhagens MDA-MB-231 e 4T1. Uma vez que a SIM atuaria diretamente inibindo a via do mevalonato, contribuindo para a redução da proliferação celular.

A inibição da via do colesterol também está diretamente envolvida nos mecanismos de sinalização que controlam o citoesqueleto das células tumorais (O'Bryan, 2010). Segundo Dorsch e colaboradores confirmam que a morfologia do citoesqueleto é afetada pelo tratamento com estatina, além de levar a uma perda de filamentos de actina (Dorsch et al., 2021). Sabendo que o citoesqueleto é fundamental para que ocorra a movimentação celular, podemos sugerir que essas alterações dos filamentos de actina induzidas pela SIM, contribuíram para a redução da migração celular em todas as linhagens celulares de mama avaliadas nesse trabalho.

Além disso, a inibição da cascata de mevalonato pela SIM, também leva a inibição indireta de GTPases (Rho, Ras, Rac e Cdc24) que demonstrou ser um fator importante na regulação da proliferação celular (Henninger & Fritz, 2017). Em particular, a inibição de Rho e seu alvo a jusante, a proteína quinase vem sendo descrita como o principal mecanismo subjacente aos efeitos pleiotrópicos das estatinas. Ademais a Rac também leva à ativação do sistema de óxidos NADPH e subsequente geração de ROS. Por isso, a Rac tem recebido grande atenção por seu envolvimento na hipertrofia miocárdica e insuficiência cardíaca que é exibido por remodelação ventricular e aumento do estresse oxidativo (Zhou & Liao, 2009). O mecanismo preciso que medeia a cardioproteção das estatinas não é ainda bem compreendido, mas já têm evidências que permite sugerir que as estatinas podem



prevenir o desenvolvimento de cardiomiopatia induzida por DOX (Dadson et al., 2022). Nesse contexto, a via do mevalonato, mais uma vez, ajuda a explicar os resultados encontrados nesse trabalho. Podemos sugerir que a inibição de GTPases pela SIM, contribuiu para a redução de toxicidade cardíaca induzida pela DOX, observada no estudo *in vivo*.

### **Conclusão Geral**

Com esse trabalho foi possível desenvolver uma formulação contendo DOX e SIM, com características adequadas para administração *in vivo* e que responde a estímulos de pH. Além disso, a formulação desenvolvida demonstrou bom desempenho no controle de células tumorais de mama humanas, bem como a SIM isolada. Foi possível detectar razões sinérgicas entre DOX e SIM para diferentes linhagens celulares. A presença de SIM nos tratamentos levou a uma diminuição da porcentagem de migração celular e a indícios de indução de senescência. O SpHL-D-S também trouxe benefícios quanto a toxicidade, diminuindo a taxa de morte, perda de peso menos pronunciada dos animais e reduzindo toxicidade hepática e cardíaca. Dessa forma, podemos sugerir que a SIM além melhorar a eficácia atividade antitumoral em células do câncer de mama, também esta envolvida na redução de efeitos adversos gerados pela DOX. Dessa forma, a formulação SpHL-D-S apresentou potencial promissor para o tratamento do câncer de mama.

### **7 PERSPECTIVAS**

- Melhorar a formulação na forma liofilizada.
- Determinar as concentrações plasmáticas e no tecido tumoral de cada fármaco, visando identificar a razão molar de DOX e SIM presente no tumor.
- Realizar análises *in vitro* adicionais, como quantificação de caspases, com intuito de elucidar o mecanismo de ação do sistema desenvolvido e NMA a longo prazo.
- Realizar análises imonohistoquímicas dos tumores através de marcadores de apoptose e da expressão de caderinas.
- Avaliar a toxicidade aguda dos SpHL-D-S em modelo murino.
- Avaliar a cardiotoxicidade da formulação.

**REFERÊNCIAS**

Adami, B. S., Diz, F. M., Oliveira Gonçalves, G. P., Reghelin, C. K., Scherer, M., Dutra, A. P., Papaléo, R. M., de Oliveira, J. R., Morrone, F. B., Wieck, A., & Xavier, L. L. (2021). Morphological and mechanical changes induced by quercetin in human T24 bladder cancer cells. *Micron*, 151(March). <https://doi.org/10.1016/j.micron.2021.103152>

Ahern, T. P., Pedersen, L., Tarp, M., Cronin-Fenton, D. P., Garne, J. P., Silliman, R. A., Sorensen, H. T., & Lash, T. L. (2011). Statin Prescriptions and Breast Cancer Recurrence Risk: A Danish Nationwide Prospective Cohort Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 103(19), 1461–1468. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr291>

Ahmad, A. (Ed.). (2019). *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance* (Vol. 1152). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6>

Akhtari, J., Rezayat, S. M., Teymouri, M., Alavizadeh, S. H., Gheybi, F., Badiie, A., & Jaafari, M. R. (2016). Targeting, bio distributive and tumor growth inhibiting characterization of anti-HER2 affibody coupling to liposomal doxorubicin using BALB/c mice bearing TUBO tumors. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.060>

Al-malky, H. S., Al Harthi, S. E., & Osman, A.-M. M. (2020). Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 26(2), 434–444. <https://doi.org/10.1177/1078155219877931>

Alhazzani, K., Alotaibi, M. R., Alotaibi, F. N., Algerian, K., As Sobeai, H. M., Alhoshani, A. R., Alanazi, A. Z., Alanazi, W. A., & Alswayyed, M. (2021). Protective effect of valsartan against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Histopathology and metabolomics in vivo study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(9). <https://doi.org/10.1002/jbt.22842>

Alizadeh, J., Zeki, A. A., Mirzaei, N., Tewary, S., Rezaei Moghadam, A., Glogowska, A., Nagakannan, P., Eftekharpour, E., Wiechec, E., Gordon, J. W.,

Xu, F. Y., Field, J. T., Yoneda, K. Y., Kenyon, N. J., Hashemi, M., Hatch, G. M., Hombach-Klonisch, S., Klonisch, T., & Ghavami, S. (2017). Mevalonate Cascade Inhibition by Simvastatin Induces the Intrinsic Apoptosis Pathway via Depletion of Isoprenoids in Tumor Cells. *Scientific Reports*, 7(1), 44841. <https://doi.org/10.1038/srep44841>

Allison, K. H. (2012). Molecular Pathology of Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 138(6), 770–780. <https://doi.org/10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO>

Alupe, M. C., Licarete, E., Patras, L., & Banciu, M. (2015). Liposomal simvastatin inhibits tumor growth via targeting tumor-associated macrophages-mediated oxidative stress. *Cancer Letters*, 356(2), 946–952. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.010>

Amalina, N., Nurhayati, I. P., & Meiyanto, E. (2017). Doxorubicin Induces Lamellipodia Formation and Cell Migration. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 8(2), 61. <https://doi.org/10.14499/indonesianjcanchemoprev8iss2pp61-67>

Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>

Arroyo-Crespo, J. J., Armiñán, A., Charbonnier, D., Deladriere, C., Palomino-Schätzlein, M., Lamas-Domingo, R., Forteza, J., Pineda-Lucena, A., & Vicent, M. J. (2019). Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *International Journal of Cancer*, 145(8), 2267–2281. <https://doi.org/10.1002/ijc.32270>

