

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

SHIRLEIDE SANTOS NUNES

PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS FOLATADOS pH-SENSÍVEIS
CONTENDO IRINOTECANO E/OU 5-FLUOROURACIL EM MODELO
MURINO DE CÂNCER COLORRETAL

BELO HORIZONTE
2022

SHIRLEIDE SANTOS NUNES

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS FOLATADOS pH-SENSÍVEIS
CONTENDO IRINOTECANO E/OU 5-FLUOROURACIL EM MODELO
MURINO DE CÂNCER COLORRETAL**

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.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Branco de Barros

Co-orientadora: Prof. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

**BELO HORIZONTE
2022**

N972p	Nunes, Shirleide Santos. Preparo, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de lipossomas folatados pH-sensíveis contendo irinotecano e/ou 5-fluorouracil em modelo murinho de câncer colorretal [recurso eletrônico] / Shirleide Santos Nunes. – 2022. 1 recurso eletrônico (122 f. : il.) : pdf Orientador: André Luís Branco de Barros. Coorientadora: Mônica Cristina de Oliveira. 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. Fluorouracil – Teses. 2. Reto – Câncer – Teses. 3. Lipossomos – Teses. 4. Cólon – Câncer – Teses. I. Barros, André Luís Branco de. II. Oliveira, Mônica Cristina de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título. CDD: 616.994
-------	--



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

“PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS FOLATADOS pH-SENSÍVEIS CONTENDO IRINOTECANO E/OU 5-FLUOROURACIL EM MODELO MURINO DE CÂNCER COLORRETAL”

SHIRLEIDE SANTOS NUNES

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

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

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

Prof. Dr. Pedro Pires Goulart Guimarães
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

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

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

Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 04 de maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Silva Araújo, Usuário Externo**, em 04/05/2022, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Branco de Barros, Professor do Magistério**



Superior, em 04/05/2022, às 12:26, 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, Usuária Externa**, em 04/05/2022, às 12:31, 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 **Monica Cristina de Oliveira, Membro**, em 04/05/2022, às 15:14, 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 **Pedro Pires Goulart Guimaraes, Professor do Magistério Superior**, em 04/05/2022, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Antonio Miranda Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 05/05/2022, às 08:16, 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, informando o código verificador 1413287 e o código CRC F4E9E7D9.

AGRADECIMENTOS

Eu tenho tanto e a tantos agradecer, meu tempo era curto, mas obtive tanta ajuda, sem muitas vezes precisar pedir, e por tudo sou tão grata!

Aos meus pais, Maria e Xisto, pelo apoio, exemplo, por serem a razão de eu querer crescer e ser uma pessoa melhor. Pelas orações que sempre me fortaceleram.

Às minhas irmãs, Sheila, Shirlinha, Lana, pela paciência, pela companhia e por sempre estarem prontas para o que eu precisasse.

Ao meu cunhado, primos e toda a minha família pelo apoio e carinho.

Aos laços, por tornarem essa jornada mais leve e meus dias mais felizes. A todos os meus amigos pela torcida e carinho que sempre me ampararam.

Aos amigos da medicina nuclear, pela paciência, companheirismo, carinho e por segurarem as pontas sempre que precisei. Especialmente a Thania pela força, parceria.

Ao meu trio, Sued e Jana, que tornaram esse trabalho possível. Por me apoiarem nos meus momentos de desespero, mas também nos de alegria e gordices. Por caminharem comigo e, algumas vezes, por mim.

Às Andrezetes, Ju, Renata, Carol e Liziane pela amizade, cumplicidade, pela ajuda constante e por me inspirarem.

Aos amigos do laboratório de farmacotécnica pela ajuda, carinho e pelo incentivo

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À professora Mônica, agradeço a orientação, o acolhimento, a confiança, os ensinamentos, a dedicação e por ser um exemplo de profissional e de caráter.

E por fim, ao professor André Luís Branco de Barros, pela amizade, pelo apoio e incentivo, por torcer e contribuir para meu crescimento. Por estar onde e quando eu precisei. Pelo imenso aprendizado.

“Quem estará nas trincheiras ao teu lado?

- E isso importa?

- Mais do que a própria guerra!”

E. Hemingway

COLABORADORES

Prof. Rodrigo Maia de Pádua (Faculdade de Farmácia – UFMG)

Prof. Geovanni Dantas Cassali (Instituto de Ciências Biológicas – UFMG)

Dra. Juliana da Silva Oliveira (Faculdade de Farmácia – UFMG)

Dra. Renata Salgado Fernandes (Faculdade de Farmácia – UFMG)

Me. Sued Eustaquio Mendes Miranda (Faculdade de Farmácia – UFMG)

Ma. Janaína de Alcântara Lemos (Faculdade de Farmácia – UFMG)

RESUMO

Estimativas mundiais apontam o câncer colorretal como o terceiro tipo de tumor maligno mais comum representando cerca de 1,9 milhões de novos casos e uma a cada 10 mortes. A quimioterapia sistêmica tem evoluído do emprego de agentes citotóxicos básicos para combinação de diferentes quimioterápicos. Os fármacos mais usados para esse tipo de tumor são o 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatina e o irinotecano (IRN). Persiste, entretanto, elevada toxicidade aos diferentes regimes empregados o que torna os tratamentos convencionais pouco eficientes. Neste sentido, o emprego de novos agentes terapêuticos, como por exemplo os nanossistemas, principalmente lipossomas, para carrear estes fármacos constitui uma estratégia promissora para aperfeiçoar o tratamento do câncer colorretal. Lipossomas são vesículas lipídicas que, passivamente, acumulam-se na região do tumor. Além disso, modificações estruturais nesses sistemas podem aumentar a especificidade, liberação seletiva do fármaco na região do tumor, além da redução de efeitos tóxicos. Neste estudo, foi desenvolvido um novo sistema lipossomal sensível ao pH funcionalizado com folato encapsulando IRN e/ou 5-FU, para avaliação da atividade antitumoral em modelo de tumor colorretal murino (CT-26). No primeiro capítulo, avaliou-se as formulações lipossomais contendo IRN, que apresentaram tamanho reduzido (inferior a 200nm) e distribuição homogênea, com potencial zeta próximo à neutralidade. O estudo de liberação e pH-sensibilidade evidenciaram uma liberação mais lenta do fármaco encapsulado em relação ao IRN livre, e mais rápida em pH ácido em relação ao fisiológico. A formulação multifuncionalizada de SpHL-IRN-FOL demonstrou atividade antitumoral significativamente melhor que o IRN livre. O tratamento com SpHL-IRN-Fol resultou numa inibição do crescimento tumoral ainda mais extensa quando comparado com a formulação não folatada (57,8 e 41,5%, respectivamente), e não foram encontradas evidências de toxicidade. Esses dados suportam estudos pré-clínicos adicionais de SpHL-IRN-FOL como um sistema de liberação de drogas para o tratamento do câncer colorretal. No capítulo 2, avaliou-se a co-encapsulação de IRN e 5-FU. Foram preparadas vesículas homogêneas, monodispersas e com potencial zeta próximo a neutralidade, porém estudos posteriores para melhor caracterização dos lipossomas de 5-FU precisam ser conduzidos para melhorar a estabilidade de encapsulação. No entanto, os resultados preliminares com os SpHL-IRN-FOL combinado aos lipossomas de 5-FU se mostraram promissores para promover um aumento ainda mais significativo na atividade antitumoral desses fármacos no modelo de câncer colorretal empregado.

Palavras-chave: Lipossoma. 5-Fluorouracil. Irinotecano. Câncer colorretal. CT-26.

ABSTRACT

Worldwide estimates point out colorectal cancer as the third most common type of malignant tumor, representing about 1.9 million new cases and one in 10 deaths. Systemic chemotherapy has evolved from the use of basic cytotoxic agents to the combination of different chemotherapeutics. The most commonly used drugs for this type of tumor are 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin, and irinotecan (IRN). However, high toxicity has been observed in the different therapy regimens used, which makes conventional treatments inefficient. In this sense, the use of new therapeutic agents, such as nanosystems, mainly liposomes, to carry these drugs constitutes a promising strategy to improve the treatment of colorectal cancer. Liposomes are lipid vesicles that passively accumulate in the tumor region. In addition, structural changes in these systems can increase specificity, and selective release of the drug in the tumor region, in addition to reducing toxic effects. In this study, a new pH-sensitive liposomal system functionalized with folate encapsulating IRN and/or 5-FU was developed for the evaluation of antitumor activity in a murine colorectal tumor model (CT-26). In the first chapter, liposomal formulations containing IRN were evaluated, which showed reduced size (less than 200nm) and homogeneous distribution, with zeta potential close to neutrality. The release and pH-sensitivity study showed a slower release of the encapsulated drug in comparison to the free IRN, and faster in acidic than in physiological pH. The multifunctionalized formulation of SpHL-IRN-FOL demonstrated significantly better antitumor activity than free IRN. Treatment with SpHL-IRN-Fol resulted in even more extensive tumor growth inhibition when compared to the non-folated formulation (57.8 and 41.5%, respectively), and no evidence of toxicity was found. These data support additional preclinical studies of SpHL-IRN-FOL as a drug delivery system for the treatment of colorectal cancer. In chapter 2, the co-encapsulation of IRN and 5-FU was evaluated. Homogeneous, monodisperse vesicles with zeta potential close to neutrality were prepared, but further studies for better characterization of 5-FU liposomes need to be conducted to improve encapsulation stability. However, preliminary results with SpHL-IRN-FOL combined with 5-FU liposomes showed promise to promote an even more significant increase in the antitumor activity of these drugs in the colorectal cancer model used.

Keywords: Liposome. 5-Fluorouracil. Irinotecan. Colorectal cancer. CT-26.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Mecanismo de ação do 5-fluorouracil por incorporação de seu metabólito ao RNA e pela inibição da síntese de DNA.....	21
FIGURA 2	- Mecanismo de ação da camptotecina e derivados.....	23
FIGURA 3	- Representação esquemática do processo de formação de lipossomas: auto-organização de moléculas individuais de fosfolipídios (a) a folhetos de bicamada membranas (b), seguido da formação em lipossomas (c). A bicamada lipídica é composta por moléculas lipídicas individuais dispostas ordenadamente com as suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior da bicamada e com os seus grupos polares voltados para o meio aquoso e para o meio exterior ao lipossoma (d).....	26
FIGURA 4	- Representação esquemática do efeito da modificação de superfície de nanopartículas pela incorporação de PEG na adsorção de proteínas plasmáticas e na biodistribuição.....	30
FIGURA 5	- Estruturas químicas do CHEMS (A) e DOPE (B).....	33
FIGURA 6	- Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.....	33
FIGURA 7	- Estrutura molecular do DSPE-PEG2000-Folato.....	36
FIGURA 8	- Análise de rastreamento de nanopartículas de diâmetro médio (A) e distribuição de SpHL-IRN (B).....	49
FIGURA 9	- Liberação de IRN em relação ao pH.....	50
FIGURA 10	- IRN encapsulado em lipossomas é eficientemente absorvido em células de câncer de cólon. Imagens de microscopia confocal de células tumorais de câncer de cólon murino CT26 após 24 h de incubação com tratamentos A = IRN livre, B = SpHL-IRN ou C = SpHLIRN-Fol. (concentração de IRN 5µM). Amplificação de 63×.....	51
FIGURA 11	- Avaliação da atividade antitumoral de IRN livre e encapsulado. (A) Efeito antitumoral de SpHL (grupo controle), IRN, SpHL-irn e SpHL-IRN-FOL no crescimento de camundongos BALB/c fêmeas portadores de tumor de cólon CT26. Cada tratamento foi administrado por via intravenosa 3 vezes, a cada 2 dias, na dose de 30 mg/kg. (B) Volume tumoral no final dos experimentos, dia 8, após os tratamentos.....	52
FIGURA 12	- Avaliação da toxicidade no rim e no fígado. Parâmetros bioquímicos de camundongos controle e tratados com 3 doses de formulações de IRN foram avaliados quanto à	

	toxicidade renal (A e B), toxicidade hepática (C e D) e peso corporal (E).....	54
FIGURA 13	- Análise histopatológica da necrose tumoral. Cortes histológicos de tumor primário de camundongos BALB/c fêmea portadores de tumor colorretal CT26 tratados com IRN livre, SpHL-IRN ou SpHL-IRN-FOL corados por hematoxilina e eosina. (A) grupo controle na amplificação de 2x. (B) Tratado com IRN livre na amplificação de 2x. (C) SpHL-IRN tratado com amplificação de 2x. (D) SpHL-IRN-FOL tratado com amplificação de 2x. (E) grupo controle na amplificação de 20x. (F) Tratado com IRN livre na amplificação de 20x. (G) SpHL-IRN tratado com amplificação de 20x. (H) SpHL-IRN-FOL tratado com amplificação de 20x. Os asteriscos pretos indicam áreas de necrose tumoral.....	55
FIGURA 14	- Análise histopatológica da toxicidade hepática e intestinal. Cortes histológicos de tecidos de camundongos BALB/c fêmea portadores de tumor colorretal CT26 tratados com IRN livre, SpHL-IRN ou SpHL-IRN-FOL corados por hematoxilina e eosina. (A) fígado do grupo controle. (B) Fígado tratado com Fre-IRN. (C) Fígado tratado com SpHL-IRN. (D) Fígado tratado com SpHL-IRN-FOL. (E) grupo controle intestino grosso. (F) Intestino grosso tratado com IRN livre. (G) Intestino grosso tratado com SpHL-IRN. (H) Intestino grosso tratado com SpHL-IRN-FOL. (I) rim do grupo controle. (J) Rim tratado com IRN livre. (K) Rim tratado com SpHL-IRN. (L) Rim tratado com SpHL-IRN-FOL. Ampliação de 40x.....	56
FIGURA 15	- Curva de calibração para quantificação do 5-FU.....	69
FIGURA 16	- Distribuição do diâmetro (A) e quantificação das partículas (B) de SpHL-5-FU-FOL por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).....	70
FIGURA 17	- Curva de calibração para quantificação do IRN.....	72
FIGURA 18	- Avaliação do perfil de liberação do 5-FU encapsulado em lipossomas empregando-se diferentes diluições da formulação em tampão HEPES-salina pH 7,4.....	74
FIGURA 19	- Avaliação do perfil de liberação do 5-FU encapsulado em lipossomas de DPPC em tampão HEPES-salina pH 7,4.....	76
FIGURA 20	- Avaliação do perfil de Liberação do IRN encapsulado isoladamente e em combinação com o 5-FU em tampão HEPES-salina pH 7,4.....	77

FIGURA 21 - Avaliação do volume tumoral em modelo murino de câncer colorretal tratado com injeção intravenosa de Salina (grupo controle); IRN Livre; SpHL-IRN-FOL e SpHL-IRN-FOL + SpHL-5-FU-Fol).....	78
--	----

FIGURA 22 - Avaliação do peso corporal dos animais após administração intravenosa de Salina (grupo controle); IRN Livre); (SpHL-IRN-FOL) SpHL-IRN-FOL + SpHL-5-FU-Fol).....	79
---	----

LISTA DE TABELAS

1	- Caracterização físico-química de SpHL, SpHL-Fol, SpHL-IRN e SpHLIRN-Fol.....	49
2	- Volume tumoral relativo (RTV) e razão de inibição do crescimento tumoral (IR) após administração de IRN livre, SpHL-IRN e SpHL-IRN-FOL.....	52
3	- Parâmetros hematológicos de camundongos controle tratados com 4 doses de formulações de IRN.....	53
4	- Caracterização química e físico-química de SpHL e do SpHL-5-FU em diferentes concentrações do fármaco.....	70
5	- Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação do IRN.....	72
6	- Caracterização físico-química do SpHL-5-FU/IRN e porcentagem de encapsulação.....	73
7	- Diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação do 5-FU...	75

LISTA DE QUADROS

- | | | | |
|---|---|--|----|
| 1 | - | Formulações aprovadas para uso clínico para o tratamento do câncer colorretal. | 28 |
|---|---|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-FU	- 5-Fluorouracil
5-FU-DP	- Difosfato de 5-fluoruridina
5-Fd-UMP	- 5-fluoro-2'desoxiuridina-5-monofosfato
5-FU-MP	- Monofosfato de 5-fluorouracila-ribose
5-FU-TP	- Trifosfato de 5-fluoruridina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CHEMS	- Hemissuccinato de Colesterila
CCR	- Câncer colorretal
DPD	- Desidrogenase de dihidropirimidina
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
DOPE	- Dioleilfosfatidiletanolamina
DOX	- Doxorrubicina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	- Distearoilfosfatidiletanolamina acoplada a Polietilenoglicol 2000
DTPA	- Ácido Dietilenotriamino-pentacético
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Fol	- Folato
HER-2	- Receptor de Fator de Crescimento Epidermal Humano do Tipo 2
IRN	- Irinotecano
MLV	- <i>Multilamellar Vesicles</i>
PARP	- Poli (adenosina difosfato-ribose) Polimerase
PE	- Fosfatidiletanolamina
PEG	- Polietilenoglicol
pH	- Potencial Hidrogeniônico
RE	- Receptor de Estrógeno
RF	- Receptor de Folato
RNA	- Ácido ribonucleico
RP	- Receptor de Progesterona
SFM	- Sistema Fagocitário Mononuclear

SN-38	- 7-ethyl-10-hidroxicamptotecina
SpHL	- Lipossomas pH-sensíveis
Tc	- Temperatura de transição de fase
TS	- Timidilato sintetase
ULV	- <i>Unillamellar Vesicles</i>
UPRTase	- Monofosfato de uridina pirofosforilase
VEGF	- Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Câncer colorretal: Patogênese, diagnóstico e tratamento.....	18
2.2	Quimioterápicos para o tratamento do câncer colorretal.	20
2.2.1	5-Fluorouracil.....	21
2.2.2	Irinotecano.....	22
2.3	Lipossomas.....	25
2.3.1	Lipossomas de circulação prolongada.....	29
2.3.2	Lipossomas pH-sensíveis.	31
2.3.3	Lipossomas sítio-específicos.....	34
2.3.4	Lipossomas de 5-fluorouracil e irinotecano.....	36
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4	OBJETIVOS.....	39
4.1	Objetivo geral.....	39
4.2	Objetivos específicos.....	39
5	CAPÍTULO 1 - LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS REVESTIDOS POR FOLATO CONTENDO IRINOTECANO COMO UMA ALTERNATIVA PARA MELHORAR A EFICÁCIA DO TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL.....	40
5.1	Introdução.....	40
5.2	Objetivos.....	43
5.2.1	Objetivo geral.	43
5.2.2	Objetivos específicos.....	43
5.3	Materiais e métodos.	43
5.3.1	Materiais.....	43
5.3.2	Métodos.....	44
5.3.2.1	Preparação do lipossoma.....	44
5.3.2.2	Caracterização físico-química dos lipossomas.....	45
5.3.2.2.1	Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE).....	45
5.3.2.2.2	Análise de rastreamento de nanopartículas.	45
5.3.2.3	Estudo de liberação e pH-sensibilidade.....	45
5.3.2.4	Microscopia confocal.....	46
5.3.2.5	Estudos <i>in vivo</i>	46
5.3.2.5.1	Cultura de células.....	46
5.3.2.5.2	Inoculação de tumor.....	47
5.3.2.5.3	Atividade antitumoral.....	47
5.3.2.5.4	Estudo hematológico e bioquímico.	47

5.3.2.5.5	Análise histológica.....	48
5.3.2.6	Análise estatística.....	48
5.4	Resultados.....	48
5.4.1	Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE)	48
5.4.2	Estudos de liberação de drogas sensíveis a pH.....	50
5.4.3	Microscopia confocal.....	51
5.4.4	Atividade antitumoral.....	51
5.4.5	Estudo hematológico e bioquímico.	53
5.4.6	Análise histológica.....	55
5.5	Discussão.....	56
5.6	Conclusão.....	60
6	CAPÍTULO 2 - PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS FOLATADOS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO 5-FLUOROURACIL E IRINOTECANO PARA O TRATAMENTO DO CANCER COLORRETAL.....	61
6.1	Introdução.....	61
6.2	Objetivos.....	62
6.2.1	Objetivo geral.	62
6.2.2	Objetivos específicos.....	62
6.3	Materiais e métodos.	63
6.3.1	Materiais.....	63
6.3.2	Métodos.....	63
6.3.2.1	Preparo dos lipossomas.....	63
6.3.2.1.1	Co-encapsulação de 5-fluorouracil e irinotecano.....	63
6.3.2.1.2	Lipossomas de 5-FU.....	64
6.3.2.2	Caracterização físico-química.....	65
6.3.2.2.1	Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	65
6.3.2.2.2	Análise de rastreamento de nanopartículas.....	65
6.3.2.3	Quantificação dos fármacos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	65
6.3.2.3.1	5-FU.....	65
6.3.2.3.2	IRN.....	66
6.3.2.4	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	67
6.3.2.5	Estudos <i>in vivo</i>	67
6.3.2.5.1	Cultura de células.	67
6.3.2.5.2	Inoculação das células tumorais.....	67
6.3.2.5.3	Atividade antitumoral.....	68
6.3.2.6	Análise estatística.....	68
6.4	Resultados.....	69
6.4.1	Preparo e caracterização das formulações.....	69
6.4.1.1	Quantificação do 5-FU por HPLC.....	69

6.4.1.2	Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE) das formulações SpHL-5-FU.....	69
6.4.1.3	Quantificação de irinotecano por HPLC.....	71
6.4.1.4	Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE) das formulações SpHL-IRN-FOL.....	72
6.4.2	Co-encapsulação.....	73
6.4.3	Estudos de liberação.....	74
6.4.3.1	5-FU.....	74
6.4.3.2	Lipossomas de DPPC.....	75
6.4.3.2.1	Preparo e caracterização.....	75
6.4.3.2.2	Estudo de liberação de 5-FU.....	76
6.4.3.2.3	Estudo de liberação de IRN.....	77
6.4.3.3	Estudos de atividade antitumoral <i>in vivo</i>	78
6.5	Discussão.....	79
6.6	Conclusão.....	83
7	DISCUSSÃO GERAL	84
8	CONCLUSÕES GERAIS	88
9	PERSPECTIVAS	89
	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE – ARTIGO: pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment, Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 144, 2021	111
	ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	122

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor maligno mais frequente no mundo e o segundo em taxas de mortalidade (SUNG *et al.*, 2021). O diagnóstico do CCR é estabelecido a partir do estudo histopatológico, somado a isso, exames complementares são necessários para um melhor estadiamento do tumor. O tratamento principal do CCR localizado é a abordagem cirúrgica, porém torna-se necessário a adição de quimioterapia adjuvante em estágios mais avançados.

O 5-fluoruracil (5-FU) é um dos principais medicamentos no tratamento do CCR. Trata-se de um análogo das pirimidinas e atua como um antimetabólico ao inibir a síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA) e ao danificar o ácido ribonucleico (RNA) (Longley *et al.*, 2003). Outro quimioterápico muito utilizado é um análogo da camptotecina, o irinotecano (IRN) que tem como alvo a topoisomerase I, uma enzima nuclear essencial para a replicação do DNA, e tem demonstrado taxas de respostas semelhantes às obtidas com o 5-FU (SHIMADA *et al.*, 1993; TAKIMOTO *et al.*, 1997). As limitadas respostas dos tumores avançados do cólon à quimioterapia assim como ao grande número de efeitos tóxicos, indicam claramente a necessidade de novas drogas e/ou modalidades terapêuticas a fim de reduzir a morbimortalidade nesse tipo de tumor. Uma alternativa que tem sido utilizada é a administração desses fármacos em sistemas de liberação controlada, como os lipossomas.

O emprego de lipossomas tem se mostrado uma estratégia interessante para diminuir a toxicidade sistêmica de agentes quimioterápicos, sendo os lipossomas peguilados as nanoestruturas mais extensivamente estudadas. Estes lipossomas apresentam em sua superfície moléculas de polietilenoglicol (PEG) que contribuem para o aumento do tempo de circulação, permitindo que se acumulem passivamente na região tumoral em detrimento de tecidos saudáveis (WORKING *et al.*, 1994; GABIZON *et al.*, 2002; BARENHOLTZ, 2012).

Outra estratégia baseia-se nas características fisiopatológicas dos tumores sólidos, onde a alta atividade glicolítica associada a áreas de hipóxia promove um microambiente tumoral ácido (HEINRICH *et al.*, 2016). Lipossomas responsivos a variações de pH têm sido desenvolvidos como estratégia para o acúmulo seletivo de

fármaco na região do tumor (OLIVEIRA *et al.*, 1998; LEITE *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2013; BARROS *et al.*, 2015). Além disso, recentemente tem sido estudado, o emprego de moléculas na superfície lipossomal, para aumentar o direcionamento ativo da partícula. Dentre as estratégias de modificação de superfície de nanoestruturas, a utilização da molécula de folato (fol) é uma das mais amplamente estudadas, por ser uma molécula pequena, pouco imunogênica, altamente estável e de baixo custo (HONG *et al.*, 2017). A utilização desta ferramenta baseia-se na expressão limitada de receptores de folato (RF) em tecidos sadios associada à alta afinidade do fol por RF nas células de tumores (YANG, *et al.*, 2015; HONG *et al.*, 2017).

Existem algumas pesquisas com nanopartículas encapsulando 5-FU e IRN, porém elas ainda carecem de resultados significativos na atividade antitumoral (RIVIERE *et al.*, 2011), e os protocolos de tratamento ainda cursam com alta toxicidade e baixo índice de resposta, principalmente para alguns tipos celulares mais resistentes. Por isso, torna-se necessário o preparo de formulações inovadoras que aumente de forma significativa a concentração dos fármacos na região tumoral a ponto de melhorar o efeito antitumoral ou mesmo reduzir os efeitos tóxicos.

Considerando o que foi exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de lipossomas folatados pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL) contendo 5-fluorouracil e/ou irinotecano para o tratamento do câncer colorretal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer colorretal: patogênese, diagnóstico e tratamento

O câncer é uma doença complexa cuja característica principal é a modificação da resposta de um tecido específico a sinais regulatórios de proliferação, sobrevivência, diferenciação e morte celular (STRICKER & KUMAR, 2010; TAN *et al.*, 2020).

Foram evidenciadas a ocorrência de mais de 19,3 milhões de novos casos de câncer no mundo no ano de 2020 e mortalidade de aproximadamente 10 milhões de pessoas (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, estimativas para o biênio 2020-2022, espera-se cerca de 625 mil novos casos de câncer por ano, com maiores taxas de incidência para tumores pulmão, mama, próstata e colorretal (INCA, 2019).

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor maligno mais frequente no mundo, sendo superado em incidência apenas pelos tumores de pulmão e mama, porém é o segundo em taxa de mortalidade (CANCER RESEARCH UK, 2019). Contraditoriamente, é também um dos cânceres mais evitáveis, pois quase sempre surge de neoplasias benignas, denominadas adenomas tubulares e pólipos serrilhados, que evoluem para CCR ao longo de vários anos. A lenta progressão do câncer na população em geral oferece uma oportunidade para detectar e remover os pólipos antes que eles sofram transformação maligna (GRADY *et al.* 2015).

Existem diversos fatores que desempenham um papel direto na condução da sequência do pólipo-CRC, incluindo mutações genéticas, alterações epigenéticas e alterações inflamatórias locais, entre outras. Estudos demonstraram que a sequência do pólipo-CRC é heterogênea e envolve múltiplas vias diferentes. Um dos aspectos centrais da formação do CCR é que o acúmulo dessas alterações transforma células epiteliais glandulares normais em adenocarcinomas invasivos. A sequência de evolução do pólipo para câncer foi proposta no modelo de progressão tumoral de Fearon e Vogelstein e envolve uma etapa que inicia a formação de neoplasias benignas (adenomas e pólipos serrilhados sésseis), seguida de uma etapa que promove a progressão para neoplasias histologicamente mais avançadas e, em seguida, transforma os tumores em carcinoma invasivo (VOGELSTEIN, *et al.* 1988).

Desde que este modelo foi originalmente proposto, a compreensão da patogênese molecular do CCR avançou consideravelmente (GRADY *et al.* 2015).

O diagnóstico do câncer colorretal resulta da avaliação de pacientes sintomáticos ou como resultado de triagem. A doença pode estar associada a uma série de sintomas, incluindo sangue nas fezes, mudança nos hábitos intestinais e dor abdominal. Outros sintomas incluem fadiga, sintomas relacionados à anemia (palidez, falta de ar e perda de peso). Com a ampla introdução do rastreamento populacional para o CCR muitos indivíduos são diagnosticados no estágio pré-clínico. Em pacientes sintomáticos, a colonoscopia é o método de investigação preferencial, mas exames endoscópicos também estão disponíveis. (VALORI, *et al.*, 2012; KUIPERS, *et al.*, 2015). O diagnóstico do CCR é estabelecido a partir de estudo histopatológico, sendo o adenocarcinoma o principal tipo de tumor maligno em cólon e reto. Os demais tumores são subtipos histológicos menos comuns como linfomas e os tumores neuroendócrinos. Diante do diagnóstico de câncer colorretal, deve-se realizar exames complementares visando determinar a extensão da doença a nível local e sistêmico. O principal objetivo do estadiamento é definir o prognóstico do paciente a fim de traçar o plano terapêutico mais adequado (KUIPERS, *et al.*, 2015).

Existem três principais abordagens para o tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que podem ser usados isoladamente ou em combinação, de acordo com o tipo e a gravidade da doença (SPITZNER *et al.*, 2014). O tratamento principal do CCR localizado é a abordagem cirúrgica (Haller *et al.*, 2005). No estágio inicial o tratamento cirúrgico isolado garante taxas de cura entre 90 e 95% e é, portanto, o tratamento preconizado. No entanto, cerca de 20% dos pacientes apresentam metástase ao diagnóstico e 30% a 40% dos pacientes com a doença localizada acaba por desenvolver metástases. (WOLPIN, *et al.*, 2008). A maioria dos pacientes com doença metastática são candidatos à quimioterapia sistêmica com objetivo de paliar os sintomas e prolongar a vida. De acordo com o American Joint Committee on Cancer, em relação aos estágios do câncer (I – IV), as taxas de sobrevida global em 5 anos diminuem drasticamente: estágio I, superior a 90%; estágio II, 70%–85%; estágio III, 25%–80%; e estágio IV, menos de 10% (GREENE, *et al.*, 2002; O'CONNELL, *et al.*, 2004; MEYERHARDT, *et al.*, 2005). Por isso, cada vez mais, são

necessárias novas pesquisas para estabelecer tratamentos mais específicos e eficazes a fim de melhorar a qualidade e a sobrevida dos pacientes.

2.2 Quimioterápicos para o tratamento do câncer colorretal

Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de desenvolver agentes quimioterápicos mais eficazes, no entanto, o grande desafio no desenvolvimento de fármacos antitumorais não é a identificação de agentes capazes de destruir células cancerosas, mas sim encontrar fármacos com elevada especificidade e segurança (ALMEIDA *et al.*, 2005). A quimioterapia atual para o CCR inclui terapia com agente único, principalmente à base de fluoropirimidina (5-FU), e regimes com agentes múltiplos incluindo oxaliplatina (OX), irinotecano (IRI) e capecitabina (CAP). Os esquemas de terapia combinada FOLFOX (5-FU+OX), FOXFIRI (5-FU+IRI), CAPOX (CAP+OX) estão entre as principais abordagens no tratamento de primeira linha, enquanto pacientes com baixo desempenho ou de baixo risco são recomendados para receber terapia com agente único. (SEYMOUR *et al.*, 2007; KOOPMAN *et al.*, 2007; XIE, *et al.*, 2020)

Diversas pesquisas mostram que a quimioterapia em pacientes com CCR, especialmente aqueles com metástases, elevou o tempo de sobrevida, fazendo com que essa abordagem seja indispensável nesses casos. (CASSIDY *et al.*, 2004; GOLDBERG *et al.*, 2004; COLUCCI, *et al.*, 2005). Todavia, a quimioterapia possui algumas limitações, como toxicidade sistêmica, taxa de resposta insatisfatória, resistência inata e adquirida imprevisível e baixa seletividade específica para o tumor.

Como é sabido, a combinação de uma fluoropirimidina, como 5-fluorouracil (5-FU) e o irinotecano (IRN) é amplamente utilizada para o tratamento de câncer colorretal por causa do efeito aumentado da morte celular exercido por este par de antineoplásicos. Portanto, é crucial, desenvolver novas abordagens para refinar ou mesmo substituir a quimioterapia CRC atualmente disponível. (XIE, *et al.*, 2020)

2.2.1 5-Fluorouracil

O 5-fluorouracil (5-FU) é o principal medicamento no tratamento do CCR. Desenvolvido na década de 50, este análogo das pirimidinas atua como um antimetabólico ao inibir a síntese do DNA e ao danificar o RNA. O 5-FU é rapidamente inativado no fígado por ação da enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD). A porção que permanece ativa é metabolizada, no espaço intracelular, em monofosfato de 5-fluorouracila-ribose (5-FU-MP) pela enzima monofosfato de uridina pirofosforilase (UPRTase) (Longley *et al.*, 2003). Em seguida, o 5-FU-MP é sintetizado em trifosfato de 5-fluoruridina (5-FU-TP) ou é metabolizado em 5-fluoro-2'desoxiuridina-5-monofosfato (5-Fd-UMP) que é um potente inibidor da enzima timidilato sintetase (TS) (LONGLEY *et al.*, 2003, PANCZYK *et al.*, 2014).

Um segundo mecanismo de dano ao DNA é decorrente do acúmulo intracelular do difosfato de 5-fluoruridina (5-FU-DP) após a inibição da TS. O 5-FU-DP se liga ao DNA gerando apoptose. O 5-FU gera também dano ao RNA. O mecanismo de ação relacionado a dano do RNA é resultante da incorporação do 5-FU-TP, gerando inibição do processo de maturação dos precursores dos RNA ribossômico, RNA transportador e RNA mensageiro (LONGLEY *et al.*, 2003), esse mecanismo é representado na figura 1.

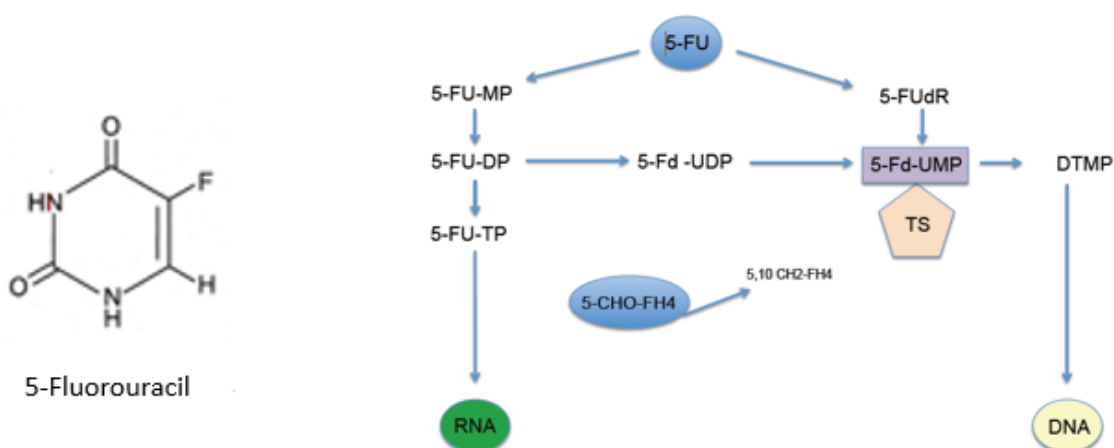


Figura 1 – Estrutura do 5-fluorouracil e mecanismo de ação por incorporação de seu metabólito ao RNA e pela inibição da síntese de DNA. Adaptado de Frota C.O.R., 2005.

O 5-FU é clinicamente utilizado no tratamento de adenocarcinomas de diversas etiologias como colorretal, estômago, pâncreas, mama, e carcinomas

epidermóides de cabeça e pescoço. No CCR este antimetabólito, quando utilizado de forma isolada apresenta taxas de respostas entre 10% a 15%, quando administrado junto com leucovorina estas respostas podem chegar a 25%, sem significativa melhora na sobrevida (HEALEY *et al.*, 2013). A administração em bolus produz maior toxicidade hematológica, enquanto a infusão contínua se caracteriza por mucosite gastrointestinal. Em ambos os esquemas se observa anorexia, náuseas e vômitos (BENSON III, 1998, HEALEY *et al.*, 2013). A ocorrência desses efeitos colaterais tóxicos graves e degradação rápida limitam o uso clínico desse fármaco. Desse modo, pesquisas sobre encapsulamento de 5-FU em nanocarreadores para melhorar a meia-vida biológica e/ou reduzir efeitos adversos tem ganhado notoriedade (NALWA *et al.*, 2007). Estudos realizados por Li *et al.* 2017 mostraram que os lipossomas carregados com 5-FU modificados com folato-PEG tiveram forte citotoxicidade para a célula tumoral em comparação com 5-FU livre ou 5-FU modificado apenas com PEG e principalmente o lipossoma aumentou a morte celular por endocitose mediada por folato.

2.2.2 Irinotecano

Nos anos 80, outros agentes antineoplásicos que se tornaram disponíveis, demonstraram respostas promissoras tanto em pacientes não tratados como naqueles que tiveram recidivas após terapia com 5-FU. Entre eles, um análogo da camptotecina, o irinotecano, demonstrou taxas de respostas semelhantes às obtidas com o 5-FU (SHIMADA *et al.*, 1993).

O IRN (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carboniloxi-camptotecina) é um análogo semissintético da camptotecina, um alcaloide isolado da casca da árvore chinesa *Camptotheca acuminata*. O IRN apresenta melhor solubilidade em soluções aquosas e toxicidade mais baixa quando comparado com a camptotecina (KANEDA *et al.*, 1990; TAKIMOTO & ARBUCK, 1996, BURRIS III & FIELDS, 1994).

Por ser uma pró-droga, o IRN deve ser convertido em SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin), um metabólito 100-1000 vezes mais potente que o IRN (Kawato *et al.*, 1991). Esta conversão ocorre por um processo de esterificação na

presença da enzima carboxil esterase que está presente em todos os tecidos, inclusive os tumorais (TAKIMOTO & ARBUCK, 1996; JANSEN *et al.*, 1997).

O IRN tem como alvo a topoisomerase I, uma enzima nuclear essencial para a replicação do DNA (TAKIMOTO *et al.*, 1997; KUNIMOTO *et al.*, 1987). Esta enzima está diretamente envolvida com a manutenção da estrutura topográfica do DNA durante os processos de tradução, transcrição e divisão celular promovendo a conversão do DNA com superespiralamento em DNA relaxado (STEWART & SCHUTZ, 1987). Para isto, a topoisomerase I introduz no sítio de replicação de uma das cadeias do DNA uma quebra reversível, formando um complexo covalente entre a enzima e o DNA, chamado de complexo clivável. Em seguida ocorre a religação da fita e dissociação da enzima, regenerando a dupla fita de DNA intacta (**Figura 2**) (TAKIMOTO *et al.*, 1997; AVGERPOULOS & BATCHELOR, 1999).