Arroyo-Crespo, J. J., Armiñán, A., Charbonnier, D., Deladriere, C., Palomino-Schätzlein, M., Lamas-Domingo, R., Forteza, J., Pineda-Lucena, A., & Vicent, M. J. (2019). Characterization of triple-negative breast cancer preclinical models provides functional evidence of metastatic progression. *International Journal of*

*Cancer*, 145(8), 2267–2281. <https://doi.org/10.1002/ijc.32270>

Attama, A. A., Nnamani, P. O., Onokala, O. B., Ugwu, A. A., & Onugwu, A. L. (2022). Nanogels as target drug delivery systems in cancer therapy: A review of the last decade. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.874510>

Averbukh, L. D., Turshudzhyan, A., Wu, D. C., & Wu, G. Y. (2022). Statin-induced Liver Injury Patterns: A Clinical Review. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 10(3), 543–552. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2021.00271>

Ayoub, N. M., Al-Shami, K. M., Alqudah, M. A., & Mhaidat, N. M. (2017). Crizotinib, a MET inhibitor, inhibits growth, migration, and invasion of breast cancer cells in vitro and synergizes with chemotherapeutic agents. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4869–4883. <https://doi.org/10.2147/OTT.S148604>

Bai, F., Yu, Z., Gao, X., Gong, J., Fan, L., & Liu, F. (2019). Simvastatin induces breast cancer cell death through oxidative stress up-regulating miR-140-5p. *Aging*, 11(10), 3198–3219. <https://doi.org/10.18632/aging.101974>

Bandyopadhyay, A., Wang, L., Agyin, J., Tang, Y., Lin, S., Yeh, I.-T., De, K., & Sun, L.-Z. (2010). Doxorubicin in Combination with a Small TGF $\beta$  Inhibitor: A Potential Novel Therapy for Metastatic Breast Cancer in Mouse Models. *PLoS ONE*, 5(4), e10365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010365>

Bannon, M. S., López Ruiz, A., Corrotea Reyes, K., Marquez, M., Wallizadeh, Z., Savarmand, M., LaPres, C. A., Lahann, J., & McEnnis, K. (2021). Nanoparticle Tracking Analysis of Polymer Nanoparticles in Blood Plasma. *Particle and Particle Systems Characterization*, 38(6). <https://doi.org/10.1002/ppsc.202100016>

Barbălată, C. I., Porfire, A. S., Sesarman, A., Rauca, V. F., Banciu, M., Muntean, D., Știufiuc, R., Moldovan, A., Moldovan, C., & Tomuță, I. (2021). A screening study for the development of simvastatin-doxorubicin liposomes, a co-formulation with future perspectives in colon cancer therapy. *Pharmaceutics*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101526>

Barenholz, Y. (Chezy). (2012). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, *160*(2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>

Beckwitt, C. H., Brufsky, A., Oltvai, Z. N., & Wells, A. (2018a). Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. *Breast Cancer Research*, *20*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1066-z>

Beckwitt, C. H., Brufsky, A., Oltvai, Z. N., & Wells, A. (2018b). Statin drugs to reduce breast cancer recurrence and mortality. *Breast Cancer Research*, *20*(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1066-z>

Beloribi-Djefafia, S., Vasseur, S., & Guillaumond, F. (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, *5*(1), e189–e189. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.49>

Bines, J., Earl, H., Buzaid, A. C., & Saad, E. D. (2014). Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter? *Annals of Oncology*, *25*(6), 1079–1085. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu007>

Biswas, S., Guix, M., Rinehart, C., Dugger, T. C., Chytil, A., Moses, H. L., Freeman, M. L., & Arteaga, C. L. (2007). Inhibition of TGF- $\beta$  with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(5), 1305–1313. <https://doi.org/10.1172/JCI30740>

Boratto, F. A., Franco, M. S., Barros, A. L. B., Cassali, G. D., Malachias, A., Ferreira, L. A. M., & Leite, E. A. (2020). Alpha-tocopheryl succinate improves encapsulation, pH-sensitivity, antitumor activity and reduces toxicity of doxorubicin-loaded liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *144*, 105205. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105205>

Borgquist, S., Bjarnadottir, O., Kimbung, S., & Ahern, T. P. (2018). Statins: a role in breast cancer therapy? *Journal of Internal Medicine*, *284*(4), 346–357. <https://doi.org/10.1111/joim.12806>

Borgquist, Signe, Broberg, P., Tojjar, J., & Olsson, H. (2018). Statin use and breast cancer survival: A Swedish nationwide study. *BioRxiv*, 1–9. <https://doi.org/10.1101/335034>

Bou Zerdan, M., Ghorayeb, T., Saliba, F., Allam, S., Bou Zerdan, M., Yaghi, M., Bilani, N., Jaafar, R., & Nahleh, Z. (2022). Triple Negative Breast Cancer: Updates on Classification and Treatment in 2021. *Cancers*, 14(5), 1253. <https://doi.org/10.3390/cancers14051253>

Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 975. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>

Breast Pathology. (2022). *Histopathology*, 81(S1), 15–36. <https://doi.org/10.1111/his.14739>

Buranrat, B., Senggunprai, L., Prawan, A., & Kukongviriyapan, V. (2022). Effects of Simvastatin in Combination with Anticancer Drugs on Proliferation and Migration in Cholangiocarcinoma Cells. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(1). <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.897>

Buranrat, B., Suwannaloet, W., & Naowaboot, J. (2017a). Simvastatin potentiates doxorubicin activity against MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Letters*, 14(5), 6243–6250. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6783>

Buranrat, B., Suwannaloet, W., & Naowaboot, J. (2017b). Simvastatin potentiates doxorubicin activity against MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6783>

Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 808. <https://doi.org/10.3390/jpm11080808>

Campbell, M. J., Esserman, L. J., Zhou, Y., Shoemaker, M., Lobo, M., Borman, E., Baehner, F., Kumar, A. S., Adduci, K., Marx, C., Petricoin, E. F., Liotta, L. A., Winters, M., Benz, S., & Benz, C. C. (2006). Breast Cancer Growth Prevention by Statins. *Cancer Research*, 66(17), 8707–8714. <https://doi.org/10.1158/0008->

5472.CAN-05-4061

Cardinale, D., Colombo, A., Lamantia, G., Colombo, N., Civelli, M., De Giacomi, G., Rubino, M., Veglia, F., Fiorentini, C., & Cipolla, C. M. (2010). Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, *55*(3), 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.03.095>

Cerrito, M. G., De Giorgi, M., Pelizzoni, D., Bonomo, S. M., Digiaco, N., Scagliotti, A., Bugarin, C., Gaipa, G., Grassilli, E., Lavitrano, M., Giovannoni, R., Bidoli, P., & Cazzaniga, M. E. (2018). Metronomic combination of Vinorelbine and 5Fluorouracil is able to inhibit triple-negative breast cancer cells. Results from the proof-of-concept VICTOR-0 study. *Oncotarget*, *9*(44), 27448–27459. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25422>

Chanan-Khan, A., Szebeni, J., Savay, S., Liebes, L., Rafique, N. M., Alving, C. R., & Muggia, F. M. (2003). Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®): possible role in hypersensitivity reactions. *Annals of Oncology*, *14*(9), 1430–1437. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdg374>

Chen, M. C., Tsai, Y. C., Tseng, J. H., Liou, J. J., Horng, S., Wen, H. C., Fan, Y. C., Zhong, W. Bin, & Hsu, S. P. (2017). Simvastatin inhibits cell proliferation and migration in human anaplastic thyroid cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122690>

Chen, M. J., Cheng, A. C., Lee, M. F., & Hsu, Y. C. (2018). Simvastatin induces G 1 arrest by up-regulating GSK3 $\beta$  and down-regulating CDK4/cyclin D1 and CDK2/cyclin E1 in human primary colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(6), 4618–4625. <https://doi.org/10.1002/jcp.26156>

Chen, W. L., Guo, D. W., Shen, Y. Y., Guo, S. R., & Ruan, K. P. (2012). Effects of highly hygroscopic excipients on the hydrolysis of simvastatin in tablet at high relative humidity. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *74*(6), 527–534. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.110587>

Chotenimitkhun, R., D'Agostino, R., Lawrence, J. A., Hamilton, C. A., Jordan, J.

H., Vasu, S., Lash, T. L., Yeboah, J., Herrington, D. M., & Hundley, W. G. (2015). Chronic Statin Administration May Attenuate Early Anthracycline-Associated Declines in Left Ventricular Ejection Function. *Canadian Journal of Cardiology*, *31*(3), 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2014.11.020>

Chou, T.-C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, *22*, 27–55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

Colditz, G. A., Kaphingst, K. A., Hankinson, S. E., & Rosner, B. (2012). Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Research and Treatment*, *133*(3), 1097–1104. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-1985-9>

Cortes, J. E., Lin, T. L., Uy, G. L., Ryan, R. J., Faderl, S., & Lancet, J. E. (2021). Quality-adjusted Time Without Symptoms of disease or Toxicity (Q-TWiST) analysis of CPX-351 versus 7 + 3 in older adults with newly diagnosed high-risk/secondary AML. *Journal of Hematology and Oncology*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01119-w>

Cruz, P. M. R., Mo, H., McConathy, W. J., Sabnis, N., & Lacko, A. G. (2013). The role of cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00119>

Cserni, G. (2020). Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. *Pathologica*, *112*(01), 25–41. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-1-20>

Dadson, K., Thavendiranathan, P., Hauck, L., Grothe, D., Azam, M. A., Stanley-Hasnain, S., Mahiny-Shahmohammady, D., Si, D., Bokhari, M., Lai, P. F. H., Massé, S., Nanthakumar, K., & Billia, F. (2022). Statins protect against early



stages of doxorubicin-induced cardiotoxicity through the regulation of Akt signaling and SERCA2. *CJC Open*. <https://doi.org/10.1016/j.cjco.2022.08.006>

Dantas de Araújo Santos Camargo, J., dos Santos, J., Simões, T. C., Carvalho, J. B. L. de, Silva, G. W. dos S., Dantas, E. S. O., Rodrigues, W. T. da S., Freire, F. H. M. de A., & Meira, K. C. (2021). Mortality due to breast cancer in a region of high socioeconomic vulnerability in Brazil: Analysis of the effect of age-period and cohort. *PLOS ONE*, *16*(8), e0255935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255935>

de Oliveira Silva, J., Fernandes, R. S., Ramos Oda, C. M., Ferreira, T. H., Machado Botelho, A. F., Martins Melo, M., de Miranda, M. C., Assis Gomes, D., Dantas Cassali, G., Townsend, D. M., Rubello, D., Oliveira, M. C., & de Barros, A. L. B. (2019). Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *118*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109323>

de Oliveira Silva, J., Miranda, S. E. M., Leite, E. A., de Paula Sabino, A., Borges, K. B. G., Cardoso, V. N., Cassali, G. D., Guimarães, A. G., Oliveira, M. C., & de Barros, A. L. B. (2018). Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *352*, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.037>

Decker, T., & Schmidt, M. (2022). New Opportunities in Advanced Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment*, *45*(1–2), 1–3. <https://doi.org/10.1159/000521414>

Desai, P., Lehman, A., Chlebowski, R. T., Kwan, M. L., Arun, M., Manson, J. E., Lavasani, S., Wasswertheil-Smoller, S., Sarto, G. E., LeBoff, M., Cauley, J., Cote, M., Beebe-Dimmer, J., Jay, A., & Simon, M. S. (2015). Statins and breast cancer stage and mortality in the Women's Health Initiative. *Cancer Causes & Control*, *26*(4), 529–539. <https://doi.org/10.1007/s10552-015-0530-7>

Di Bello, E., Zwergel, C., Mai, A., & Valente, S. (2020). The Innovative Potential of Statins in Cancer: New Targets for New Therapies. *Frontiers in Chemistry*,

8(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00516>

Ding, Y., Cui, W., Sun, D., Wang, G.-L., Hei, Y., Meng, S., Chen, J., Xie, Y., & Wang, Z. (2017). In vivo study of doxorubicin-loaded cell-penetrating peptide-modified pH-sensitive liposomes: biocompatibility, bio-distribution, and pharmacodynamics in BALB/c nude mice bearing human breast tumors. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 11, 3105–3117. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S149814>

Dorsch, M., Kowalczyk, M., Planque, M., Heilmann, G., Urban, S., Dujardin, P., Forster, J., Ueffing, K., Nothdurft, S., Oeck, S., Paul, A., Liffers, S. T., Kaschani, F., Kaiser, M., Schramm, A., Siveke, J. T., Winslow, M. M., Fendt, S.-M., Nalbant, P., & Grüner, B. M. (2021). Statins affect cancer cell plasticity with distinct consequences for tumor progression and metastasis. *Cell Reports*, 37(8), 110056. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110056>

dos Santos Ferreira, D., Jesus de Oliveira Pinto, B. L., Kumar, V., Cardoso, V. N., Fernandes, S. O., Souza, C. M., Cassali, G. D., Moore, A., Sosnovik, D. E., Farrar, C. T., Leite, E. A., Alves, R. J., de Oliveira, M. C., Guimarães, A. R., & Caravan, P. (2017). Evaluation of antitumor activity and cardiac toxicity of a bone-targeted pH-sensitive liposomal formulation in a bone metastasis tumor model in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(5), 1693–1701. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.005>

Duarte, J. A., de Barros, A. L. B., & Leite, E. A. (2021). The potential use of simvastatin for cancer treatment: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111858. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111858>

Duncan, R. E., El-Sohemy, A., & Archer, M. C. (2004). Mevalonate Promotes the Growth of Tumors Derived from Human Cancer Cells in Vivo and Stimulates Proliferation in Vitro with Enhanced Cyclin-dependent Kinase-2 Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33079–33084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400732200>