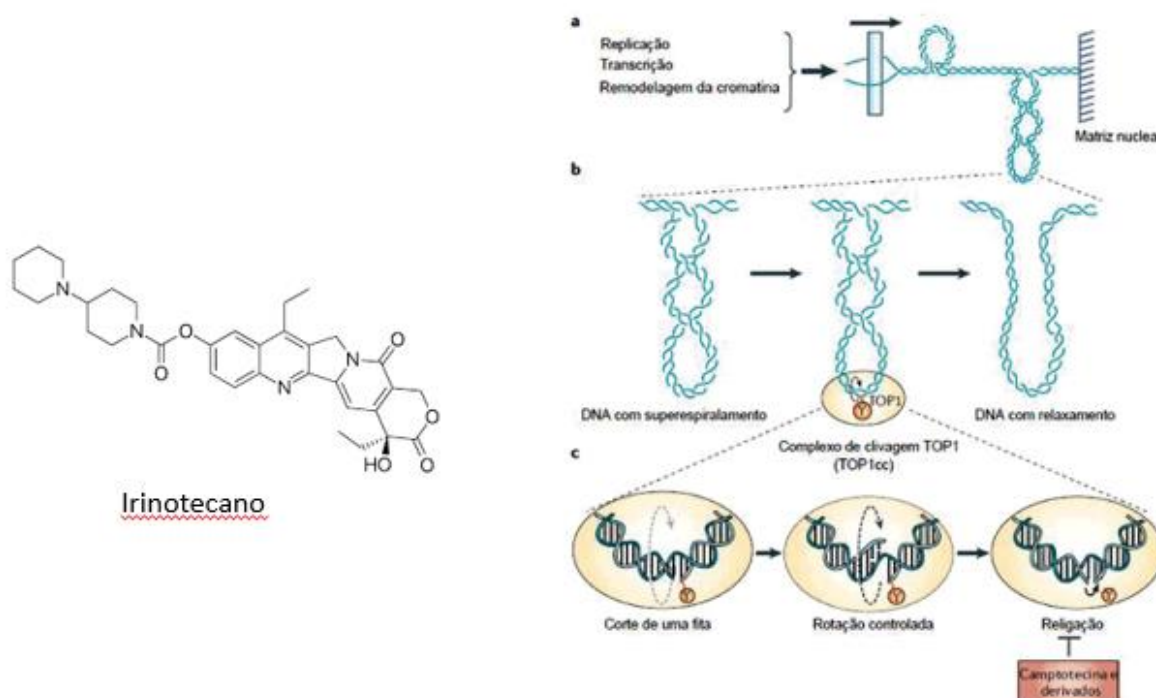


Figura 2 – Estrutura do irinotecano e mecanismo de ação da camptotecina e derivados. Adaptado de Pommier, Y., 2006.

Para o carcinoma colorretal, este agente apresentou taxas de respostas entre 20-30% quando empregado como único agente (ARBUCK & TAKIMOTO, 1998; DOPESO

et al., 2010) e toxicidade que engloba leucopenia, diarreia, náusea e vômito. A principal toxicidade limitante relacionada à terapia com IRN é a diarreia em grau elevado, a qual pode ser controlada com a administração de Loperamida (ARBUCK & TAKIMOTO, 1998). Devido a sua eficácia no câncer colorretal o FDA aprovou a utilização do IRN como tratamento de segunda linha desde 1992 (SASAKI *et al.*, 1994). Porém as formulações disponíveis carecem de especificidade e possuem elevada toxicidade, por isso o uso de nanossistemas tem se mostrado uma alternativa para contornar esses problemas. Resultados encontrados por ZHANG & YAO, 2012 mostraram que lipossomas de irinotecano exibiram significativa inibição do crescimento tumoral dependente da dose e superior atividade antitumoral comparado ao IRN livre. Além disso não apresentaram acréscimo de toxicidade, o que demonstra a potencialidade dos lipossomas de IRN como alternativa para o tratamento do CCR.

Apesar da elevada atividade antitumoral apresentada pelo IRN e 5-FU, o emprego desses fármacos como único agente quimioterápico apresentam ação limitada devido a baixa especificidade e altos níveis de resistência (RIVIERI, *et al.*, 2011). Por isso, a maioria dos protocolos disponíveis empregam a combinação dessas drogas e mostraram ser mais eficazes principalmente em estágios mais avançados do câncer colorretal (GRIVICICH *et al.*, 2005). O 5-FU é um antimetabólito que inibe a síntese do RNA e do DNA através da via da enzima timidilato sintase, enquanto o IRN atua inibindo a enzima topoisomerase I (processo que impede o religamento do DNA após a replicação e causa quebra da fita), como a ação das drogas ocorre em locais distintos do ciclo celular alguns estudos demonstraram que as ações desses fármacos podem ser sinérgicas (AZRAK *et al.*, 2004; FISCHER *et al.*, 2001; GRIVICICH *et al.*, 2005), o que significa que o efeito obtido na associação é maior que somatório do efeito de cada uma das drogas isoladamente. O mecanismo exato do sinergismo não é claramente compreendido, porém acredita-se que o IRN recruta células na fase S que permite aumento da incorporação de fluoropirimidina no DNA e induz apoptose (AZRAK *et al.*, 2004; MAYER *et al.*, 2006; RIVIERE *et al.*, 2011).

Considerando que, a atividade terapêutica de uma combinação de fármacos como IRN e 5-FU depende da manutenção de uma concentração ideal e que as drogas têm propriedades físico-químicas distintas, pode ser difícil o controle da farmacocinética de dois fármacos de forma que os medicamentos atinjam as células alvo na concentração esperada. Por isso, nanopartículas fofoslipídicas como lipossomas têm

sido utilizadas por muitos grupos de pesquisa para aumentar a atividade terapêutica das combinações de medicamentos contra o câncer (MAYER *et al.*, 2006; TARDI *et al.*, 2009; RIVIERE *et al.*, 2011). Vários estudos demonstraram que as combinações de fármacos em lipossomas tiveram significativamente mais atividade terapêutica do que as drogas livres combinadas (MAYER *et al.*, 2006; TARDI *et al.*, 2009, HARASYM *et al.*, 2007). Isso porque, os lipossomas podem sincronizar farmacocinética e biodistribuição de combinações de fármacos permitindo um maior controle da dose e razão molar entre os fármacos ao atingir o local alvo (RIVIERE *et al.*, 2011).

2.3 Lipossomas

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram envolvidas por um meio aquoso (Figura 3). Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, eles são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípides. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar.

Descobertos nos anos 60 por Alec Bangham, os lipossomas vêm sendo investigados intensivamente, com vista à sua utilização como transportadores de fármacos para diversas aplicações clínicas (GREGORIADIS, 1995; TORCHILIN, 2005). Dentre os sistemas nanométricos de transporte e liberação de fármacos, os lipossomas ocupam um lugar de destaque uma vez que são constituídos por moléculas com elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, figuram como estruturas versáteis, pois suas características como tamanho, lamelaridade (número de bicamadas), superfície, fluidez e composição podem ser modificadas de acordo com os requisitos farmacotécnicos e farmacológicos necessários para veicular a substância de interesse (FRÉZARD *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2007).

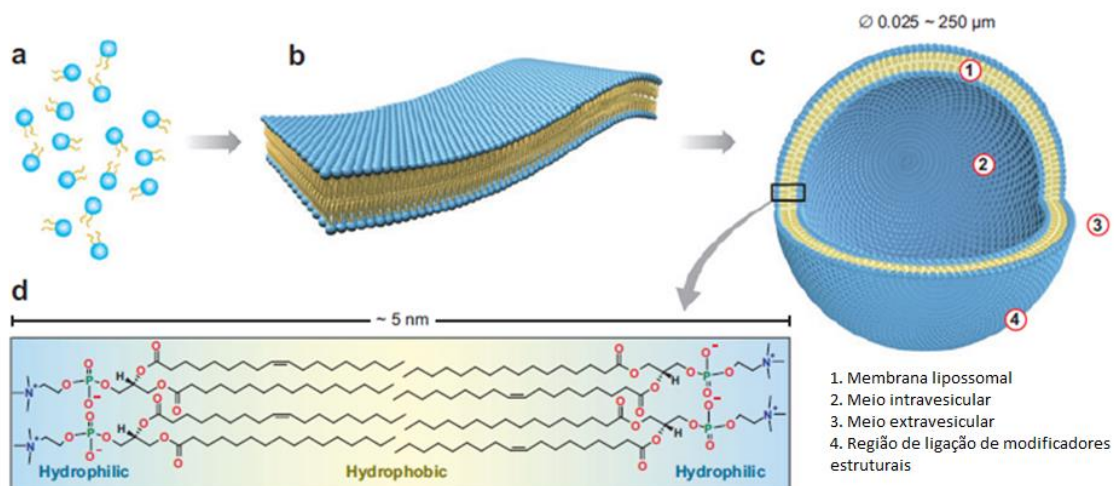


Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação de lipossomas: auto-organização de moléculas individuais de fosfolipídios (a) a folhetos de bicamada membranar (b), seguido da formação em lipossomas (c). A bicamada lipídica é composta por moléculas lipídicas individuais dispostas ordenadamente com as suas caudas hidrofóbicas voltadas para o interior da bicamada e com os seus grupos polares voltados para o meio aquoso e para o meio exterior ao lipossoma (d). Adaptada de Jesorka e Orwar, 2008.

Considerando os parâmetros que podem ser facilmente modificados, destacam-se o diâmetro médio e a lamelaridade das vesículas. O diâmetro médio adequado para aplicação médica varia entre 50 e 450 nm e esse tamanho relaciona-se com o tipo de aplicação. Vesículas com tamanho de 100 a 150 nm são ideais para administração endovenosa uma vez que são capazes de atravessar facilmente os espaços entre as fenestrações dos vasos que irrigam tumores ou tecidos acometidos por processos inflamatórios e infecciosos, porém, não são capazes de atravessar os vasos de tecidos saudáveis, conferindo o que é chamado de direcionamento passivo. É sabido que lipossomas com menores diâmetros são depurados mais lentamente da corrente sanguínea (BOZZUTO & MOLINARI, 2015; BELTRÁN-GARCIA *et al.*, 2019). Por outro lado, partículas menores que 10 nm sofrem filtração renal através da parede capilar glomerular e não são reabsorvidos (GAO *et al.* 2018; MERINO *et al.* 2018) Quanto a lamelaridade, os lipossomas são classificados como uni, oligo ou multilamelares e o número de lamelas de uma vesícula é um fator determinante para a capacidade de encapsulação. Lipossomas unilamelares (*unilamellar vesicles* – ULVs) possuem maior espaço aquoso e idealmente, são capazes de encapsular grande concentração de fármacos hidrofílicos. Por outro lado, lipossomas multilamelares (*multilamellar vesicles* – MLVs) são preferenciais para a encapsulação de moléculas lipofílicas. Adicionalmente, a lamelaridade pode alterar a taxa de liberação de fármacos dos

lipossomas para o meio externo (BETAGERI & PARSONS, 1992; BOZZUTO & MOLINARI, 2015).

Um outro parâmetro importante que deve ser avaliado durante a fabricação de lipossomas é a temperatura de transição dos fosfolipídios (T_c), a temperatura na qual os fosfolipídios mudam da fase gel para a fase líquida cristalina (ZAMANI *et al.* 2018). A T_c depende do comprimento das cadeias de ácidos graxos, seu grau de saturação, carga e espécies de grupos da extremidade da cadeia (HUSSAIN *et al.* 2017; MONTEIRO *et al.* 2014). A T_c determina a fluidez e permeabilidade da bicamada lipossomal. De fato, em temperaturas inferiores a T_c os fosfolipídios estão na fase gel, que possui baixa fluidez e baixa permeabilidade. Em contraste, em temperaturas superiores a T_c , os fosfolipídios estão em fase líquido-cristalina, tendo maior fluidez e permeabilidade. Além disso, quanto maior a cadeia, maior a T_c , e esta diminui quanto mais ligações duplas possuir. Assim, quando comparadas a certas temperaturas, bicamadas com as cadeias de hidrocarbonetos saturadas são mais rígidas e menos permeáveis do que as bicamadas com cadeias mais curtas e insaturadas (MONTEIRO *et al.* 2014; LIN *et al.*, 2014; MURTHY *et al.* 2016). A temperatura de transição e a composição lipídica influenciam a curvatura dos lipossomas e são importantes para garantir a homogeneidade da superfície lipossomal (BELTRÁN-GRACIA, 2019). Portanto, o comportamento de transição de fase das bicamadas lipídicas tem sido explorado para melhorar a agregação de lipossomas, curvatura da membrana, transferência de lipídios e liberação de drogas.

O primeiro produto lipossomal a obter aprovação regulatória nos EUA foi o Doxil®, que foi aprovado em 1995 para o tratamento de câncer de ovário e sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS. Mais tarde, em 1996, o FDA dos EUA aprovou o DaunoXome®, fabricado pela NeXstar Pharmaceuticals, para a entrega de daunorrubicina para tratar Sarcoma de Kaposi associado ao HIV. Posteriormente, mais produtos tornaram-se disponíveis para o tratamento de câncer e diferentes doenças (BULBAKE *et al.* 2017). O quadro 1 mostra diversas formulações lipossomais aprovadas pelo FDA e em estudo clínico para o tratamento do CCR.

	Fármaco	Aplicação	Status (aprovado FDA; em estudo clínico)	Referências
1	Vincristina	Câncer Colorretal; Leucemia aguda Linfoblástica; Leucemia, Sarcoma, Neuroblastoma, Linfoma, Tumores Cerebrais	Aprovado pelo FDA	Gidding <i>et al.</i> (1999)
2	Doxorrubicina	Câncer colorretal com metástases hepáticas	Estudo de Fase II	Celsion (2016)
3	SN-38	Câncer colorretal metastático	Estudo de Fase II (subseqüentemente rescindido)	US Institute of Health (2016)
4	Cloridrato de Irinotecano	Segunda linha para câncer colorretal metastático	Estudo de Fase II (subseqüentemente rescindido)	US Institute of Health (2016)
5	Análogo de cisplatina (Aroplatina)	Câncer colorretal	Estudo de Fase I/II	Pillai (2014)
6	SN38	Câncer colorretal metastático	Estudo de Fase II	Bala <i>et al.</i> (2013)
7	Irinotecano – lipossoma Peguilado (Narekt -102)	Câncer de mama e câncer colorretal	Estudo de Fase III/I	Pillai (2014)
8	Irinotecano lipossomal e Floxuridina	Câncer colorretal metastático	Estudo de Fase II	Cabeza <i>et al.</i> (2020)
9	Irinotecano lipossomal + 5-Fluorouracil e Leucovorina (PEP02 IRI)	Câncer colorretal metastático	Estudo de Fase II	Cabeza <i>et al.</i> (2020)
10	Irinotecano (MM-398)	Câncer colorretal avançado irressecável	Estudo de Fase Ib	Cabeza <i>et al.</i> (2020)
11	Mitomicina C Lipossoma PEGuilado	Câncer colorretal metastático	Estudo de Fase II	Cabeza <i>et al.</i> (2020)
12	Irinotecano (Nal-IRI)	Câncer colorretal metastático; câncer gastrointestinais	Estudo de Fase I/II	Cabeza <i>et al.</i> (2020)

Quadro 1 – Formulações lipossomais aprovadas pelo FDA e para uso clínico para o tratamento do câncer colorretal. Adaptado de Brar (2021).

Como pode ser percebido, os lipossomas proporcionam uma variedade de aplicações farmacêuticas e biomédicas, devido a sua eficiência em encapsular fármacos, como antibióticos, antifúngicos e antineoplásicos (GUIMARÃES *et al.*, 2019). Como vantagens, os lipossomas promovem uma melhor solubilidade de fármacos

encapsulados (dissolução de fármacos insolúveis e liberação sustentada do fármaco), redução dos efeitos adversos inespecíficos e da toxicidade dos fármacos (melhorando sua eficácia e índice terapêutico), direcionamento do fármaco para locais de ação específicos devido as modificações químicas em sua superfície, aumentando a eficácia do tratamento (GHANBARZADEH, *et al.* 2013). Por isso, diversas pesquisas continuam promovendo modificações nos componentes e no preparo dos lipossomas a fim de aprimorar ainda mais as suas aplicações. O emprego de moléculas que aumentam a estabilidade e o tempo circulação dessas partículas foi a primeira modificação a ganhar notoriedade a partir do uso do PEG na superfície lipossomal.

2.3.1 Lipossomas de circulação prolongada

Os primeiros lipossomas a serem desenvolvidos, chamados de convencionais, eram rapidamente opsonizados e eliminados da circulação sistêmica pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) (fígado, baço e medula óssea), tendo assim farmacocinética pouco favorável e potencial toxicidade a estes órgãos. Portanto, estratégias para aumentar o tempo de circulação dos lipossomas tornaram-se relevantes.

Neste contexto, foram desenvolvidos os lipossomas de circulação prolongada, que possuem um revestimento na superfície, que pode ser constituído de componentes hidrofílicos naturais (monossialogangliosídeo e fosfatidilinositol) ou sintéticos como os polietilenoglicóis (PEG). Foi observado que a incorporação, na membrana dos lipossomas, de lipídeos acoplados ao PEG, altera sua interação com o ambiente, sendo o efeito mais importante a redução da captura pelos macrófagos, prolongando o tempo de circulação sanguínea. Esses lipossomas (**Figura 4**) denominados lipossomas de circulação prolongada, permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daqueles do SFM (FONTES *et al.*, 2005).

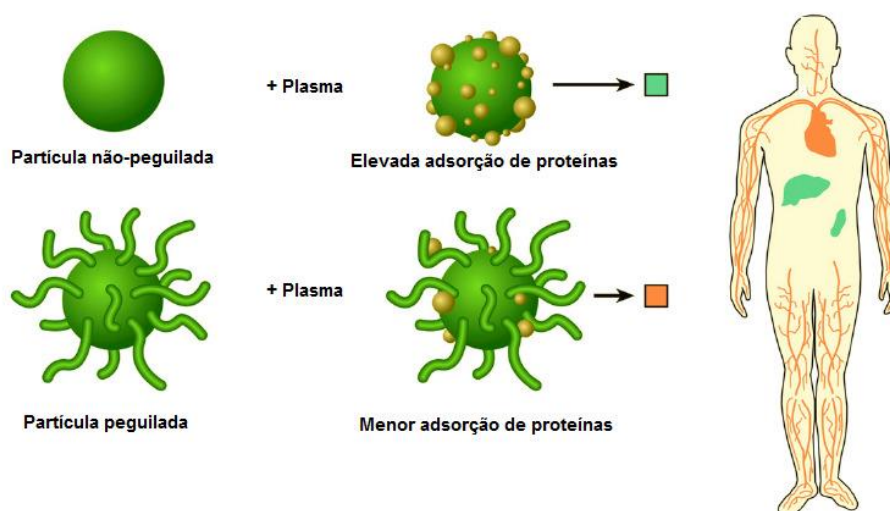


Figura 4 - Representação esquemática do efeito da modificação de superfície de nanopartículas pela incorporação de PEG na adsorção de proteínas plasmáticas e na biodistribuição. Adaptado de AGARWAL *et al.*, 2009.

A presença de grupos hidrofílicos volumosos na superfície dos lipossomas constitui um obstáculo estérico às proteínas plasmáticas que podem atuar como opsoninas. Consequentemente, os lipossomas são menos reconhecidos e destruídos pelas células do SFM (KLIBANOV *et al.*, 1990; WOODLE e LASIC, 1992; STORM *et al.*, 1995). Assim, lipossomas revestidos com PEG podem permanecer por mais tempo na circulação, uma vez que são menos captados pelo SFM, devido à formação de uma camada aquosa ao redor do lipossoma que dificulta o reconhecimento da partícula, constituindo um poderoso instrumento para auxiliar o diagnóstico e/ou tratamento de diversas doenças (CARMO *et al.*, 2008_b, SADZUKA *et al.*, 2002). A adição do PEG à superfície lipossomal caracterizou um grande avanço no uso de lipossomas, pois permitiu a alteração da farmacocinética destas nanoestruturas.

Em termos de estabilidade de armazenamento, a presença do PEG impede a coalescência e fusão das vesículas em meio aquoso, mantendo o tamanho adequado até o momento da administração. No desenvolvimento de lipossomas de circulação prolongada é comum a utilização de cadeias longas de PEG (PM = 2000 Da) acopladas ao fosfolípide distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE-PEG₂₀₀₀). O PEG pode ainda ser facilmente modificado pela adição de ligantes como transferrina, folato (Fol), peptídeos e anticorpos a fim de promover direcionamento ativo (VEMURI & RHODES,

1995; FEENEY *et al.*, 2014; BOZZUTO & MOLINARI, 2015; SUK *et al.*, 2016; ZYLBERBERG & MATOSEVIC, 2016).

Embora ganhos consideráveis tenham sido obtidos com a estratégia de aumentar o tempo de circulação sanguínea das vesículas lipossomais, em geral, esses sistemas apresentam uma lenta liberação do material encapsulado bem como ausência de atividade fusogênica após internalização no compartimento endossomal. Nesse contexto, lipossomas pH-sensíveis, constituídos por lípides com propriedade fusogênica, têm sido extensivamente estudados como alternativa para o acúmulo de quimioterápicos em tecidos tumorais (FERREIRA *et al.*, 2013).

2.3.2 Lipossomas pH-sensíveis

Estudos direcionados à sistemas de carreamento de moléculas com atividade antineoplásica têm avançado em direção a estruturas multifuncionalizadas, que têm como objetivo principal aumentar a especificidade e a concentração de fármaco nas células tumorais em detrimento dos tecidos sadios (LEE & THOMPSON, 2017). Dentre essas estratégias, foram desenvolvidas formulações responsivas a estímulos presentes no microambiente tumoral, nas células tumorais ou até mesmo externos ao organismo. Foram descritos na literatura sistemas responsivos a: a) pH; b) temperatura; c) enzimas; d) substâncias oxidantes; e) concentração de oxigênio; f) ultrassom; g) luz; h) campo magnético (TAYO, 2017; DAS *et al.*, 2020). Neste contexto, destacam-se os lipossomas pH-sensíveis (SpHL).

Os SpHL são estruturas estáveis em pH fisiológico (pH ~ 7,4) que, em condições ácidas, perdem a estabilidade liberando o material encapsulado. Este tipo de ferramenta tem sua aplicação fundamentada no conhecimento de que a alta atividade proliferativa das células tumorais, em conjunto com a rápida e pouco eficiente neovascularização, impede a nutrição e oxigenação adequada do tecido. As áreas de hipóxia, associadas a intensos processos de glicólise, promovem uma discreta acidificação (pH 6,2 - 7,2) do microambiente tumoral, gerando um gradiente de pH em relação aos tecidos sadios, aumentando seletivamente a liberação de fármaco nessa região por nanoestruturas pH-sensíveis (KARANTH & MURTHY, 2007; BARROS *et al.*, 2013; TAYO, 2017; LEE & THOMPSON, 2018). Além disso, estudos posteriores

apontaram a vantagem de se utilizar SpHL no direcionamento intracelular de fármacos, aumentando assim sua especificidade (JAIN & JAIN, 2018). Quando endocitados, o pH ácido dos endossomas (pH 5,0-6,0) desencadeia a desestabilização da bicamada lipídica de SpHL, promovendo a rápida liberação do fármaco e por obra das propriedades fusogênicas, ocorre a transferência do conteúdo para o citoplasma (FERREIRA *et al.*, 2013; AGHDAM *et al.*, 2019).

Esses lipossomas, classificados como polimórficos, exibem transições de fases, características dos seus constituintes fosfolípidicos. Para que a pH-sensibilidade dos lipossomas seja efetiva, a combinação de fosfolípides com moléculas de caráter anfifílico contendo grupos funcionais protonáveis/desprotonáveis é necessária. (BATISTA; CARVALHO; MAGALHAES, 2007). Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, 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 (SIEGEL, 1986). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lipídeos carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada (Figura 5). Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar (Figura 6), possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com consequente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

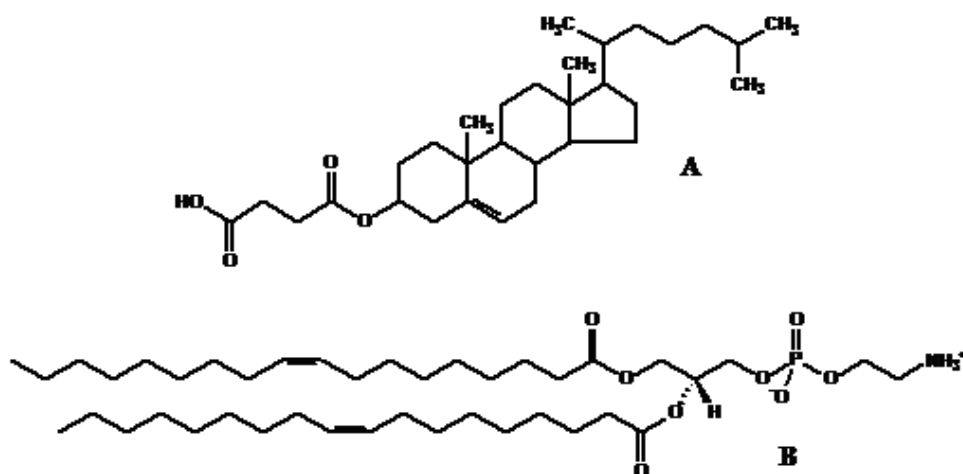


Figura 5 - Estruturas químicas do CHEMS (A) e DOPE (B). Disponível em www.avantilipis.com (2020).

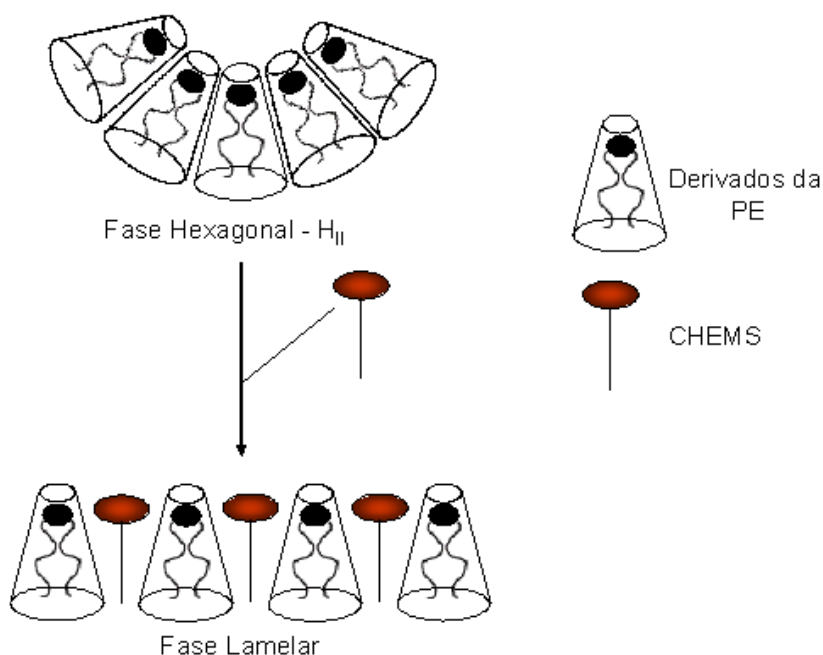


Figura 6 - Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.

Vários estudos já demonstraram que o uso de lipossomas pH-sensíveis é uma estratégia interessante para aumentar o acúmulo de fármacos antineoplásicos na região do tumor (de BARROS *et al.*, 2013; de BARROS *et al.*, 2015, SILVA *et al.*, 2016). Considerando o perfil de segurança destes sistemas, observou-se redução

significativa da toxicidade sistêmica (renal, hepática e intestinal) e morbimortalidade relacionada a doxorubicina e cisplatina em modelos murinos quando estes fármacos foram encapsulados em SpHL. Além disso, a encapsulação da cisplatina em SpHL exerceu um efeito imunomodulatório benéfico (LEITE *et al.*, 2011; MARONI *et al.* 2012; CARLESSO *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2017; FERREIRA, *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2018). Portanto, levando-se em consideração a eficiência de SpHL ao encapsular antineoplásicos, uma outra estratégia importante para incrementar a ação antitumoral é o estudo de funcionalizações de SpHL empregando agentes de direcionamento superexpressos nos tecidos tumorais a fim de potencializar a especificidade e a captação intracelular de fármacos encapsulados nesses sistemas.

2.3.3 Lipossomas sítio-específicos

A determinação de características moleculares dos tumores e sua utilização na escolha de estratégias terapêuticas tem se mostrado importantes no tratamento de pacientes com resistência a quimioterapia convencional ou tumores em estágio avançado. A terapia direcionada começou a ser mencionada na década de 1970 com a aprovação de tamoxifeno e inibidores de aromatase em tumores positivos para receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), dando início à terapia personalizada. Em seguida, o desenvolvimento do anticorpo monoclonal trastuzumab, específico para o fator de crescimento epidermal humano do tipo 2 (HER-2) e a introdução dele na terapia adjuvante dos cânceres de mama com superexpressão deste marcador representaram grande avanço na terapia-alvo devido às vantagens significativas na sobrevida dos pacientes (MEISEL *et al.*, 2018; GREENWALT *et al.*, 2019).

Terapias baseadas em subtipos moleculares oferecem uma nova alternativa para resultados mais precisos em contextos clínicos. O CRC é um conjunto muito heterogêneo de células e cada subtipo exhibe diferentes assinaturas patológicas e genéticas, com isso a estratificação terapêutica para pacientes individuais pode levar a melhores resultados terapêuticos. O Sistema de classificação mais empregado atualmente classifica o CCR em quatro subtipos moleculares consensuais (CMSs): CMS1 (imune a MSI), CMS2 (canônico), CMS3 (metabólico) e CMS4 (mesenquimal))

que ajudam da extratificação clínica e intervenções direcionadas baseadas em subtipos (GUINNEY *et al.*, 2015).

O primeiro agente direcionado para o CCR aprovado pela FDA foi o cetuximab em 2004, seguido pelo bevacizumab no mesmo ano, ambos na promissora linha de medicamentos anti-EGFR (receptor do fator de crescimento). Desde então, a determinação de novos alvos moleculares para o tratamento do câncer teve grande progresso nos últimos anos. (XIE *et al.*, 2020). O impacto positivo da terapia-alvo no tratamento do câncer e a utilização deste princípio na funcionalização de nanossistemas como ferramenta para o direcionamento específico de agentes antitumorais tornou-se um importante e promissor campo de estudo atualmente. Existem diversas estratégias de funcionalização, entre elas o recobrimento de nanoestruturas com anticorpos para receptores já é bem estabelecido para o câncer de mama. Além disso, a funcionalização de sistemas com pequenas moléculas (Fol, aptâmeros, transferrina) ou peptídeos ligantes para outros alvos moleculares superexpressos nas células, bem como em componentes do microambiente tumoral, têm se mostrado altamente relevantes (BYRNE, BETANCOURT & BETANCOURT, 2008; MCCARTHY *et al.*, 2010; PASZKO & SENGE, 2012; PÉREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

Dentre as estratégias de modificação de superfície de nanoestruturas, a utilização de Fol é amplamente estudada, isso porque, trata-se de uma molécula pequena, pouco imunogênica, altamente estável e de baixo custo (HONG *et al.*, 2017). Para nanoestruturas lipídicas, moléculas de Fol ligadas a cadeias de DSPE-PEG₂₀₀₀ são comumente utilizadas (Figura 7) (SOARES *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2018a). A utilização desta ferramenta é baseada na expressão limitada de receptores de folato (RF) em tecidos sadios associada à alta afinidade Fol por RF do tipo α superexpresso nas células de até 40% tumores estudados (YANG, *et al.*, 2015; ALIBOLANDI, *et al.*, 2016; HONG *et al.*, 2017). Considerado apenas os tumores de câncer colorretal, cerca de 33% dos tumores primários e 44% dos metastáticos podem expressar RF (SHIA *et al.*, 2008). Quando associadas a sistemas estímulo-responsivos, como SpHL, a funcionalização com Fol é extremamente vantajosa por potencializar a endocitose dos sistemas e a rápida liberação do fármaco encapsulado mediante diminuição do pH endossomal (GANTA *et al.*, 2008; JAIN & JAIN, 2018).

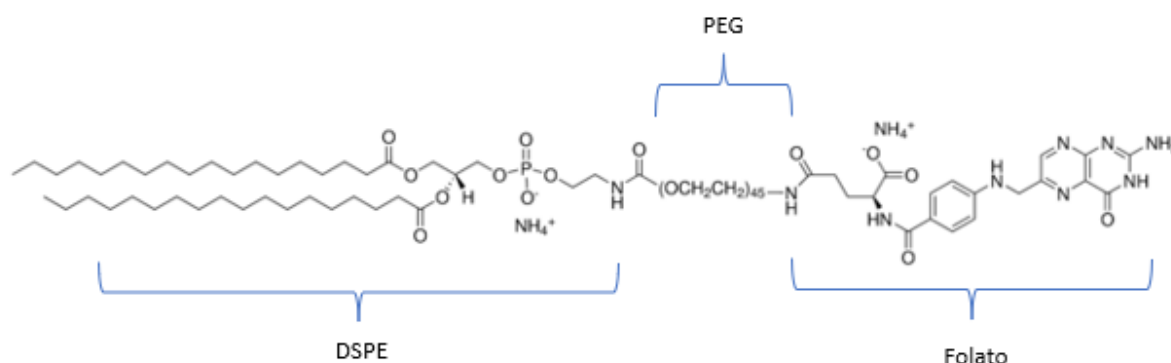


Figura 7 - Estrutura molecular do DSPE-PEG₂₀₀₀-Folato.

O estudo pré-clínico *in vitro* e *in vivo* de novas estratégias terapêuticas para o câncer colorretal requer a utilização de modelos experimentais adequados. Dentre os modelos disponíveis para estudos *in vivo*, o tumor de células CT26 é um dos modelos de tumor murino mais amplamente utilizado e considerado vantajoso para o estudo da progressão tumoral e avaliação da resposta terapêutica. (CASTLE *et al.*, 2014)

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a utilização de SpHL modificados com Fol (SpHL-Fol) contendo paclitaxel apresentaram maior citotoxicidade *in vitro*, além de maior acúmulo na região tumoral em modelo murino, quando comparados a lipossomas não funcionalizados. Adicionalmente, foi demonstrado o aumento da atividade antitumoral do paclitaxel em modelo murino de tumor de mama humano quando encapsulado em SpHL-Fol pelo aumento da efetividade de entrega intracelular do fármaco (BARBOSA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2019). Estes dados corroboram a hipótese da potencialidade da utilização de SpHL-Fol carreando IRN e/ou 5-FU como sistemas específicos eficientes para tratamento do câncer colorretal.

2.3.4 Lipossomas de 5-fluoracil e irinotecano

Vários estudos afirmam que combinações de drogas carregadas por lipossomas têm significativamente maior atividade terapêutica do que as drogas livres combinadas (MAYER *et al.*, 2006; TARDI *et al.*, 2009, HARASYM *et al.*, 2007). Além do melhor

controle do efeito terapêutico entre 5-FU e irinotecano, a encapsulação em lipossomas também é muito utilizada para reduzir os efeitos tóxicos desses quimioterápicos.

Nos seres humanos, o IRN livre é metabolizado pelas carboxilesterases em SN-38, uma droga que é considerada mais potente do que o composto original (KAWATO *et al.*, 1991; LAVELLE *et al.*, 1996). Ambos os compostos inibem a topoisomerase I e causam quebras na cadeia de DNA durante a replicação que levam à morte celular. No entanto, sob condições fisiológicas, esses compostos são hidrolisados por esterases em seu carboxilato biologicamente inativo reduzindo assim a sua disponibilidade biológica (MATHIJSEN *et al.*, 2001; RIVORY *et al.*, 1994). Níveis altos de carboxilesterases gastrointestinais em órgãos como o intestino pode resultar em concentrações tóxicas de SN-38 que danificam gravemente a mucosa do intestino (KHANNA *et al.*, 2000; GUICHARD *et al.*, 1999). A diarreia resultante pode ser tão grave que ameaça a vida ou é limitante da dose. Logo, a eficácia terapêutica do IRN livre é infelizmente prejudicada por toxicidade localizada e limitada à disponibilidade biológica (MATHIJSEN *et al.*, 2001; SALIBA *et al.*, 1998; WISEMAN *et al.*, 1996).

Já existem estudos em andamento utilizando lipossomas para carreamento desses farmacos com maior atividade antitumoral que as drogas livres (Kang *et al.*, 2009; Ramsay *et al.*, 2008; Baker *et al.*, 2008). Em estudos de citotoxicidade *in vitro*, o 5-FU na forma encapsulada em lipossomas é mais ativo do que na forma livre (Bocci *et al.*, 2002; Carmeliet *et al.*, 2011). Em outro trabalho, o irinotecano pôde ser eficientemente encapsulado e apresentou maior atividade antitumoral *in vivo* do que o IRN livre (VERREAULT *et al.*, 2012; HARE *et al.*, 2013). Como já descrito, os regimes de tratamento para o câncer colorretal apresentam alto índice de resistência e toxicidade. Dessa forma, o uso de lipossomas pode aumentar a concentração dos quimioterápicos no sítio alvo e ampliar o efeito terapêutico, que, por sua vez, pode reduzir o nível de resistência ao tratamento. Adicionalmente a isso, o desenvolvimento de formulações lipossomais funcionalizadas com a combinação dos fármacos citados poderia incrementar e/ou substituir os protocolos de tratamento atualmente disponíveis.

3 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, torna-se emergente a busca por novas alternativas de tratamento do câncer colorretal. Os quimioterápicos 5-FU e Irinotecano são antineoplásicos amplamente utilizados no tratamento desse tumor, no entanto, a toxicidade sistêmica e o alto nível de resistência aos regimes de tratamento disponíveis são importantes fatores limitantes da dose.

Como abordado, o emprego de lipossomas folatados pH-sensíveis de circulação prolongada contendo esses quimioterápicos seria uma estratégia interessante para aumentar o acúmulo de fármacos na região do tumor e para reduzir os efeitos adversos associados a esses fármacos, podendo ser considerada uma ferramenta promissora para tratamento de tumores.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral e segurança de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo 5-fluorouracil e/ou irinotecano em modelo de tumor colorretal.

4.2 Objetivos específicos

- Preparar lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada encapsulando 5-fluorouracil e/ou irinotecano.
- Caracterizar os lipossomas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação.
- Avaliar a liberação *in vitro* dos fármacos e estabilidade físico-química das formulações.
- Determinar a pH-sensibilidade das formulações.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* em animais portadores de tumor de adenocarcinoma colorretal.
- Avaliar a toxicidade sistêmica das formulações preparadas.

5 CAPÍTULO 1

LIPOSSOMAS pH-SENSÍVEIS REVESTIDOS POR FOLATO CONTENDO IRINOTECANO COMO UMA ALTERNATIVA PARA MELHORAR A EFICÁCIA DO TRATAMENTO DO CÂNCER COLORRETAL

(Artigo: pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 144, 2021 – Apêndice)

5.1 Introdução

As camptotecinas são compostos derivados de alcalóides e são eficientes antineoplásicos que pertencem à família das substâncias que interagem com a topoisomerase I (WEI *et al.*, 2013). O topotecano e o irinotecano (IRN) são duas camptotecinas que já foram aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA (PIEDBOIS, 1998; WEI *et al.*, 2013). O IRN (7-etil-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)carboniloxicamptotecina) é um medicamento de primeira linha aprovado para o tratamento de uma variedade de tipos de câncer, incluindo câncer colorretal, pulmonar e ginecológico (JANSEN *et al.*, 1997). Embora possa ser usado como monoterapia, geralmente é administrado em combinação com agentes citotóxicos, incluindo oxaliplatina e 5-fluorouracil (5-FU) e como terapia de resgate na doença refratária ao 5-FU (CASADÓ; SAGRISTÁ; MORA, 2018; HARE *et al.*, 2013). O IRN tem como alvo primário a Topoisomerase I, expressa de forma ubíqua e, consequentemente, demonstra sérios efeitos colaterais com grande variabilidade interindividual. As toxicidades associadas ao IRN incluem mielossupressão (neutropenia) e distúrbios gastrointestinais (principalmente diarreia), que são reconhecidos como toxicidade limitante da dose para este medicamento (CASADÓ; SAGRISTÁ; MORA, 2018; GARCIA-CARBONERO; SUPKO, 2002).