DuPre', S. A., Redelman, D., & Hunter, K. W. (2007). The mouse mammary

carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *International Journal of Experimental Pathology*, 88(5), 351–360. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x>

Eldar-Boock, A., Polyak, D., Scomparin, A., & Satchi-Fainaro, R. (2013). Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(4), 682–689. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.014>

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

ENDO, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 86(5), 484–493. <https://doi.org/10.2183/pjab.86.484>

Fang, J., Islam, W., & Maeda, H. (2020). Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 157, 142–160. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.005>

Feleszko, W., Mlynarczuk, I., Balkowiec-Iskra, E. Z., Czajka, A., Switaj, T., Stoklosa, T., Giermasz, A., & Jakóbisiak, M. (2000). Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(5), 2044–2052. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815931>

Feng, L.-X., Li, M., Liu, Y.-J., Yang, S.-M., & Zhang, N. (2014). Synergistic Enhancement of Cancer Therapy Using a Combination of Ceramide and Docetaxel. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4201–4220. <https://doi.org/10.3390/ijms15034201>

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T.-C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression:

Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

Filippi-Chiela, E. C., Oliveira, M. M., Jurkovski, B., Callegari-Jacques, S. M., da Silva, V. D., & Lenz, G. (2012). Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042522>

Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T. F., Al Lami, F. H., Alam, T., Alizadeh-Navaei, R., Allen, C., Alsharif, U., Alvis-Guzman, N., Amini, E., Anderson, B. O., Aremu, O., Artaman, A., Asgedom, S. W., Assadi, R., Atey, T. M., Avila-Burgos, L., Awasthi, A., Ba Saleem, H. O., Barac, A., ... Naghavi, M. (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016. *JAMA Oncology*, 4(11), 1553. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2706>

Foucquier, J., & Guedj, M. (2015). Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(3), e00149. <https://doi.org/10.1002/prp2.149>

Franco, M. S., Gomes, E. R., Roque, M. C., & Oliveira, M. C. (2021). Triggered Drug Release From Liposomes: Exploiting the Outer and Inner Tumor Environment. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.623760>

Franco, M. S., & Oliveira, M. C. (2017). Ratiometric drug delivery using non-liposomal nanocarriers as an approach to increase efficacy and safety of combination chemotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 584–595. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.009>

Franco, M. S., Roque, M. C., de Barros, A. L. B., de Oliveira Silva, J., Cassali, G. D., & Oliveira, M. C. (2019). Investigation of the antitumor activity and toxicity of long-circulating and fusogenic liposomes co-encapsulating paclitaxel and doxorubicin in a murine breast cancer animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1728–1739. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.011>

Franco, M. S., Roque, M. C., & Oliveira, M. C. (2019). Short and long-term effects of the exposure of breast cancer cell lines to different ratios of free or co-encapsulated liposomal paclitaxel and doxorubicin. *Pharmaceutics*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040178>

Fujiwara, D., Tsubaki, M., Takeda, T., Tomonari, Y., Koumoto, Y., Sakaguchi, K., & Nishida, S. (2017). Statins induce apoptosis through inhibition of Ras signaling pathways and enhancement of Bim and p27 expression in human hematopoietic tumor cells. *Tumor Biology*, 39(10), 101042831773494. <https://doi.org/10.1177/1010428317734947>

Gabizon, A., Ohana, P., Amitay, Y., Gorin, J., Tzemach, D., Mak, L., & Shmeeda, H. (2021). Liposome co-encapsulation of anti-cancer agents for pharmacological optimization of nanomedicine-based combination chemotherapy. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.87>

Gadaleta, E., Thorn, G. J., Ross-Adams, H., Jones, L. J., & Chelala, C. (2022). Field cancerization in breast cancer. *The Journal of Pathology*, 257(4), 561–574. <https://doi.org/10.1002/path.5902>

Galarza, S., Kim, H., Atay, N., Peyton, S. R., & Munson, J. M. (2020). 2D or 3D? How cell motility measurements are conserved across dimensions in vitro and translate in vivo. *Bioengineering and Translational Medicine*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/btm2.10148>

Gomes, E. R. et al. (2022). Fusion of Tumor-Derived Exosomes with Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Loaded with Doxorubicin for the Treatment of Breast Cancer. *AAPS PharmSciTech*, 1–11. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02349-y>

Granadillo Rodríguez, M., Flath, B., & Chelico, L. (2020). The interesting relationship between APOBEC3 deoxycytidine deaminases and cancer: a long road ahead. *Open Biology*, 10(12), 200188. <https://doi.org/10.1098/rsob.200188>

H. Alkhatib, M., M. Alkreathy, H., I. Al Omar, M., S. Balamash, K., Abdu 4, F., & Esmat, A. (2021). Doxorubicin supplemented with pravastatin in lipid

nanoemulsion induces antineoplastic activity with limited hepatotoxicity and cardiotoxicity in tumor-bearing mice. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 13(1), 17–29. <https://doi.org/10.18311/ajprhc/2021/26066>

Hamel, S., McNair, D. S., Birkett, N. J., Mattison, D. R., Krantis, A., & Krewski, D. (2015). Off-label use of cancer therapies in women diagnosed with breast cancer in the United States. *SpringerPlus*, 4(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0981-z>

Hande, K. R. (2008). Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 3(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.uct.2008.02.001>

Harasym, T. O., Liboiron, B. D., & Mayer, L. D. (2010). *Chapter 13 Drug Ratio-Dependent Antagonism: A New Category Circumvention* (Issue June 2014). <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6>

Harasym, T. O., Tardi, P. G., Harasym, N. L., Harvie, P., Johnstone, S. A., & Mayer, L. D. (2006). Increased Preclinical Efficacy of Irinotecan and Floxuridine Coencapsulated Inside Liposomes Is Associated With Tumor Delivery of Synergistic Drug Ratios. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 16(8), 361–374. <https://doi.org/10.3727/000000006783980937>

Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

Heinrich, A.-K., Lucas, H., Schindler, L., Chytil, P., Etrych, T., Mäder, K., & Mueller, T. (2016). Improved Tumor-Specific Drug Accumulation by Polymer Therapeutics with pH-Sensitive Drug Release Overcomes Chemotherapy Resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 998–1007. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0824>

Helfrich, W. (1973). Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 28(11–12), 693–703. <https://doi.org/10.1515/znc-1973-11-1209>

Henninger, C., & Fritz, G. (2017). Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. *Cell Death and Disease*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.418>

Henninger, C., & Fritz, G. (2018). Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. *Cell Death & Disease*, 8(1), e2564–e2564. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.418>

Hua, S. (2014). Comparison of in vitro dialysis release methods of loperamide-encapsulated liposomal gel for topical drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 735. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55805>

Huelsenbeck, J., Henninger, C., Schad, A., Lackner, K. J., Kaina, B., & Fritz, G. (2011). Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death & Disease*, 2(8), e190–e190. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.65>

Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107–124. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>