O IRN é um pró-fármaco que possui um perfil farmacológico complexo e é extensamente metabolizado *in vivo*. O metabolismo no trato gastrointestinal ocorre em três etapas principais, começando com a conversão do IRN solúvel em água para gerar o potente metabólito SN-38 (7-etil-10-hidroxycamptotecina). Na segunda etapa,

o SN-38 é metabolizado em um glicuronídeo que pode ser exportado para o intestino e reativado à sua forma tóxica pela β -glicuronidase bacteriana onde pode ser reabsorvido. A reativação local do fármaco no trato intestinal é atribuída à sua toxicidade (CHEN *et al.*, 2013).

Esforços para identificar biomarcadores para determinar qual população de pacientes seria mais impactada ainda não foram bem-sucedidos. Consequentemente, plataformas alternativas para entrega são uma opção viável que pode incorporar a medicina de precisão ao sistema de entrega de medicamentos. Esta noção é ainda apoiada pelo perfil farmacocinético complexo do fármaco após administração intravenosa (RAYMOND *et al.*, 2002). O SN-38 tem efeitos antitumorais 100 a 1000 vezes mais potentes, no entanto, após a administração intravenosa de IRN livre, menos de 5% do IRN é convertido em SN-38, principalmente no fígado. A forma mais ativa da camptotecina contém uma configuração de lactona aberta, que é formada por uma reação de esterificação na presença da enzima carboxil esterase. A carboxil esterase está presente em todos os tecidos, incluindo tumores e é mais proeminente em ambientes ácidos (JANSEN *et al.*, 1997; TAKIMOTO; WRIGHT; ARBUCK, 1998). Nesse contexto, o perfil farmacocinético do IRN se beneficiaria muito de uma ferramenta que pudesse proteger e estabilizar o IRN e possibilitar sua conversão ao metabólito mais ativo mais especificamente no tecido tumoral.

Os sistemas de liberação de fármacos baseados em nanopartículas surgiram como ferramentas promissoras para alterar o perfil farmacocinético de drogas (PATRA *et al.*, 2018; RAYMOND *et al.*, 2002). Mais especificamente, estratégias de entrega de fármacos focadas na estabilização do anel de lactona do IRN para evitar sua inativação relatadas anteriormente, seriam indispensáveis para a manutenção de sua atividade. Os lipossomas são considerados um dos sistemas de liberação de fármacos mais promissores, projetados para encapsular uma ampla gama de fármacos e fornecer ferramentas adequadas para melhorar a eficácia dos quimioterápicos no tratamento do câncer (ALLEN; CULLIS, 2013; KRAFT *et al.*, 2014). Encapsular um fármaco em lipossomas é altamente vantajoso, pois pode melhorar sua farmacocinética, promover sua captação intracelular e permitir a entrega seletiva às células tumorais, muitas vezes resultando em diminuição dos efeitos colaterais

indesejáveis e aumento da dose máxima tolerada (DAWIDCZYK *et al.*, 2014; MADNI *et al.*, 2014).

Várias estratégias têm sido exploradas para melhorar a farmacocinética e direcionamento de formulações lipossomais para otimizar ainda mais a atividade/toxicidade de fármacos encapsulados (CASADÓ; SAGRISTÁ; MORA, 2018). Nosso grupo de pesquisa empregou com sucesso lipossomas sensíveis ao pH (SpHL) de longa circulação para o tratamento de vários tipos de tumores sólidos (CARLESSO *et al.*, 2016; DOS REIS *et al.*, 2021; FRANCO *et al.*, 2019, 2021; SILVA *et al.*, 2016). Até onde sabemos, descreveremos, pela primeira vez, o uso de lipossomas folatados pH-sensíveis encapsulados com IRN para o tratamento do câncer colorretal. Nossa abordagem baseia-se no conhecimento de que o ambiente tumoral normalmente tem um pH mais baixo do que os tecidos normais. Tais condições ácidas promoverão a captação celular de SpHL através da formação de endossomos e permitirão a liberação local de drogas direcionadas no tumor (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2016).

Além disso, o uso de nanopartículas, como lipossomas, também pode promover um aumento da especificidade da formulação para o tumor por meio da adição de marcadores moleculares de superfície para direcionamento e acúmulo no ambiente tumoral (LU; LOW, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2012). O folato, por exemplo, é uma molécula usada em diferentes ciclos metabólicos durante a síntese de aminoácidos para apoiar e promover o crescimento celular. O receptor de folato é superexpresso no ambiente tumoral, embora apenas minimamente distribuído nos tecidos normais, resultando em uma abordagem de direcionamento ideal. A funcionalização de lipossomas com folato é uma ótima estratégia de direcionamento de tumores que pode melhorar ainda mais o perfil farmacocinético e a potencial atividade antitumoral do fármaco (LOHADE *et al.*, 2016; SOE *et al.*, 2018).

Aqui, desenvolvemos um novo sistema lipossomal de entrega direcionada de fármacos como uma ferramenta para melhorar a eficiência da terapia antitumoral do IRN com baixo perfil de toxicidade. O desenvolvimento e caracterização de lipossomas folatados pH-sensíveis de liberação controlada encapsulados com IRN foi

realizado e investigado como um agente antitumoral promissor em um modelo murino de câncer colorretal.

5.2 Objetivos

5.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitumoral e segurança de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo irinotecano em modelo de tumor colorretal.

5.2.2. Objetivos específicos

- Preparar lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada encapsulando irinotecano.
- Caracterizar os lipossomas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta, teor de encapsulação.
- Avaliar a liberação do fármaco e estabilidade das formulações.
- Determinar a pH-sensibilidade das formulações.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* em animais portadores de tumor de adenocarcinoma colorretal.
- Avaliar a toxicidade sistêmica das formulações preparadas.

5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Materiais

O cloridrato de irinotecano tri-hidratado (IRN) foi doado pela EUROFARMA Laboratórios SA (São Paulo, Brasil). A dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e a diestearoilfosfatidiletanolamina polietilenoglicol 2000 (DSPE-PEG2000/DSPE-PEG-

FOL) foram fornecidas pela Lipoid GmbH (EUA). O hemisuccinato de colesterol (CHEMS) e o colesterol (CHOL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (St Louis, EUA). Todos os solventes (grau analítico de cromatografia líquida de alta eficiência) e demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). O modelo de tumor subcutâneo foi estabelecido em camundongos BALB/c fêmeas de 8–10 semanas de idade adquiridos do CEBIO-UFMG (Belo Horizonte, Brasil). Os animais foram mantidos sob condição SPF com acesso livre a comida e água padrão. Todos os estudos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (protocolo nº 102/2020).

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Preparação do lipossoma

Os lipossomas foram preparados de acordo com o método de hidratação do filme lipídico (BANGHAM; STANDISH; WATKINS, 1965), seguido de calibração de tamanho. Resumidamente, alíquotas de clorofórmio de DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000 (razão molar de 5,8:3,7:0,5, respectivamente; a concentração total de lipídios foi igual a 40 mM) ou DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000 e DSPE-PEG2000-Fol (razão molar de: 5,8:3,7:0,45:0,05, respectivamente; concentração lipídica total foi igual a 40 mM) foram transferidos para um frasco e o solvente foi removido a baixa pressão para preparar SpHL e SpHL-Fol, respectivamente. Alíquotas de solução de NaOH 0,1M foram adicionadas ao filme lipídico para promover a ionização completa das moléculas de CHEMS e, posteriormente, a formação de uma estrutura lamelar.

Em seguida, o filme lipídico foi hidratado com solução de sulfato de amônio 300mM, à temperatura ambiente, sob agitação vigorosa (FERREIRA *et al.*, 2017). Os lipossomas obtidos foram calibrados por extrusão utilizando membranas de policarbonato de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm, 5 ciclos por membrana, utilizando o extrusor Lipex Biomembranes, Modelo T001 (Vancouver, Canadá). Após, o sulfato de amônio do meio externo foi removido por ultracentrifugação (Ultracentrifuge Optima® L-80XP, Beckman Coulter, Brea, EUA) a $150.000 \times g$, 4°C, por 120 min. O pellet foi ressuspenso com solução de NaCl a 0,9% (p/v). Em seguida, uma solução de 10

mg/mL de IRN foi incubada com SpHL ou SpHL-Fol durante 2 h a 4°C, para permitir a encapsulação do IRN por gradiente de sulfato de amônio. O IRN não encapsulado foi removido por ultracentrifugação usando o mesmo método descrito acima.

5.3.2.2 Caracterização físico-química dos lipossomas

5.3.2.2.1 Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE)

O diâmetro médio dos lipossomas foi determinado por dispersão dinâmica de luz a 25°C a um ângulo de 90°. O potencial zeta foi avaliado pela determinação da mobilidade eletroforética em um ângulo de 90°. As medidas de tamanho e potencial zeta foram realizadas em triplicata usando o equipamento nano ZS90 Zetasizer (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas usando uma solução de NaCl a 0,9% (p/v). A eficiência de encapsulação (EE) do IRN em lipossomas foi determinada por HPLC, usando como fase móvel tampão fosfato: acenonitrila (70:30 v/v) + 0,2% (v/v) trietilamina (pH 2,5, ajustado com ácido fosfórico), e uma coluna de fase reversa C18 com detecção de fluorescência (370/470 nm, excitação/emissão respectivamente) (TARDI *et al.*, 2007).

5.3.2.2.2 Análise de rastreamento de nanopartículas

As medidas foram realizadas com o equipamento Nanosight NS300 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram preparadas após diluição em água ultrapura (mesma fase externa das formulações) e introduzidas na câmara de amostras do Nanosight com uma seringa descartável. As amostras foram medidas em temperatura ambiente por 60 segundos com detecção automática. A suspensão foi irradiada por uma fonte de laser e espalhamento de luz. As imagens foram capturadas por uma câmera de dispositivo de carga acoplada.

5.3.2.3 Estudo de liberação e pH-sensibilidade

A liberação do fármaco foi realizada por meio de diálise com membranas de celulose (MWCO12000 Da) em tampão HEPES-salina em dois pHs diferentes (pH 5 e 7,4).

Sacos de diálise contendo 500 µL de SpHL-IRN ou fármaco livre foram adicionados a frascos contendo 50 mL do tampão e mantidos sob agitação a 37°C. Aos 30 min, 1, 2, 4, 8 e 24 h, alíquotas de 1 mL do tampão foram coletados e o mesmo volume foi repostado para que a concentração da solução não variasse, a quantidade de IRN liberado foi então dosado por HPLC.

5.3.2.4 Microscopia confocal

Células tumorais de câncer de cólon murino CT26 foram semeadas em placas de 6 poços com lamínulas estéreis ($2,5 \times 10^5$ células/poço) 24 h antes do tratamento. As células foram expostas a uma solução de IRN, SpHL-IRN ou SpHL-IRN-FOL, a uma concentração de droga de 5µM, por 12 h. Após lavagem com PBS, as células foram fixadas com solução de formaldeído a 3,7% (v/v), as lâminas foram montadas com Prolong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific - Waltham, EUA). As células foram analisadas no “Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI/UFMG)” utilizando o microscópio LSM 880 com detector Airyscan (ZEISS - Oberkochen, Alemanha). Para aquisição das imagens, foram utilizadas uma lente objetiva de 63x e um laser de Diodo 370 nm (excitação de IRN). As imagens foram processadas usando o software ZEN Blue Edition versão 2.3 lite (ZEISS -Oberkochen, Alemanha).

5.3.2.5 Estudos *in vivo*

5.3.2.5.1 Cultura de células

As células CT26 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As células foram mantidas em ar humidificado (95%) contendo 5% de CO₂ a 37 ° C. Após 3-5 dias de cultura as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com Trypan Blue. Após centrifugação (5 min a 330 x g), as células foram ressuspensas em meio de cultura para inoculação nos camundongos BALB/c.

5.3.2.5.2 Inoculação de tumor

Alíquotas (100 µL) com $1,0 \times 10^6$ de células CT26 foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos BALB/c fêmeas. As células tumorais foram deixadas crescer *in vivo* durante 10 dias até os tumores atingirem, aproximadamente, 100 mm³.

5.3.2.5.3 Atividade antitumoral

Após o desenvolvimento do tumor, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n = 6 para cada grupo): solução salina (grupo controle); IRN livre; SpHL-IRN; e SpHL-IRN-FOL. A dose total de IRN em todos os grupos de tratamento foi de 120 mg/kg, dividida em 4 administrações (30 mg/kg), a cada 2 dias. Ao longo do estudo, os camundongos foram pesados e os tumores foram medidos com paquímetro a cada 2 dias, até o final do experimento (Dia 8) quando os camundongos foram sacrificados. Os volumes tumorais foram calculados a partir da fórmula:

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0,5$$

onde d_1 e d_2 , representam o menor e o maior diâmetro, respectivamente. A razão de inibição (IR) foi calculada no dia 8 (D₈), como se segue:

$$IR = 1 - \frac{(RTV \text{ médio do grupo tratado com drogas})}{(RTV \text{ médio do grupo controle})} \times 100$$

onde, RTV = Volume tumoral D₈/Volume tumoral D₀.

5.3.2.5.4 Estudo hematológico e bioquímico

Ao final do estudo, os animais foram eutanasiados imediatamente após a coleta de sangue total por punção do plexo braquial em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Os parâmetros hematológicos avaliados incluíram hemoglobina, número de glóbulos vermelhos, hematócrito, índices hemantimétricos, largura de distribuição de glóbulos vermelhos (RDW), contagem global e diferencial de leucócitos e número de plaquetas,

conforme descrito em nosso laboratório anteriormente para esses estudos (SILVA *et al.*, 2018).

O plasma foi obtido por centrifugação (3000 rpm, 15 min) e os parâmetros bioquímicos foram quantificados. A função renal foi avaliada através dos parâmetros de ureia e creatinina plasmáticas e a função hepática através da análise de aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (MIRANDA *et al.*, 2021).

5.3.2.5.5 Análise histológica

Ao final do estudo, os principais órgãos (tumor primário, intestino grosso, fígado e rins) foram excisados, incluídos em parafina e submetidos à coloração de hematoxilina-eosina (H&E) para análise de toxicidade (MIRANDA *et al.*, 2021).

5.3.2.6 Análise estatística

Todos os dados são expressos como média $\pm$ SD. As médias entre os diversos grupos foram comparadas por uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey (GraphPad PRISM, versão 6.0). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.4 Resultados

5.4.1 Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulamento (% EE)

O diâmetro médio, índice de polidispersidade, potencial zeta, % EE e a carga de droga das formulações lipossômicas são descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química de SpHL, SpHL-Fol, SpHL-IRN e SpHL-IRN-Fol.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	% EE	Carga de droga (mg/mL)
SpHL-branco	159,2 ± 3,9	0,09 ± 0,03	- 4,1 ± 0,6	-	-
SpHL-fol-branco	160,1 ± 4,0	0,09 ± 0,03	- 4,1 ± 0,6	-	-
SpHL-IRN	169,0 ± 6,0	0,12 ± 0,05	-11,1 ± 0,8	66,2 ± 3,0	6,6 ± 0,3
SpHL-FOL-IRN	165,2 ± 3,1	0,12 ± 0,08	-9,1 ± 1,2	62,3 ± 0,9	6,2 ± 0,1

Os dados são expressos pela média ($n=3$) $\pm$ DP da média. Todos os dados foram analisados por análise de variância ANOVA one-way seguida de pós-teste de Tukey. Os lipossomas se mostraram homogêneos ($PDI \leq 0,3$) com um diâmetro inferior a 200 nm. O potencial zeta esteve próximo da neutralidade para todas as formulações, o que pode ser benéfico por suas propriedades farmacocinéticas (HONARY; ZAHIR, 2013). Os resultados de DLS foram ainda validados por estudos de rastreamento de nanopartículas (Figura 9), nos quais uma população monodispersa foi encontrada com a maioria (90%) de partículas com até 155 nm de diâmetro.

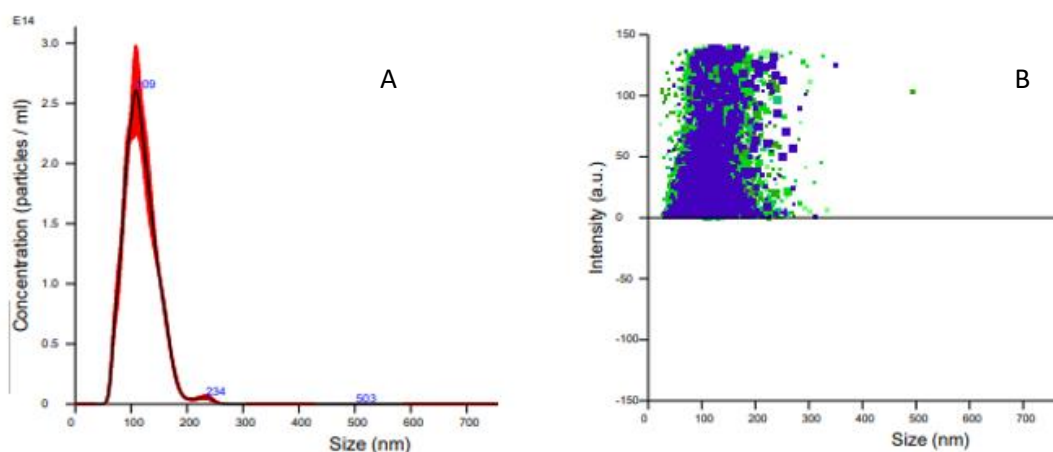


Figura 8 - Análise de rastreamento de nanopartículas de diâmetro médio (A) e distribuição de SpHL-IRN (B).

5.4.2 Estudos de liberação de drogas sensíveis a pH

A sensibilidade ao pH *in vitro* foi avaliada para SpHL-IRN e IRN livre em diferentes pHs (7,4 e 5,0) e os resultados são mostrados na Figura 9.

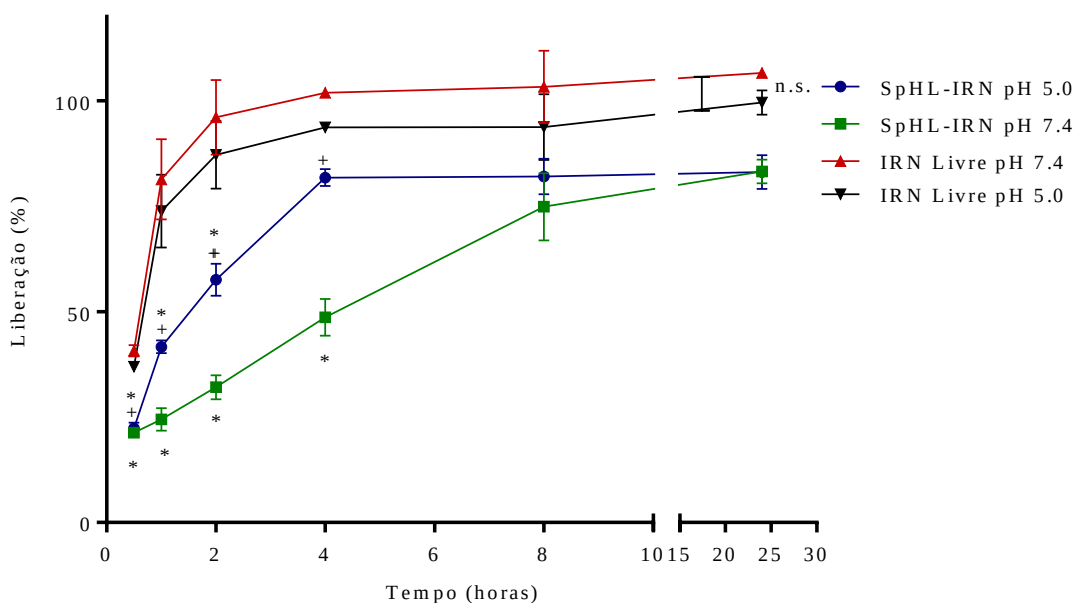


Figura 9 - Liberação de IRN em relação ao pH.

Nota: * $p < 0,05$ entre o IRN livre (pH 5 e pH 7); + $P < 0,05$ entre SpHL-IRN pH 7,4. Os dados são expressos pela média ($n=3$) $\pm$ DP. Todos os dados foram analisados por análise de variância ANOVA one-way seguida de pós-teste de Tukey.

O perfil de liberação percentual de SpHL-IRN em pH 7,4 e pH 5,0 é mostrado ao longo de 24 horas. A sensibilidade ao pH *in vitro* de SpHL-IRN foi avaliada em função do tempo em diferentes pHs (7,4 e 5,0).. Não foram observadas alterações estatísticas com o fármaco livre. No entanto, o IRN encapsulado em lipossomas apresentou uma liberação dependente do pH e do tempo demonstrando uma maior estabilidade e capacidade de retenção da nanopartícula (DRUMMOND *et al.*, 2006). Como visto na Figura 9, até o ponto de tempo de 30 min, o padrão de liberação de IRN encapsulado em SpHL é semelhante em ambos os pHs. No entanto, nos tempos de 1, 2 e 4 horas uma liberação mais acentuada da droga foi encontrada em pH 5,0, quando comparado com o pH 7,4 o que corrobora a hipótese de que uma redução do pH promove uma desestabilização do nanossistema, culminando em maior liberação do fármaco. Esses achados confirmam a sensibilidade ao pH para SpHL, o que pode

ser benéfico para a liberação de drogas no microambiente tumoral (SILVA *et al.*, 2016).

5.4.3 Microscopia confocal

Para validar a liberação de drogas e captação em células de câncer de cólon, realizamos microscopia confocal (Figura 10). O IRN foi visualizado intracelularmente, localizado principalmente nas regiões citoplasmáticas e perinucleares. Uma pequena captação nos núcleos pode ser observada para todos os grupos (IRN Livre, SpHL-IRN, SpHL-IRNFol) investigados. Esses resultados sugerem a entrega eficiente de IRN dentro da célula para todas as formulações no tempo avaliado (CASADÓ *et al.*, 2017).

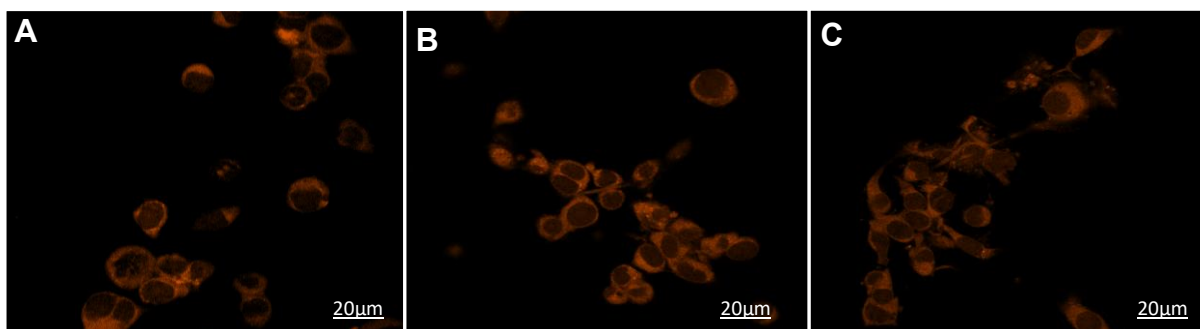


Figura 10 - IRN encapsulado em lipossomas é eficientemente absorvido em células de câncer de cólon. Imagens de microscopia confocal de células tumorais de câncer de cólon murino CT26 após 24 h de incubação com tratamentos A = IRN livre, B = SpHL-IRN ou C = SpHLIRN-Fol. (concentração de IRN 5µM). Amplificação de 63×.

5.4.4 Atividade antitumoral

A atividade antitumoral de preparações de IRN livre e lipossomal (SpHL-IRN e SpHLIRN-Fol) foi avaliada em camundongos BALB/c portadores de tumor CT26. As curvas de crescimento do volume tumoral (Figura 11A) tiveram perfis drasticamente diferentes entre os grupos. Os animais que receberam formulações lipossomais apresentaram volumes tumorais significativamente menores quando comparados aos grupos controle (salina e IRN livre), $p < 0,05$. Além disso, os animais que receberam formulação lipossomal funcionalizada com folato (SpHL-IRN-FOL) apresentaram volumes tumorais significativamente menores do que qualquer outro grupo, incluindo SpHL-IRN não funcionalizado. Esses dados suportam que o folato foi vantajoso no

direcionamento do tumor e na atividade antitumoral. A Figura 11B mostra os volumes tumorais no final do experimento para todos os grupos, confirmando a maior eficiência de SpHL-IRN-FOL no controle do crescimento tumoral.

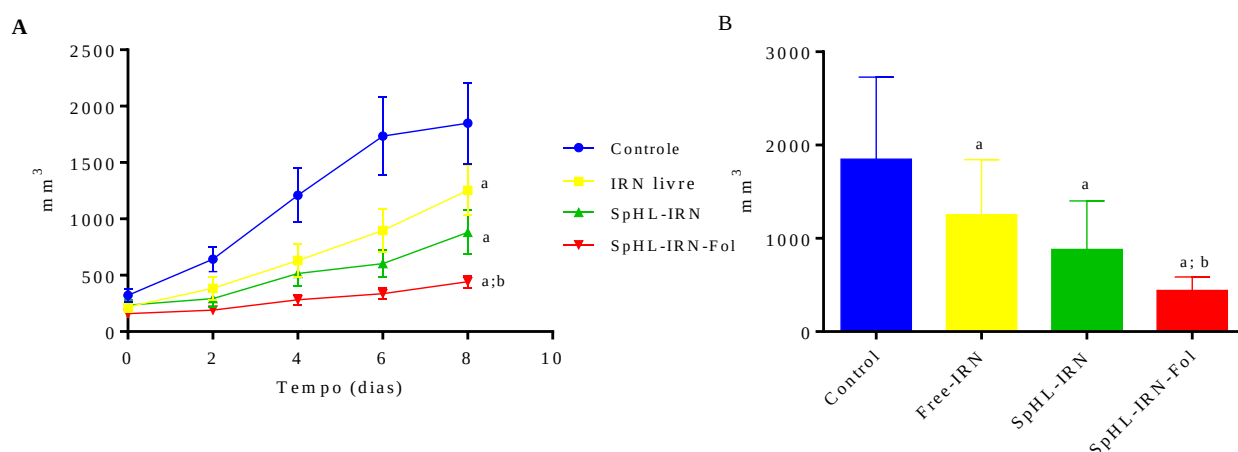


Figura 11 – Avaliação da atividade antitumoral de IRN livre e encapsulado. (A) Efeito antitumoral de SpHL (grupo controle), IRN, SpHL-irn e SpHL-IRN-FOL no crescimento tumoral de camundongos BALB/c fêmeas portadores de tumor de cólon CT26. Cada tratamento foi administrado por via intravenosa 4 vezes, a cada 2 dias, na dose de 30 mg/kg. (B) Volume tumoral no final dos experimentos, dia 8, após os tratamentos.

Nota: Os dados são expressos pela média $\pm$ desvio padrão da média ($n=7$). As curvas de crescimento foram analisadas por regressão. ^aRepresenta diferenças estatísticas ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. ^bRepresenta diferenças estatísticas ($P < 0,05$) em relação ao IRN livre.

A razão de inibição do volume tumoral (TV-IR), apresentada na **Tabela 2**, corrobora os dados apresentados nas curvas de crescimento tumoral. No geral, as formulações lipossomais foram mais eficazes na inibição do crescimento tumoral do que IRN livre ou solução salina. O tratamento com SpHL-IRN-FOL resultou numa inibição do crescimento tumoral ainda mais extensa quando comparado com SpHL-IRN (57,8 e 41,5%, respectivamente).

Tabela 2. Volume tumoral relativo (RTV) e razão de inibição do crescimento tumoral (IR) após administração de IRN livre, SpHL-IRN e SpHL-IRN-FOL.

Grupo de tratamento	RTV	RI (%)
IRN livre	5,9 $\pm$ 3,21	16,6
SpHL-IRN	4,1 $\pm$ 1,43	41,5
SpHL-IRN-FOL	2,9 $\pm$ 1,42 ^a	57,8

Nota: ^a representa diferença significativa em comparação com o IRN livre P-valores inferiores a 0,05 foram definidos como nível de significância (teste de Tukey). Dados expressos como média $\pm$ DP.

5.4.5 Estudo hematológico e bioquímico

Os parâmetros hematológicos do grupo controle (CTL) e camundongos tratados com IRN-livre, SpHL-IRN e SpHL-IRN-FOL são mostrados na Tabela 3. A contagem de hemácias e plaquetas, as concentrações de HGB e os valores de HCT foram semelhantes em todos os grupos e não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados aos do grupo controle. Além disso, não houve alteração na série de leucócitos para todos os grupos.

Tabela 3. Parâmetros hematológicos de camundongos controle tratados com 3 doses de formulações de IRN.

Parâmetros	Tratamentos			
	CTL	IRN-livre	SPHL-IRN	SpHL-IRN-FOL
RBC (célula/mm ³ x 10 ⁶)	4,9 ± 2,2	5,3 ± 1,0	5,7 ± 0,9	5,9 ± 0,5
Hemoglobina (g/L)	9,0 ± 4,7	8,3 ± 2,6	10,3 ± 2,2	11,0 ± 1,4
HCT (%)	25,1 ± 10,6	27,4 ± 5,3	28,8 ± 4,6	30,3 ± 2,5
WBC (célula/mm ³ x 10 ³)	6,5 ± 4,2	2,5 ± 1,0	3,1 ± 1,0	2,8 ± 1,0
Granulócitos (célula/mm ³ x 10 ³)	2,9 ± 1,9	1,2 ± 0,5	1,4 ± 0,5	1,2 ± 0,5
Não granulócito (célula/mm ³ x 10 ³)	3,56 ± 2,3	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6	1,5 ± 0,5
RDW (%)	14,9 ± 1,6	16,2 ± 1,3	16,1 ± 0,4	15,8 ± 1,0
PLT (célula/mm ³ x 10 ³)	261,2 ± 157,0	211,3 ± 78,5	276,4 ± 55,9	233,5 ± 78,3

Nota: A avaliação dos parâmetros hematológicos foi realizada 8 dias após o tratamento dos camundongos com as formulações de IRN. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Abreviaturas: HGB (hemoglobina), RBC (glóbulos vermelhos), HCT (hematócrito), PLT (plaquetas), WBC (glóbulos brancos totais).

Os parâmetros bioquímicos indicativos de toxicidade renal (ureia e creatinina séricas) e hepática (ALT e AST) não apresentaram alterações significativas entre os grupos. Esses resultados são consistentes com a ausência de alteração histológica que foi observada no tecido renal e hepático dos camundongos tratados com diferentes formulações contendo IRN, o que confirma que o tratamento nas doses utilizadas, como esperado, não causou alta toxicidade (Figura 12A-D). Além disso, foram feitas medições de peso corporal para avaliar a toxicidade geral das formulações administradas. Não foram encontradas alterações significativas no peso corporal após administração terapêutica em nenhum dos grupos investigados ($p > 0,05$) (Figura 12E).

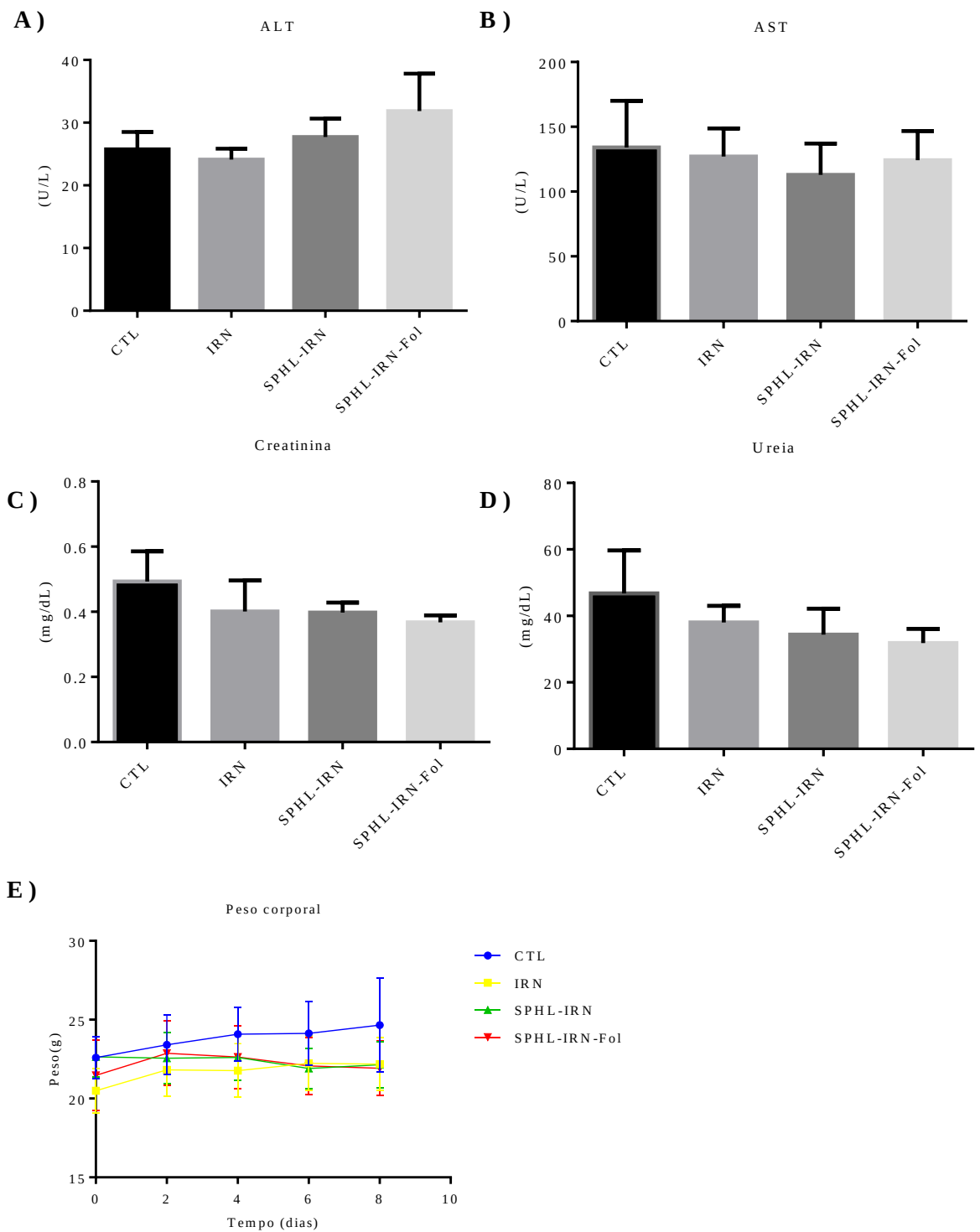


Figura 12 - Avaliação da toxicidade no rim e no fígado. Parâmetros bioquímicos de camundongos controle e tratados com 4 doses de formulações de IRN foram avaliados quanto à toxicidade renal (**A** e **B**), toxicidade hepática (**C** e **D**) e peso corporal (**E**).

Nota: A avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada 8 dias após o tratamento dos camundongos com as formulações de IRN. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Abreviaturas: ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase).

5.4.6 Análise histológica

Ambos os tecidos tumorais e normais foram avaliados por histologia para pesquisa de necrose e metástase. A análise histológica de tumores de câncer colorretal é apresentada na Figura 13. O tratamento com IRN livre, SpHL-IRN ou SpHL-IRN-FOL mostrou necrose extensa devido à morte celular induzida por IRN (Fig 13F; 13G e 13H, respectivamente). Os tecidos do fígado e do intestino grosso foram avaliados quanto ao aparecimento de metástases (Figura 14), no entanto, não foram encontrados focos metastáticos nos tecidos avaliados.

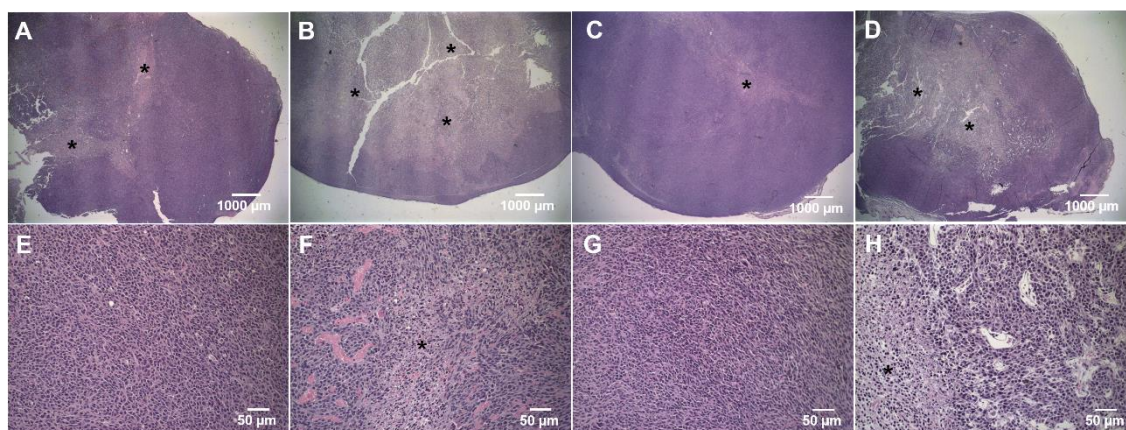


Figura 13 - Análise histopatológica da necrose tumoral. Cortes histológicos de tumor primário de camundongos BALB/c fêmea portadores de tumor colorretal CT26 tratados com IRN livre, SpHL-IRN ou SpHL-IRN-FOL corados por hematoxilina e eosina. (A) grupo controle na amplificação de 2x. (B) Tratado com IRN livre na amplificação de 2x. (C) SpHL-IRN tratado com amplificação de 2x. (D) SpHL-IRN-FOL tratado com amplificação de 2x. (E) grupo controle na amplificação de 20x. (F) Tratado com IRN livre na amplificação de 20x. (G) SpHL-IRN tratado com amplificação de 20x. (H) SpHL-IRN-FOL tratado com amplificação de 20x. Os asteriscos pretos indicam áreas de necrose tumoral.