Iannelli, F., Roca, M. S., Ciardiello, C., Rienzo, S. De, Lombardi, R., Sorice, A., Costantini, S., Moccia, T., Milone, M. R., Pucci, B., Budillon, A., & Bruzzese, F. (2018). *Abstract 2877: Synergistic antitumor interaction of valproic acid and simvastatin sensitizes prostate cancer to docetaxel by targeting cancer stem cells compartment via YAP-pathway modulation.* 7, 2877–2877. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2018-2877>

IARC. (n.d.). *WHO*. <https://www.iarc.who.int/>

INCA. (n.d.). <https://www.gov.br/inca/pt-br>

Jacevic, V., Djordjevic, A., Srdjenovic, B., Milic-Tores, V., Segrt, Z., Dragojevic-Simic, V., & Kuca, K. (2017). Fullerenol nanoparticles prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 102(2), 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.03.005>

Jawad, B., Poudel, L., Podgornik, R., Steinmetz, N. F., & Ching, W.-Y. (2019). Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(7), 3877–3893. <https://doi.org/10.1039/C8CP06776G>

Jiang, W., Hu, J.-W., He, X.-R., Jin, W.-L., & He, X.-Y. (2021a). Statins: a repurposed drug to fight cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 241. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02041-2>

Jiang, W., Hu, J. W., He, X. R., Jin, W. L., & He, X. Y. (2021b). Statins: a repurposed drug to fight cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02041-2>

Johnson-Arbor, K., & Dubey, R. (2022). Doxorubicin. In *StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083582>

Kanamala, M., Wilson, W. R., Yang, M., Palmer, B. D., & Wu, Z. (2016). Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review. *Biomaterials*, 85, 152–167. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.061>

Kang, M., Lee, K. H., Lee, H. S., Jeong, C. W., Ku, J. H., Kim, H. H., & Kwak, C. (2017). Concurrent treatment with simvastatin and NF- $\kappa$ B inhibitor in human castration-resistant prostate cancer cells exerts synergistic anticancer effects via control of the NF- $\kappa$ B/LIN28/let-7 miRNA signaling pathway. *PLoS ONE*, 12(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184644>

Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nature04870>

Kawiak, A. (2022). Molecular Research and Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9617. <https://doi.org/10.3390/ijms23179617>

Kim, H. -S., Lee, S. H., Kim, H., Lee, S. -H., Cho, J. H., Lee, H., Yim, H. W., Kim, S. -H., Choi, I. -Y., Yoon, K. -H., & Kim, J. H. (2016). Statin-related



aminotransferase elevation according to baseline aminotransferases level in real practice in Korea. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 41(3), 266–272. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12377>

Kim, Y.-H., Park, S.-M., Kim, M., Kim, S. H., Lim, S.-Y., Ahn, J.-C., Song, W.-H., & Shim, W.-J. (2012). Cardioprotective effects of rosuvastatin and carvedilol on delayed cardiotoxicity of doxorubicin in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(6), 488–498. <https://doi.org/10.3109/15376516.2012.678406>

King, R. J., Singh, P. K., & Mehla, K. (2022). The cholesterol pathway: impact on immunity and cancer. *Trends in Immunology*, 43(1), 78–92. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.11.007>

Koren, E., Apte, A., Jani, A., & Torchilin, V. P. (2012). Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *Journal of Controlled Release*, 160(2), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.002>

Lasic, D. D., Frederik, P. M., Stuart, M. C. A., Barenholz, Y., & McIntosh, T. J. (1992). Gelation of liposome interior A novel method for drug encapsulation. *FEBS Letters*, 312(2–3), 255–258. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80947-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80947-F)

Lee, M. K. (2020). Liposomes for enhanced bioavailability of water-insoluble drugs: In vivo evidence and recent approaches. *Pharmaceutics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030264>

Li, N., Xie, X., Hu, Y., He, H., Fu, X., Fang, T., & Li, C. (2019). Herceptin-conjugated liposomes co-loaded with doxorubicin and simvastatin in targeted prostate cancer therapy. *American Journal of Translational Research*, 11(3), 1255–1269.

Li, Yanyan, Zhai, Y., Liu, W., Zhang, K., Liu, J., Shi, J., & Zhang, Z. (2019). Ultrasmall nanostructured drug based pH-sensitive liposome for effective treatment of drug-resistant tumor. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0550-7>

Li, Yinghuan, Wang, J., Gao, Y., Zhu, J., Wientjes, M. G., & Au, J. L.-S. (2011). Relationships between Liposome Properties, Cell Membrane Binding, Intracellular Processing, and Intracellular Bioavailability. *The AAPS Journal*, *13*(4), 585–597. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9298-1>

Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, *2*(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>

Lima, Z. S., Ghadamzadeh, M., Arashloo, F. T., Amjad, G., Ebadi, M. R., & Younesi, L. (2019). Recent advances of therapeutic targets based on the molecular signature in breast cancer: genetic mutations and implications for current treatment paradigms. *Journal of Hematology & Oncology*, *12*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0725-6>

Liu, B., Yi, Z., Guan, X., Zeng, Y.-X., & Ma, F. (2017a). The relationship between statins and breast cancer prognosis varies by statin type and exposure time: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, *164*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4246-0>

Liu, B., Yi, Z., Guan, X., Zeng, Y. X., & Ma, F. (2017b). The relationship between statins and breast cancer prognosis varies by statin type and exposure time: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, *164*(1). <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4246-0>

Liu, C. L., Chen, M. J., Lin, J. C., Lin, C. H., Huang, W. C., Cheng, S. P., Chen, S. N., & Chang, Y. C. (2019). Doxorubicin promotes migration and invasion of breast cancer cells through the upregulation of the RHOA/MLC pathway. *Journal of Breast Cancer*, *22*(2), 185–195. <https://doi.org/10.4048/jbc.2019.22.e22>

Liu, Y.-L., Chou, C.-K., Kim, M., Vasisht, R., Kuo, Y.-A., Ang, P., Liu, C., Perillo, E. P., Chen, Y.-A., Blocher, K., Horng, H., Chen, Y.-I., Nguyen, D. T., Yankeelov, T. E., Hung, M.-C., Dunn, A. K., & Yeh, H.-C. (2019). Assessing metastatic potential of breast cancer cells based on EGFR dynamics. *Scientific Reports*, *9*(1), 3395. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37625-0>

Liu, Y., Fang, J., Kim, Y.-J., Wong, M. K., & Wang, P. (2014). Codelivery of Doxorubicin and Paclitaxel by Cross-Linked Multilamellar Liposome Enables Synergistic Antitumor Activity. *Molecular Pharmaceutics*, *11*(5), 1651–1661. <https://doi.org/10.1021/mp5000373>

Luput, L., Licarete, E., Drotar, D. M., Nagy, A.-L., Sesarman, A., Patras, L., Rauca, V. F., Porfire, A., Muntean, D., Achim, M., Tomuta, I., Vlase, L., Catoi, C., Dragos, N., & Banciu, M. (2018a). In Vivo Double Targeting of C26 Colon Carcinoma Cells and Microenvironmental Protumor Processes Using Liposomal Simvastatin. *Journal of Cancer*, *9*(2), 440–449. <https://doi.org/10.7150/jca.21560>