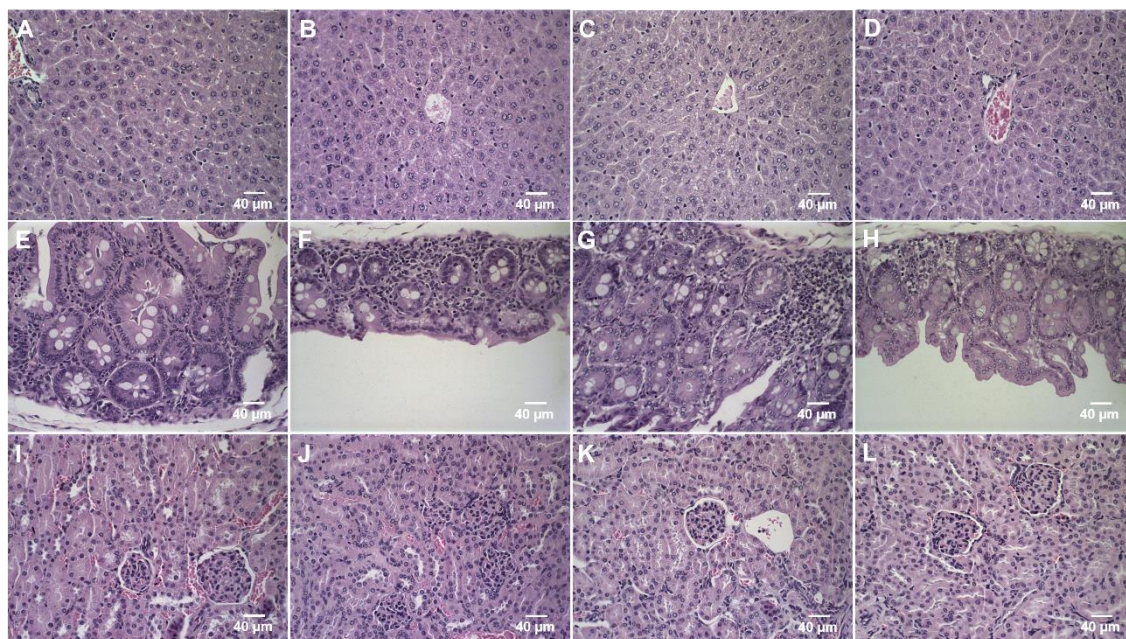


Figura 14 - Análise histopatológica da toxicidade hepática e intestinal. Cortes histológicos de tecidos de camundongos BALB/c fêmea portadores de tumor colorretal CT26 tratados com IRN livre, SpHL-IRN ou SpHL-IRN-FOL corados por hematoxilina e eosina. (A) Fígado do grupo controle. (B) Fígado tratado com Fre-IRN. (C) Fígado tratado com SpHL-IRN. (D) Fígado tratado com SpHL-IRN-FOL. (E) Intestino Grosso do grupo controle. (F) Intestino grosso tratado com IRN livre. (G) Intestino grosso tratado com SpHL-IRN. (H) Intestino grosso tratado com SpHL-IRN-FOL. (I) Rim do grupo controle. (J) Rim tratado com IRN livre. (K) Rim tratado com SpHL-IRN. (L) Rim tratado com SpHL-IRN-FOL. Ampliação de 40x.

5.5 Discussão

As terapias sistêmicas convencionais para o tratamento do câncer consistem principalmente em drogas antineoplásicas que, em geral, apresentam baixa especificidade e alta toxicidade, o que limita a dose que pode ser administrada ou o número de ciclos quimioterapêuticos que um paciente necessita ser submetido. Nas últimas décadas, com novos entendimentos das características moleculares dos tumores e seu microambiente, o foco da pesquisa em terapia anticâncer mudou para incluir abordagens mais especializadas e direcionadas (AL-MAHMOOD *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2015). Dentre essas estratégias, o uso de sistemas nanoestruturados de liberação de drogas tem tido um profundo impacto na pesquisa terapêutica do câncer. Uma ampla gama de nanomateriais surgiu como ferramentas alternativas que podem direcionar os quimioterápicos aos locais do tumor com eficácia terapêutica aprimorada. Entre os materiais versáteis disponíveis, os lipossomas têm sido amplamente empregados como transportadores inteligentes capazes de modificar a

biodistribuição, metabolismo e eliminação *in vivo* de fármacos (FENSKE; CULLIS, 2008; GHOSH *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2016).

Sabe-se que a atividade antitumoral é diretamente proporcional à concentração intracelular dos fármacos/metabólitos ativos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2016) e sua toxicidade está correlacionada com a quantidade de fármaco distribuída aos tecidos fora do alvo. Assim, um carreador de fármaco ideal deve ser especificamente absorvido pelo tumor e permitir a internalização do fármaco nas células tumorais enquanto reduz a captação do fármaco pelo tecido saudável. A capacidade de projetar lipossomas para serem sensíveis ao pH e promover o direcionamento ativo do tumor o torna um candidato atraente como nanocarreador de fármacos. A resposta ao pH dos lipossomas pode ser atribuída à presença de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) na bicamada de lipossomas. Uma vez que o DOPE por si só não é capaz de formar uma estrutura lamelar, é necessário o uso de agentes estabilizantes como o hemisuccinato de colesterol (CHEMS) para a formação de uma estrutura lipossômica. Em pH fisiológico, CHEMS é ionizado e inserido entre as moléculas de DOPE resultando em repulsões eletrostáticas entre os grupos carboxila ionizados de CHEMS e grupos fosfato de DOPE, resultando na formação de uma bicamada lipossomal. Em contraste, em pH mais baixo, CHEMS é protonado promovendo desestabilização da estrutura lipossomal e consequentemente liberação do fármaco. Uma vez que o microambiente do tumor é mais ácido do que o tecido saudável circundante, obtém-se um sistema direcionado e otimizado, resultando em ação otimizada do fármaco (ALLEN; CULLIS, 2013; DE BARROS *et al.*, 2011, 2015; SILVA *et al.*, 2016). Além de suas propriedades fusogênicas ideais, a inclusão de moléculas de direcionamento na superfície lipossomal, como o ácido fólico, pode levar a um aumento da capacidade de direcionamento do tumor e da eficácia quimioterapêutica (de BARROS *et al.*, 2011). Com tudo isso em mente, foram desenvolvidos lipossomas sensíveis ao pH com capacidade de direcionamento de tumores, encapsulados com um quimioterápico, IRN, para melhorar a resposta terapêutica no câncer colorretal.

No presente estudo, os lipossomas (SpHL-IRN-Fol e SpHL-IRN) foram sintetizados com sucesso com diâmetro de vesícula semelhante e monodisperso em todas as formulações. Os lipossomas foram obtidos com diâmetro inferior a 200 nm, o que

permite seu extravasamento para o tecido tumoral por efeito EPR (MÜLLER *et al.*, 2000). SpHL-IRN-Fol e SpHL-IRN apresentaram potencial zeta neutro devido à presença de DSPE-PEG2000 na composição lipídica do lipossoma. A presença de cadeias de PEG na superfície do lipossoma produz uma camada hidrofílica e reduz sua mobilidade eletroforética resultando em um potencial zeta próximo da neutralidade (NUNES *et al.*, 2019). Isso é importante porque, uma vez na corrente sanguínea, nanopartículas convencionais e partículas carregadas negativamente podem ser opsonizadas e massivamente eliminadas por fagocitose por células imunes e removidas da circulação sistêmica e, conseqüentemente, evitar a entrega efetiva do nano fármaco aos órgãos, enquanto que nanopartículas com carga superficial próximo à neutralidade possuem circulação prolongada (CHENG *et al.*, 2009).

Drogas citotóxicas encapsuladas em lipossomas são normalmente incapazes de agir em seus alvos terapêuticos ou causar toxicidade até que sejam liberadas dos limites do transportador e, portanto, a entrega de fármacos lipossomais pode ser considerada uma estratégia de pró-fármacos (DRUMMOND *et al.*, 2013). Embora a ativação local do IRN para SN-38 ainda não tenha sido demonstrada, as carboxilesterases têm ampla distribuição em diferentes tipos de tumores e são ativas nos macrófagos, onde os lipossomas são capturados principalmente (DRUMMOND *et al.*, 2006, XU *et al.*, 2002; VAN ARK-OTT *et al.*, 1998). Assim, a capacidade de liberação do fármaco mediada por lipossomas no tecido desejado é extremamente importante. Os lipossomas sensíveis ao pH apresentaram maior liberação do conteúdo lipossomal em pH ácido quando comparado ao pH fisiológico. Isso é vantajoso para alcançar o equilíbrio ideal entre a absorção no tumor e a proteção do tecido fora do alvo, especialmente quando a droga encapsulada é considerada uma pró-droga. A sensibilidade ao pH permitiu que o IRN fosse liberado somente após atingir os locais do tumor onde pode ser ativado localmente (HAN *et al.*, 2009).

Como o IRN é um pró-fármaco e geralmente é ativado uma vez dentro das células, sua internalização é extremamente importante. No entanto, apenas alguns estudos relataram a localização subcelular de derivados de camptotecina e os resultados publicados são heterogêneos. Aqui, as imagens de microscopia confocal demonstraram a presença de IRN no meio intracelular em todos os grupos avaliados,

o que confirma que a encapsulação em formulações lipossomais não comprometeu a capacidade do IRN de ser internalizado pelas células tumorais.

O modelo de camundongo BALB/c portador de tumor colorretal CT26 é um modelo animal experimental comumente usado para estudar a angiogênese e a atividade antitumoral de várias formulações farmacêuticas (KISHIMOTO *et al.*, 2013). Modelos de implantação heterotópica, como implantes tumorais subcutâneos em camundongos, têm sido tradicionalmente usados para avaliar o tratamento antitumoral devido à sua reprodutibilidade e monitoramento da formação do tumor (CASTLE *et al.*, 2014; KISHIMOTO *et al.*, 2013). Nossos resultados demonstraram rápido crescimento tumoral no grupo controle. Embora o tratamento com IRN seja potencialmente ativo contra células tumorais colorretais CT26 *in vivo*, uma taxa de crescimento tumoral muito alta ainda foi observada em animais que receberam IRN livre corroborando dados da literatura (SHINOHARA *et al.*, 2000). No entanto, o encapsulamento da droga em lipossomas aumentou sua atividade antitumoral. Mais importante, o direcionamento ativo de lipossomas com a presença de ácido fólico contribuiu positivamente para os efeitos antitumorais. Volumes tumorais significativamente menores foram encontrados para animais administrados com SpHL-IRN-FOL quando comparados a todos os outros grupos investigados. Esse grupo apresentou a maior taxa de inibição (57,8%), que teve eficiência antitumoral cerca de 3,4 vezes maior do que a droga livre. A inibição do crescimento tumoral comparável foi relatada anteriormente para lipossomas revestidos com folato, destacando a eficiência do uso de direcionamento de folato (SRIRAMAN *et al.*, 2016). A análise histológica do tecido tumoral apresentou características morfológicas semelhantes entre os grupos com áreas centrais de necrose e proliferação de células pleomórficas na periferia infiltradas por leucócitos (Figura 14) (SILVA *et al.*, 2019). No entanto, a análise histológica do tumor primário mostrou maiores áreas de necrose no grupo tratado com SpHL-IRN-FOL quando comparado a todos os outros grupos investigados. Esses dados deixam claro que não apenas o encapsulamento da droga, mas também a sensibilidade ao pH e o direcionamento ativo aumentaram muito a atividade antitumoral. De fato, alguns estudos mostraram que os lipossomas direcionados com folato tiveram um importante papel na superação da resistência aos medicamentos devido ao desvio da bomba de efluxo da glicoproteína P (GABIZON *et al.*, 2003; GOREN *et al.*, 2000). Gabizon *et al.* (2003) também descreveram que a entrega lipossomal direcionada a FR pode reverter a resistência à

doxorrubicina. Como os modelos tumorais heterotópicos não possuem microambientes tumorais totalmente desenvolvidos, são necessários mais estudos em modelos tumorais mais clinicamente relevantes, como modelos ortotópicos, para melhor avaliação do impacto positivo do direcionamento ativo na eficácia antitumoral.

Vale ressaltar que nenhuma toxicidade sistêmica aparente foi encontrada em nenhum dos grupos investigados. As medições do peso corporal, bem como os testes hematológicos e bioquímicos (hepáticos e renais) não revelaram toxicidade aguda às formulações de lipossomas. Ao todo, nossos resultados indicam o potencial do nosso lipossoma encapsulando IRN como um sistema alternativo de entrega de drogas para câncer colorretal (BOEING *et al.*, 2021; JUANG *et al.*, 2019).

5.6 Conclusão

Neste estudo, desenvolvemos e caracterizamos um sistema lipossomal de liberação de drogas sensível ao pH e revestido com folato contendo IRN (SpHL-IRN-FOL) para o tratamento do câncer colorretal. Esta nova formulação multifuncionalizada demonstrou ter uma atividade antitumoral significativamente melhor do que o IRN livre, sem evidência de toxicidade. Esses dados suportam o desenvolvimento pré-clínico adicional de SpHL-IRN-FOL como um sistema de liberação de drogas promissor para o tratamento do câncer colorretal.

6 CAPÍTULO 2

PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE LIPOSSOMAS FOLATADOS pH-SENSÍVEIS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA CONTENDO 5-FLUOROURACIL E IRINOTECANO PARA O TRATAMENTO DO CANCER COLORRETAL

6.1 Introdução

Apesar do contínuo desenvolvimento de drogas quimioterápicas nos últimos anos, o câncer permanece entre as doenças humanas mais mortais, sendo o câncer colorretal o segundo em número de mortes. Os protocolos de tratamento em geral empregam uma combinação de fármacos, que apresentam melhor resposta, mas principalmente menor índice de resistência quando comparado a monoterapia. Porém esses agentes antitumorais possuem efeitos tóxicos significativos, que muitas vezes podem levar à interrupção do tratamento. Existem vários protocolos para o tratamento do CCR que dependem do estágio e da identificação de marcadores genéticos que podem melhorar a resposta ao tratamento. Um dos protocolos muito utilizado é a combinação 5-FU/leucovorina e IRN principalmente para o CCR metastático (XIE *et al.*, 2020). Porém, como quase todos os protocolos convencionais disponíveis, ainda possuem baixa especificidade e elevada toxicidade, limitando a dose utilizada.

Nas últimas décadas, a fim de otimizar a farmacoterapia do câncer baseadas em características moleculares e do microambiente tumoral, novas estratégias baseadas em sistemas nanoestruturados de direcionamento de fármacos e terapias alvo vem sendo introduzidas aos esquemas terapêuticos convencionais (KHAN, *et al.*, 2015; AL-MAHMOOD *et al.*, 2018). Dentre estas estratégias, destacam-se os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada. Estudos prévios constataram que estes nanossistemas são vantajosos por reduzir de forma significativa a toxicidade de moléculas bioativas, além de potencializar a captação pelo tecido tumoral (LEITE *et al.*, 2012a; SOARES *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2018).

É sabido que a atividade antitumoral está associada a concentração do componente ativo no interior das células, sendo interessante favorecer a internalização dos fármacos. Devido as propriedades fusogênicas dos SpHL observou-se incremento da atividade atitumoral *in vitro* e *in vivo* de diversos quimioterápicos (SILVA *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2018). Além disso, uma alternativa de funcionalização que tem se destacado muito é o uso de agentes de direcionamento, como o folato, para tumores que surperexpressam o seu receptor, e dessa forma podem aumentar ainda mais a concentração do fármaco no sítio de interesse em relação aos tecidos sadios.

O uso de lipossomas multifuncionalizados é uma nova abordagem para uma terapia mais direcionada, e essa estratégia se torna especialmente importante para combinação de substâncias bioativas, uma vez que além de aumentarem sua concentração no sítio de interesse, diminuem drasticamente as eventuais diferenças de farmacocinética dos fármacos na forma livre, e com isso potencializam a atividade terapêutica. Por isso, acreditamos que a formulação com a combinação de IRN e 5-fu seja eficiente para melhorar a resposta ao tratamento do câncer colorretal.

6.2 Objetivos

6.2.1 Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade antitumoral de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo 5-fluorouracil e irinotecano.

6.2.2 Objetivos específicos

- Preparar lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada co-encapsulando 5-fluorouracil e irinotecano.
- Caracterizar os lipossomas quanto ao tamanho, índice de polidispersão, morfologia, potencial zeta e teor de encapsulação
- Avaliar o perfil de liberação e a pH-sensibilidade das formulações lipossomais contendo 5-fluorouracil e irinotecano.

- Avaliar a atividade antitumoral das formulações lipossomais contendo irinotecano e 5-fluorouracil *in vivo* em animais portadores de tumor de adenocarcinoma colorretal.
- Avaliar a toxicidade sistêmica das formulações contendo irinotecano e 5-fluorouracil.

6.3 Material e métodos

6.3.1 Material

O cloridrato de irinotecano triidratado e o 5-fluoruracila foram doados pela EUROFARMA Laboratórios SA (São Paulo, Brasil). Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), distearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol2000 (DSPE-PEG-2000), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foram adquiridos da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Membranas de policarbonato foram adquiridas da Millipore (Billerica, EUA). Hemissuccinato de colesterila (CHEMS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES), ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA), 6-maleimida ácido hexanóico foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil).

6.3.2 Métodos

6.3.2.1 Preparo dos lipossomas

6.3.2.1.1 Co-encapsulação de 5-fluorouracil e irinotecano

Os lipossomas foram constituídos por DOPE, CHEMS e DSPE-PEG2000, preparados segundo a técnica de hidratação do filme lipídico (BANGHAM, 1965), seguido de calibração do tamanho por extrusão. Alíquotas clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-PEG2000, concentração lipídica total de 40mM, (razão molar 5,8:3,7:0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo para a formação

do filme lipídico pela evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

Após a obtenção do filme lipídico, foi adicionada quantidade suficiente de solução de NaOH 0,1 M para promover a completa ionização das moléculas de CHEMS e então, o filme foi hidratado com solução de 8mg/mL de 5-fluorouracil em sulfato de amônio 300 mM, pH 7,4, a temperatura ambiente e sob agitação vigorosa. Os lipossomas obtidos foram calibrados mediante 5 ciclos de extrusão em membranas de policarbonato de 0,4 μ m, 0,2 μ m e 0,1 μ m, utilizando o extrusor Lipex Biomembranes, modelo T001 (Vancouver, Canadá). Após a etapa de calibração do tamanho das vesículas, o excesso de sulfato de amônio e o 5-FU não-encapsulado foram removidos por ultracentrifugação (ultracentrífuga Optima® L-80XP, Beckman Coulter, EUA) a 150.000 g, 4 °C, por 120 min. Após o ciclo de ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* reconstituído com água ultrapurificada mantendo-se a concentração lipídica de 40 mM, obtendo-se assim uma dispersão de lipossomas de 5-FU.

Para a incorporação do irinotecano à formulação, foi utilizado o método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio. À dispersão de lipossomas de 5-FU, foi adicionada solução de cloridrato de irinotecano 10mg/mL e a mistura resultante foi mantida sob-refrigeração (4°C) por 2 horas. Em seguida, as dispersões de lipossomas foram purificadas por ultracentrifugação utilizando-se os mesmos parâmetros citados anteriormente. O *pellet* resultante foi ressuspenso em água ultrapurificada mantendo-se a concentração lipídica de 40 mM.

6.3.2.1.2 Lipossomas de 5-FU

Foram preparados lipossomas de 5-FU com modificação do lípide estrutural, para isso o DOPE foi substituído pelo DPPC. Alíquotas dos lípidos DPPC, CHEMS e DSPE-PEG2000, concentração lipídica total de 40mM, (razão molar 5,8:3,7:0,5, respectivamente) foram adicionadas a um balão de fundo redondo e a mesma metodologia citada anteriormente foi utilizada para o preparo dessa formulação.

6.3.2.2 Caracterização físico-química

6.3.2.2.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

O diâmetro médio e o índice de polidispersão dos lipossomas foram determinados por espectroscopia de correlação de fótons, a 25 °C, utilizando um ângulo de 90°. O potencial zeta foi determinado por mobilidade eletroforética associada à espectroscopia de correlação de fótons. As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram diluídas em salina pH 7,4 na proporção de 1:100 e as medidas realizadas em triplicata.

6.3.2.2.2 Análise de rastreamento de nanopartículas

O tamanho e concentração das partículas foi medido utilizando as propriedades de espalhamento de luz e movimento browniano. As medidas foram realizadas utilizando o equipamento Nanosight NS300 (Malvern Instruments, Inglaterra). As amostras foram preparadas após diluição em água ultrapura (mesma fase externa das formulações) e introduzidas na câmara de amostras do Nanosight com uma seringa descartável. Foram registrados 10 vídeos de 60 segundos para cada amostra, a uma temperatura de 25 ° C e um *threshold* de 7.