Luput, L., Licarete, E., Drotar, D. M., Nagy, A. L., Sesarman, A., Patras, L., Rauca, V. F., Porfire, A., Muntean, D., Achim, M., Tomuta, I., Vlase, L., Catoi, C., Dragos, N., & Banciu, M. (2018b). In vivo double targeting of C26 colon carcinoma cells and microenvironmental protumor processes using liposomal simvastatin. *Journal of Cancer*, *9*(2), 440–449. <https://doi.org/10.7150/jca.21560>

Machado, K. L., Marinello, P. C., Silva, T. N. X., Silva, C. F. N., Luiz, R. C., Cecchini, R., & Cecchini, A. L. (2020). Oxidative Stress in Caffeine Action on the Proliferation and Death of Human Breast Cancer Cells MCF-7 and MDA-MB-231. *Nutrition and Cancer*, *0*(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1795693>

Malyutina, A., Majumder, M. M., Wang, W., Pessia, A., Heckman, C. A., & Tang, J. (2019). Drug combination sensitivity scoring facilitates the discovery of synergistic and efficacious drug combinations in cancer. *PLoS Computational Biology*, *15*(5), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006752>

Mandal, C. C., Ghosh-Choudhury, N., Yoneda, T., Choudhury, G. G., & Ghosh-Choudhury, N. (2011). Simvastatin prevents skeletal metastasis of breast cancer by an antagonistic interplay between p53 and CD44. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(13), 11314–11327. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193714>

Mangelinck, A., Habel, N., Mohr, A., Gaspar, N., Stefanovska, B., & Fromigué, O. (2021). Synergistic Anti-Tumor Effect of Simvastatin Combined to Chemotherapy

in Osteosarcoma. *Cancers*, 13(22), 5869.  
<https://doi.org/10.3390/cancers13225869>

Matsumura, K., Nakata, S., Taniguchi, K., Ii, H., Ashihara, E., Kageyama, S., Kawachi, A., & Yoshiki, T. (2016). Depletion of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase inhibits breast cancer cell growth via cellular senescence induction mediated by CDK inhibitor upregulation. *BMC Cancer*, 16(1), 748.  
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2779-y>

Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46(12 Pt 1), 6387–6392. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946403>

Matuszewicz, L., Filip-Psurska, B., Psurski, M., Tabaczar, S., Podkalicka, J., Wietrzyk, J., Ziolkowski, P., Czogalla, A., & Sikorski, A. F. (2019). EGFR-targeted immunoliposomes as a selective delivery system of simvastatin, with potential use in treatment of triple-negative breast cancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 569(April), 118605.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118605>

Matuszewicz, L., Podkalicka, J., & Sikorski, A. F. (2018). Immunoliposomes with simvastatin as a potential therapeutic in treatment of breast cancer cells overexpressing her2—an in vitro study. *Cancers*, 10(11).  
<https://doi.org/10.3390/cancers10110418>

Mayer, L. D., Harasym, T. O., Tardi, P. G., Harasym, N. L., Shew, C. R., Johnstone, S. A., Ramsay, E. C., Bally, M. B., & Janoff, A. S. (2006). Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: Controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(7), 1854–1863. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0118>

Meister, A., & Blume, A. (2017). (Cryo)Transmission Electron Microscopy of Phospholipid Model Membranes Interacting with Amphiphilic and Polyphilic

Molecules. *Polymers*, 9(12), 521. <https://doi.org/10.3390/polym9100521>

Mengual, D., Medrano, L. E., Villamizar-Villamizar, W., Osorio-Llanes, E., Mendoza-Torres, E., & Bolívar, S. (2022). Novel Effects of Statins on Cancer via Autophagy. *Pharmaceuticals*, 15(6), 648. <https://doi.org/10.3390/ph15060648>

Milanovic, M., Fan, D. N. Y., Belenki, D., Däbritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I. A., Mendoza-Parra, M. A., Kanashova, T., Metzner, M., Pardon, K., Reimann, M., Trumpp, A., Dörken, B., Zuber, J., Gronemeyer, H., ... Schmitt, C. A. (2018). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*, 553(7686), 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>

Miskey, C., Botezatu, L., Temiz, N. A., Gogol-Döring, A., Bartha, Á., Györffy, B., Largaespada, D. A., Ivics, Z., & Sebe, A. (2022). In Vitro Insertional Mutagenesis Screen Identifies Novel Genes Driving Breast Cancer Metastasis. *Molecular Cancer Research*, 20(10), 1502–1515. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0772>

Mohammadkhani, N., Gharbi, S., Fatima, H., Farzaneh, A., Mahjoob, G., Hoseinsalari, A., & Korsching, E. (2019). Statins: Complex outcomes but increasingly helpful treatment options for patients. *European Journal of Pharmacology*, 863(July), 172704. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172704>

Mondal, L., Mukherjee, B., Das, K., Bhattacharya, S., Dutta, D., Chakraborty, S., Pal, M. M., Gaonkar, R. H., & Debnath, M. C. (2019). CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume along with drug-related cardiotoxicity in mice. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 8073–8094. <https://doi.org/10.2147/IJN.S220740>

Morales-Valencia, J., & David, G. (2021). The Contribution of Physiological and

Accelerated Aging to Cancer Progression Through Senescence-Induced Inflammation. *Frontiers in Oncology*, 11(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.747822>

Muller, K., Jorns, J. M., & Tozbikian, G. (2022). What's new in breast pathology 2022: WHO 5th edition and biomarker updates. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 56(3), 170–171. <https://doi.org/10.4132/jptm.2022.04.25>

Mura, P., Maestrelli, F., Cirri, M., Nerli, G., Di Cesare Mannelli, L., Ghelardini, C., & Mennini, N. (2021). Improvement of butamben anesthetic efficacy by the development of deformable liposomes bearing the drug as cyclodextrin complex. *Pharmaceutics*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060872>

Murtola, T. J., Syvälä, H., Pennanen, P., Bläuer, M., Solakivi, T., Ylikomi, T., & Tammela, T. L. J. (2012). The Importance of LDL and Cholesterol Metabolism for Prostate Epithelial Cell Growth. *PLoS ONE*, 7(6), e39445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039445>

Murtola, T. J., Visvanathan, K., Artama, M., Vainio, H., & Pukkala, E. (2014). Statin Use and Breast Cancer Survival: A Nationwide Cohort Study from Finland. *PLoS ONE*, 9(10), e110231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110231>

Nagarajan, D., & McArdle, S. (2018). Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010020>

Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(September), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886>

Negrea, G., Rauca, V.-F., Meszaros, M. S., Patras, L., Luput, L., Licarete, E., Toma, V.-A., Porfire, A., Muntean, D., Sesarman, A., & Banciu, M. (2022). Active Tumor-Targeting Nano-formulations Containing Simvastatin and Doxorubicin Inhibit Melanoma Growth and Angiogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 870347. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.870347>

- Nikanjam, M., Capparelli, E. V., Lancet, J. E., Louie, A., & Schiller, G. (2018). Persistent cytarabine and daunorubicin exposure after administration of novel liposomal formulation CPX-351: population pharmacokinetic assessment. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 81(1), 171–178. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3484-5>
- O'Bryan, J. P. (2010). INTERSECTING Pathways in Cell Biology. *Science Signaling*, 3(152). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3152re10>
- O'Grady, S., Crown, J., & Duffy, M. J. (2022). Statins inhibit proliferation and induce apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Medical Oncology*, 39(10), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01733-9>
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(6), 1213–1225. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>
- Olusanya, T., Haj Ahmad, R., Ibegbu, D., Smith, J., & Elkordy, A. (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules*, 23(4), 907. <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>
- Paliwal, S. R., Paliwal, R., Pal, H. C., Saxena, A. K., Sharma, P. R., Gupta, P. N., Agrawal, G. P., & Vyas, S. P. (2012). Estrogen-anchored pH-sensitive liposomes as nanomodule designed for site-specific delivery of doxorubicin in breast cancer therapy. *Molecular Pharmaceutics*, 9(1), 176–186. <https://doi.org/10.1021/mp200439z>
- Pandey, H., Rani, R., & Agarwal, V. (2016). Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>
- Park, B. J., Whichard, Z. L., & Corey, S. J. (2012). Dasatinib synergizes with both cytotoxic and signal transduction inhibitors in heterogeneous breast cancer cell lines – Lessons for design of combination targeted therapy. *Cancer Letters*, 320(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.039>

Pentak, D., Ploch-Jankowska, A., Zięba, A., & Kozik, V. (2022). The Advances and Challenges of Liposome-Assisted Drug Release in the Presence of Serum Albumin Molecules: The Influence of Surrounding pH. *Materials*, *15*(4), 1586. <https://doi.org/10.3390/ma15041586>

Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, *4*(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)

Prasanna, P. G., Citrin, D. E., Hildesheim, J., Ahmed, M. M., Venkatachalam, S., Riscuta, G., Xi, D., Zheng, G., Deursen, J. van, Goronzy, J., Kron, S. J., Anscher, M. S., Sharpless, N. E., Campisi, J., Brown, S. L., Niedernhofer, L. J., O’loghlen, A., Georgakilas, A. G., Paris, F., ... Coleman, C. N. (2021). Therapy-Induced Senescence: Opportunities to Improve Anticancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, *113*(10), 1285–1298. <https://doi.org/10.1093/jnci/djab064>

Prokopowicz, M. (2015). Formulation, characterisation and in vitro studies of doxorubicin-loaded silica–polydimethylsiloxane granules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *66*, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.016>

RAJANGAM, J., KRISHNAN S, N., N PALEI, N., BHATT, S., DAS, M. K., DAS, S., & MATHUSOOTHANAN, K. (2022). Ameliorative Potential of Rosuvastatin on Doxorubicin-induced Cardiotoxicity by Modulating Oxidative Damage in Rats. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, *19*(1), 28–34. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.70745>

Rakha, E., Toss, M., & Quinn, C. (2022). Specific cell differentiation in breast cancer: a basis for histological classification. *Journal of Clinical Pathology*, *75*(2), 76–84. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207487>

Rauca, V.-F., Patras, L., Luput, L., Licarete, E., Toma, V.-A., Porfire, A., Mot, A. C., Rakosy-Tican, E., Sesarman, A., & Banciu, M. (2021). Remodeling tumor microenvironment by liposomal codelivery of DMXAA and simvastatin inhibits



malignant melanoma progression. *Scientific Reports*, 11(1), 22102. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01284-5>

Rezano, A., Ridhayanti, F., Rangkuti, A. R., Gunawan, T., Winarno, G. N. A., & Wijaya, I. (2021). Cytotoxicity of Simvastatin in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(Supplement 1), 33–42. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.S1.33>

Riad, A., Bien, S., Westermann, D., Becher, P. M., Loya, K., Landmesser, U., Kroemer, H. K., Schultheiss, H. P., & Tschöpe, C. (2009). Pretreatment with Statin Attenuates the Cardiotoxicity of Doxorubicin in Mice. *Cancer Research*, 69(2), 695–699. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3076>

Roque, M. C., Franco, M. S., Vilela, J. M. C., Andrade, M. S., de Barros, A. L. B., Leite, E. A., & Oliveira, M. C. (2019). Development of Long-Circulating and Fusogenic Liposomes Co-encapsulating Paclitaxel and Doxorubicin in Synergistic Ratio for the Treatment of Breast Cancer. *Current Drug Delivery*, 16(9), 829–838. <https://doi.org/10.2174/1567201816666191016112717>

S Ramadan, W., Saleh, E. M., Menon, V., Vazhappilly, C. G., Abdu-Allah, H. H. M., El-Shorbagi, A.-N. A., Mansour, W., & El-Awady, R. (2020). Induction of DNA damage, apoptosis and cell cycle perturbation mediate cytotoxic activity of new 5-aminosalicylate–4-thiazolinone hybrid derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110571. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110571>

Sadeghi-Aliabadi, H., Minaiyan, M., & Dabestan, A. (2010). Cytotoxic evaluation of doxorubicin in combination with simvastatin against human cancer cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 127–133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22049271>

Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(1), 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.002>

Salvioni, L., Rizzuto, M. A., Bertolini, J. A., Pandolfi, L., Colombo, M., & Prosperi, D. (2019). Thirty Years of Cancer Nanomedicine: Success, Frustration, and Hope. *Cancers*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/cancers11121855>

Schrörs, B., Boegel, S., Albrecht, C., Bukur, T., Bukur, V., Holtsträter, C., Ritzel, C., Manninen, K., Tadmor, A. D., Vormehr, M., Sahin, U., & Löwer, M. (2020). Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in Oncology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01195>

Seicean, S., Seicean, A., Plana, J. C., Budd, G. T., & Marwick, T. H. (2012). Effect of Statin Therapy on the Risk for Incident Heart Failure in Patients With Breast Cancer Receiving Anthracycline Chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology*, *60*(23), 2384–2390. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.07.067>

Silva, J. O., Fernandes, R. S., Lopes, S. C. A., Cardoso, V. N., Leite, E. A., Cassali, G. D., Marzola, M. C., Rubello, D., Oliveira, M. C., & de Barros, A. L. B. (2016). pH-Sensitive, Long-Circulating Liposomes as an Alternative Tool to Deliver Doxorubicin into Tumors: a Feasibility Animal Study. *Molecular Imaging and Biology*, *18*(6), 898–904. <https://doi.org/10.1007/s11307-016-0964-7>

Simões, S. (2004). On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *56*(7), 947–965. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.038>

Sindhwani, S., Syed, A. M., Ngai, J., Kingston, B. R., Maiorino, L., Rothschild, J., MacMillan, P., Zhang, Y., Rajesh, N. U., Hoang, T., Wu, J. L. Y., Wilhelm, S., Zilman, A., Gadde, S., Sulaiman, A., Ouyang, B., Lin, Z., Wang, L., Egeblad, M., & Chan, W. C. W. (2020). The entry of nanoparticles into solid tumours. *Nature Materials*, *19*(5), 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>

Soundararajan, A., Bao, A., Phillips, W. T., McManus, L. M., & Goins, B. A. (2011). Chemoradionuclide Therapy with <sup>186</sup>Re-Labeled Liposomal Doxorubicin: Toxicity, Dosimetry, and Therapeutic Response. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, *26*(5), 603–614. <https://doi.org/10.1089/cbr.2010.0948>

Suarez-Arnedo, A., Figueroa, F. T., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE*, *15*(7 July), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Syahputra, R. A., Harahap, U., Dalimunthe, A., Pandapotan, M., & Satria, D. (2021). Protective effect of *Vernonia amygdalina* Delile against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Heliyon*, 7(7), e07434. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07434>

Tagde, P., Najda, A., Nagpal, K., Kulkarni, G. T., Shah, M., Ullah, O., Balant, S., & Rahman, M. H. (2022). Nanomedicine-Based Delivery Strategies for Breast Cancer Treatment and Management. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2856. <https://doi.org/10.3390/ijms23052856>

Tan, Q.-W., Luo, T., Zheng, H., Tian, T.-L., He, P., Chen, J., Zeng, H.-L., & Lv, Q. (2017). Weekly taxane–anthracycline combination regimen versus tri-weekly anthracycline-based regimen for the treatment of locally advanced breast cancer: a randomized controlled trial. *Chinese Journal of Cancer*, 36(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0196-5>

Tayyari, F., Gowda, G. A. N., Olopade, O. F., Berg, R., Yang, H. H., Lee, M. P., Ngwa, W. F., Mittal, S. K., Raftery, D., & Mohammed, S. I. (2018). Metabolic profiles of triple-negative and luminal A breast cancer subtypes in African-American identify key metabolic differences. *Oncotarget*, 9(14), 11677–11690. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24433>

Tefas, L. R., Barbălată, C., Tefas, C., & Tomuță, I. (2021). Salinomycin-Based Drug Delivery Systems: Overcoming the Hurdles in Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 13(8), 1120. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081120>

Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440–446. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>

Torchilin, V. P. (2010). *Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to*

- Tumors as an Example* (pp. 3–53). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_1)
- Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast Cancer Treatment. *American Family Physician*, *104*(2), 171–178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34383430>
- Vakil, V., & Trappe, W. (2019). Drug Combinations: Mathematical Modeling and Networking Methods. *Pharmaceutics*, *11*(5), 208. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11050208>
- Vejpongsa, P., & Yeh, E. T. H. (2014). Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Journal of the American College of Cardiology*, *64*(9), 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1167>
- Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., & Viale, G. (2005). Breast cancer. *The Lancet*, *365*(9472), 1727–1741. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66546-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66546-4)
- Wang, F., Liu, W., Ning, J., Wang, J., Lang, Y., Jin, X., Zhu, K., Wang, X., Li, X., Yang, F., Ma, J., & Xu, S. (2018). Simvastatin suppresses proliferation and migration in non-small cell lung cancer via pyroptosis. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(4), 406–417. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23542>
- Wang, G., Cao, R., Wang, Y., Qian, G., Dan, H. C., Jiang, W., Ju, L., Wu, M., Xiao, Y., & Wang, X. (2016). Simvastatin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of bladder cancer cells via PPAR $\gamma$  signalling pathway. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep35783>
- Wang, H., & Huang, Y. (2020). Combination therapy based on nano codelivery for overcoming cancer drug resistance. *Medicine in Drug Discovery*, *6*, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2020.100024>
- Wang, T., Seah, S., Loh, X., Chan, C. W., Hartman, M., Goh, B. C., & Lee, S. C. (2016). Simvastatin-induced breast cancer cell death and deactivation of PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling are reversed by metabolic products of the mevalonate pathway. *Oncotarget*, *7*(3), 2532–2544. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6304>

Wei, P., & Moodera, J. S. (2020). One compound with two distinct topological states. *Nature Materials*, *19*(5), 481–482. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-0628-5>

Wilkinson, L., & Gathani, T. (2022). Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, *95*(1130). <https://doi.org/10.1259/bjr.20211033>

Wu, H., Jiang, H., Lu, D., Xiong, Y., Qu, C., Zhou, D., Mahmood, A., & Chopp, M. (2009). Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. *Neurosurgery*, *65*(6), 1087–1097. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000360130.52812.1D>

Xia, G., An, Z., Wang, Y., Zhao, C., Li, M., Li, Z., & Ma, J. (2013). Synthesis of a Novel Polymeric Material Folate-Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-Distearoyl Phosphatidyl Ethanolamine Tri-Block Polymer for Dual Receptor and pH-Sensitive Targeting Liposome. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *61*(4), 390–398. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00951>

Xie, L., Zhu, G., Shang, J., Chen, X., Zhang, C., Ji, X., Zhang, Q., & Wei, Y. (2021). An overview on the biological activity and anti-cancer mechanism of lovastatin. *Cellular Signalling*, *87*(August), 110122. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110122>

Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1845*(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>

Yeh, M.-K., Hsin-I Chang, & Ming-Yen Cheng. (2011). Clinical development of liposome based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, *49*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26766>

Yousefnia, S., Ghaedi, K., Seyed Forootan, F., & Nasr Esfahani, M. H. (2019). Characterization of the stemness potency of mammospheres isolated from the breast cancer cell lines. *Tumor Biology*, *41*(8), 1–14. <https://doi.org/10.1177/1010428319869101>

Yunita, E., Muflikhasari, H. A., Ilmawati, G. P. N., Meiyanto, E., & Hermawan, A. (2020). Hesperetin alleviates doxorubicin-induced migration in 4T1 breast cancer cells. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00036-y>

Zaheed, M., Wilcken, N., Willson, M. L., O'Connell, D. L., & Goodwin, A. (2019). Sequencing of anthracyclines and taxanes in neoadjuvant and adjuvant therapy for early breast cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2019(2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012873.pub2>

Zhang, R. X., Wong, H. L., Xue, H. Y., Eoh, J. Y., & Wu, X. Y. (2016). Nanomedicine of synergistic drug combinations for cancer therapy – Strategies and perspectives. *Journal of Controlled Release*, 240, 489–503. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.012>

Zhao, X.-Q., Morse, J. S., Dowdy, A. A., Heise, N., DeAngelis, D., Frohlich, J., Chait, A., Albers, J. J., & Brown, B. G. (2004). Safety and tolerability of simvastatin plus niacin in patients with coronary artery disease and low high-density lipoprotein cholesterol (The HDL Atherosclerosis Treatment Study). *The American Journal of Cardiology*, 93(3), 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.10.009>

Zhao, Y., Ren, W., Zhong, T., Zhang, S., Huang, D., Guo, Y., Yao, X., Wang, C., Zhang, W.-Q., Zhang, X., & Zhang, Q. (2016). Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity. *Journal of Controlled Release*, 222, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.006>

Zhou, Q., & Liao, J. (2009). Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy. *Current Pharmaceutical Design*, 15(5), 467–478. <https://doi.org/10.2174/138161209787315684>

Zununi Vahed, S., Salehi, R., Davaran, S., & Sharifi, S. (2017). Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1327–1341. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.073>