6.3.2.3 Quantificação dos fármacos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

6.3.2.3.1 5-FU

A quantificação do 5-FU foi realizada por meio de HPLC. Foi utilizada uma coluna ACE® C18 4,6 mm x 250 mm, 5 µm (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha) e pré-coluna do mesmo fabricante. A fase móvel foi constituída por solução de acetonitrila/água (10/90) e 1% de ácido fosfórico. O volume de injeção foi de 20 µL, com tempo de corrida de 6,0 minutos, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1mL/minuto. Os produtos da eluição foram quantificados no comprimento de onda igual a 266 nm. Foi utilizada uma curva de calibração para obtenção da equação da reta e esta foi utilizada para a determinação da concentração das amostras eluídas.

Para a quantificação do 5-FU nas formulações lipossomais, a membrana lipídica foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:2 (v/v) e, em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente até atingir uma concentração teórica de 5-FU igual a 100 ng/mL. A quantidade de 5-FU foi determinada antes e após a ultracentrifugação dos lipossomas e o teor de encapsulação (TE) foi calculado de acordo com a equação 1:

$$TE(\%) = \frac{[5 - FU] \text{ após ultracentrifugação}}{[5 - FU] \text{ antes da ultracentrifugação}} \times 100 \quad (1)$$

6.3.2.3.2 IRN

Para quantificação do IRN foi utilizada uma coluna idêntica à do item anterior. A fase móvel foi constituída de tampão fosfato:acetonitrila (70:30 v/v) + 0,2% v/v trietilamina, pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico. O volume de injeção de 10 µL, com tempo de corrida de 8,0 minutos, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,0 mL/minuto. Os produtos da eluição foram quantificados por fluorescência nos comprimentos de onda de 370/470 nm, excitação e emissão respectivamente. Foi utilizada uma curva de calibração para obtenção da equação da reta e esta utilizada para a determinação da concentração das amostras eluídas.

Para a quantificação do IRN nas formulações lipossomais, a membrana lipídica foi rompida com álcool isopropílico na proporção 1:2 (v/v), e, em seguida, a preparação foi diluída com o sistema eluente até atingir uma concentração teórica de IRN igual a 1µg/mL. A quantidade de IRN foi determinada antes e após a ultracentrifugação e o teor de encapsulação (TE) foi calculado de acordo com a equação 2.

$$TE(\%) = \frac{[IRN] \text{ após ultracentrifugação}}{[IRN] \text{ antes ultracentrifugação}} \times 100 \quad (2)$$

sendo que TE significa teor de encapsulação.

6.3.2.4 Estudo de liberação *in vitro*

O estudo foi conduzido empregando a técnica de diálise em tampão HEPES-salina (pH 7,4) utilizando membranas de celulose (MWCO12000 Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil). Sacos de diálise contendo 500 µL de formulação lipossomal ou do fármaco livre foram adicionados a frascos contendo 50 mL de tampão HEPES-Salina e mantido sob agitação a 37 °C em agitador orbital termostatizado (KS 4000i, IKA – Campinas, Brasil). Nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas, aliquotas de 1mL do tampão foram coletados e o mesmo volume foi repostado para não variar a concentração da solução e a quantidade do fármaco liberado foi analisada por HPLC. A porcentagem de liberação foi calculada de acordo com a equação 3:

$$\%liberação = 100 - \left(\frac{[\%]5 - FU \text{ ou } IRN \text{ liberado}}{[\%]5 - FU \text{ ou } IRN \text{ total}} \times 100 \right) \quad (3)$$

6.3.2.5 Estudos *in vivo*

6.3.2.5.1 Cultura de células

As células CT26 foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). As células foram mantidas em ar humidificado (95%) contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Após 3-5 dias de cultura as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular foi avaliada após coloração com Trypan Blue. Após centrifugação (5 min a 330 x g), as células foram ressuspensas em meio de cultura para inoculação nos camundongos BALB/c.

6.3.2.5.2 Inoculação das células tumorais

Alíquotas (100 µL) com 1,0 x 10⁶ de células CT26 foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos BALB/c fêmeas (6 a 8 semanas). As células tumorais foram deixadas crescer *in vivo* durante 10 dias até os tumores atingirem,

aproximadamente, 100 mm³. Os estudos em animais foram previamente aprovados pela CEUA sob o número de protocolo 102/2020.

6.3.2.5.3 Atividade antitumoral

Após o desenvolvimento do tumor, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de tratamento (n = 7 para cada grupo): solução salina (grupo controle); IRN livre; SpHL-IRN-FOL e mistura de SpHL-IRN-FOL + LIP-5-FU-FOL. A dose total de IRN em todos os grupos de tratamento foi de 120 mg/kg, dividida em 4 administrações (30 mg/kg), a cada 2 dias. A dose total de 5-FU foi 48 mg/kg em 4 administrações de 12mg/kg, seguindo o mesmo intervalo. Ao longo do estudo, os camundongos foram pesados e os tumores foram medidos com paquímetro a cada 2 dias, até o final do experimento (Dia 8) quando os camundongos foram sacrificados. Os volumes tumorais foram calculados a partir da fórmula:

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0,5$$

onde d_1 e d_2 , representam o menor e o maior diâmetro, respectivamente. A razão de inibição (IR) foi calculada no dia 8 (D₈), como se segue:

$$IR = 1 - \left(\frac{RTV \text{ médio do grupo tratado com formulações contendo 5-FU ou IR}}{RTV \text{ médio do grupo controle}} \right) \times 100$$

onde, $RTV = \text{Volume tumoral } D_8 / \text{Volume tumoral } D_0$

6.3.2.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média. A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de hipótese através do teste t-Student no caso de dados paramétricos e teste de Mann-Whitney no caso de dados não-paramétricos. Para todas as análises foi adotado o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor a 0,05 ($p < 0,05$).

6.4 Resultados

6.4.1 Preparo e caracterização das formulações

6.4.1.1 Quantificação do 5-FU por HPLC

A figura 15 mostra a curva de calibração empregada para quantificação do fármaco:

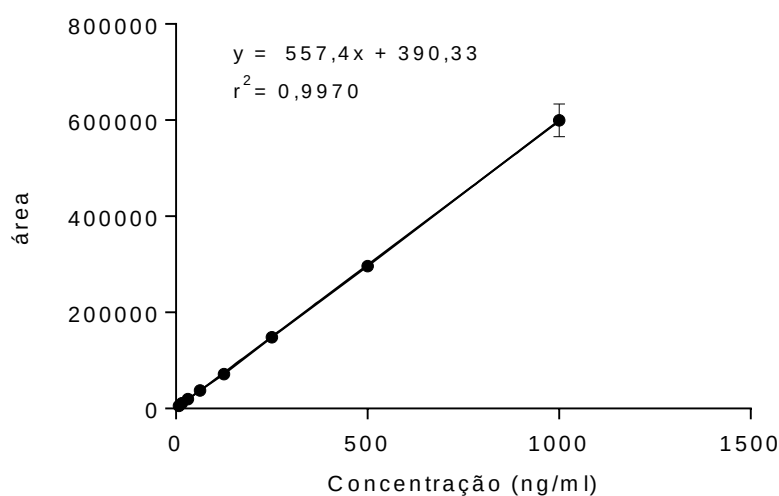


Figura 15 - Curva de calibração para quantificação do 5-FU

Nota: Todos os dados foram expressos como média ($n=3$) $\pm$ desvio padrão da média

A análise de r^2 (0,9970) do gráfico permite concluir que há uma pequena variabilidade entre as medidas para cada concentração de 5-FU, consequentemente, o método se ajusta bem para prever as concentrações de amostras desconhecidas. Portanto, a partir da curva de calibração foram determinadas as concentrações do fármaco nas diferentes formulações lipossomais.

6.4.1.2 Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE) das formulações SpHL-5-FU

Foram preparadas várias formulações contendo quantidade variáveis de fármaco e lípide para determinar os parâmetros para maior eficiência de encapsulação. Os valores de diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (IP), potencial zeta

das vesículas e a porcentagem de encapsulação das preparações lipossomais estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Caracterização química e físico-química de SpHL-FOL e do SpHL-5-FU-FOL em diferentes concentrações do fármaco.					
Formulação	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	% Encapsulação	Carga de droga (mg/mL)
SpHL branca	139 ± 4	0,09 ± 0,03	- 4,1 ± 0,6	-	-
5FU	Concentração lipídica 20mM				
1mg/ml	139 ± 8	0,11 ± 0,06	-9,0 ± 1,1	10,8 ± 1,5	0,1 ± 0,02
5FU	Concentração lipídica 40mM				
1mg/ml	146 ± 8	0,12 ± 0,07	-9,0 ± 1,0	17,8 ± 2,5	0,2 ± 0,03
2 mg/ml	147 ± 6	0,10 ± 0,05	-9,1 ± 0,9	17,7 ± 3,1	0,3 ± 0,06
4mg/ml	151 ± 7	0,10 ± 0,04	-9,4 ± 0,8	14,9 ± 2,1	0,6 ± 0,08
8mg/ml	143 ± 8	0,11 ± 0,05	-9,4 ± 0,9	14,1 ± 2,3	1,1 ± 0,10
10mg/ml	145 ± 9	0,12 ± 0,09	-9,5 ± 0,9	8,5 ± 3,1	0,9 ± 0,03

Nota: Todos os dados foram expressos como média (n=3) ± desvio padrão da média.

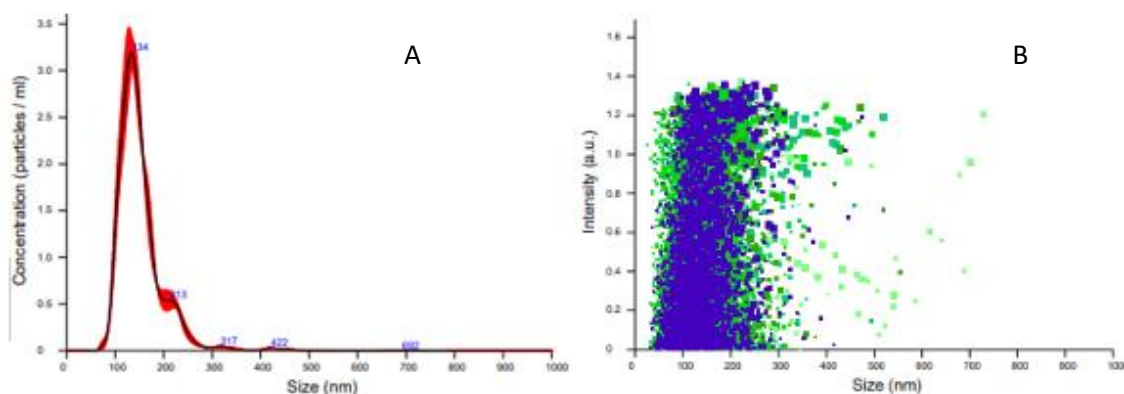


Figura 16 - Distribuição do diâmetro (A) e quantificação das partículas de SpHL-5-FU-FOL por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Os resultados mostraram que todas as formulações preparadas tiveram parâmetros físico-químicos adequados para uma administração parenteral e a encapsulação do 5-FU não alterou os parâmetros dos lipossomas brancos. O diâmetro médio reduzido, menor que 150 nm, para todas as formulações e população monodispersa (IP inferior a 0,3), foi semelhante para ambos os métodos de análise de tamanho empregados. A aplicação de nanossistemas como carreadores de fármacos para sítios tumorais requer a administração de vesículas de pequeno diâmetro (normalmente inferiores a 200 nm), visto que os lipossomas se utilizam das fenestrações existentes na neovasculatura dos tumores para extravasar nessa região e, consequentemente, gerar uma maior acumulação no sítio tumoral (FERRARI, 2005; CHO *et al.*, 2008).

Ao analisar a concentração do fármaco em relação a concentração molar dos lípides foi possível perceber um aumento na porcentagem de encapsulação de 5-FU para a formulação de 40 mM em relação a de 20 mM, por isso a formulação com maior conteúdo lipídico foi escolhida para a continuidade dos estudos.

Também avaliou-se a quantidade de fármaco que poderia ser encapsulada no interior do lipossoma a medida que aumentava-se a concentração da solução de 5-FU. A partir dos resultados foi possível perceber que até a concentração de 8 mg/mL foi observado um aumento gradual da carga de 5-FU encapsulado nos lipossomas, porém essa quantidade foi reduzida na concentração de 10 mg/mL, o que pode ser devido a saturação da solução do fármaco no interior do lipossoma.

6.4.1.3 Quantificação de irinotecano por HPLC

Para quantificação de IRN por HPLC foi construída uma curva de calibração (Figura 17).

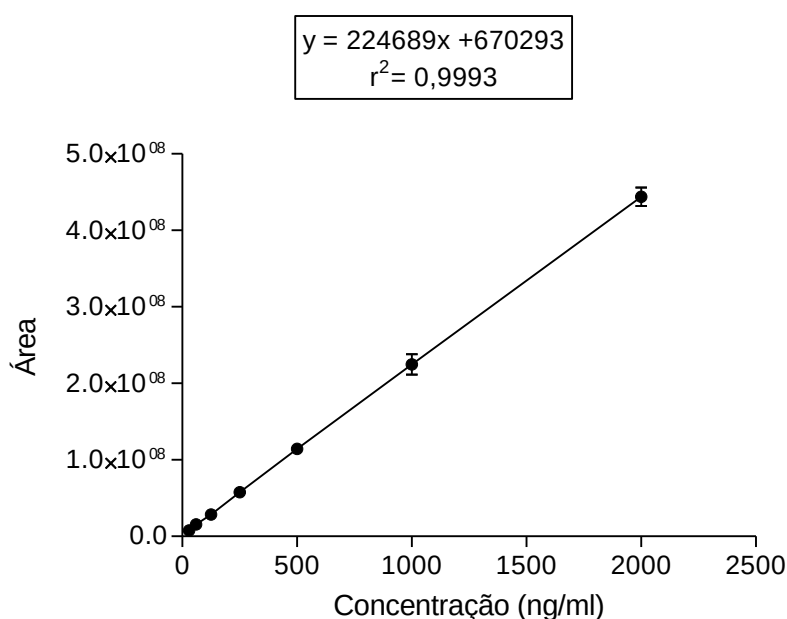


Figura 17 - Curva de calibração para quantificação do IRN.

Nota: Todos os dados foram expressos como média (n=3) $\pm$ desvio padrão da média.

A curva de calibração para o IRN apresentou resultados satisfatórios, adequada linearidade e valores de coeficiente de determinação dentro do preconizado, portanto, considera-se que esse método é adequado para quantificar a concentração de IRN em amostras lipossomais.

6.4.1.4 Distribuição de tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação (% EE) das formulações SpHL-IRN-FOL

Os parâmetros de diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação para a formulação de IRN com concentração de 10mg/mL está descrito na tabela 5:

Tabela 5. Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de encapsulação do IRN					
Formulação	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	% Encapsulação	Carga de droga (mg/mL)
SpHL-IRN-FOL	175 $\pm$ 8	0,11 $\pm$ 0,07	- 11,6 $\pm$ 0,9	66,0 $\pm$ 1,9	6,6 $\pm$ 0,2

Nota: Todos os dados foram expressos como média (n=3) $\pm$ desvio padrão da média.

SpHL-IRN-FOL apresentou diâmetro médio de aproximadamente 170 nm e índice de polidispersão $<0,3$, o que indica que a formulação lipossomal apresenta parâmetros adequados para administração endovenosa, conforme descrito no item 7.1.2. O potencial zeta de SpHL-IRN-FOL foi moderadamente negativo ($-11,6$ mV), o que pode contribuir para a estabilidade da formulação. O método de encapsulação ativa por gradiente de sulfato de amônio mostrou ser eficiente para a encapsulação de IRN na formulação lipossomal (66,0%). A fase externa desse método foi também avaliada a fim de verificar qual seria capaz de proporcionar maior eficiência de encapsulação, sendo observado que a mais adequada foi a água ultrapurificada. As formulações foram incubadas por 2 horas em temperatura de geladeira para permitir a encapsulação do IRN (SILVA *et al.*, 2018), os resultados foram satisfatórios para permitir os estudos posteriores e evidenciaram que o processo se mostrou uniforme e reproduzível para as diferentes concentrações de IRN após a escolha do meio adequado para a encapsulação.

6.4.2 Co-encapsulação

Uma vez preparado os lipossomas dos fármacos na forma isolada, iniciamos o processo de encapsulação dos dois fármacos em um único nanossistema, a fim de verificar o impacto da co-encapsulação nos parâmetros químicos e físico-químicos dos lipossomas e sua na capacidade de encapsulação. A tabela 6 mostra os resultados de diâmetro médio, IP, potencial zeta e porcentagem (%) de encapsulação desses lipossomas:

Tabela 6. Caracterização físico-química do SpHL-5-FU/IRN-FOL e porcentagem de encapsulação.					
Formulação	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidispersão (IP)	Potencial Zeta (mV)	% de Encapsulação	Carga de droga (mg/mL)
SpHL-5-FU/IRN-FOL	175 $\pm$ 8	0,11 $\pm$ 0,07	- 11,6 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 1,7 (5-FU)	0,9 $\pm$ 0,1
				66,0 $\pm$ 1,9 (IRN)	6,6 $\pm$ 0,2

Nota: Todos os dados foram expressos como média (n=3) $\pm$ desvio padrão da média.

Os resultados de co-encapsulação mostraram que não houve alteração significativa nos parâmetros físico-químicos do lipossoma, em relação aos valores encontrados para os lipossomas dos fármacos na forma isolada. Observou-se somente a redução do teor de encapsulação do 5-FU, em média de 15% para 9,5%. Isso pode ser justificado porque o processo de encapsulação ativa do IRN submete a formulação contendo o 5-FU a uma etapa de diluição adicional que poderia induzir à liberação do fármaco.

6.4.3 Estudos de liberação

6.4.3.1 5-FU

Após o preparo dos lipossomas e quantificação dos fármacos foi avaliado a liberação do conteúdo lipossomal *in vitro* empregando tampão Hepes em pH 7,4. Como objetiva-se a administração endovenosa das formulações lipossomais, torna-se necessário avaliar a capacidade de manutenção do fármaco no interior das vesículas após imersão em meio aquoso. Em relação a liberação do 5-FU, a figura 18 mostra o resultado das formulações encapsuladas, sendo que foram avaliadas diferentes diluições a fim de verificar esse efeito sob a liberação do fármaco.

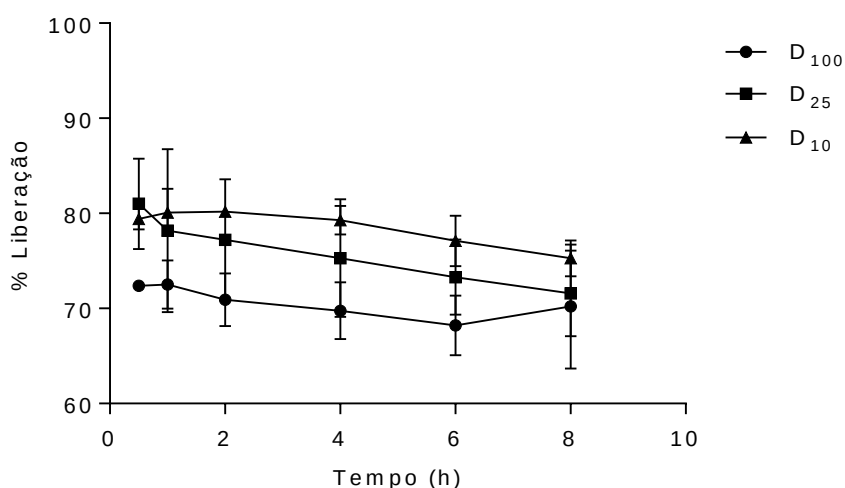


Figura 18 - Avaliação do perfil de liberação do 5-FU encapsulado empregando-se diferentes diluições da formulação em tampão HEPES-salina pH 7,4.

Nota: D₁₀₀ – corresponde a diluição de 100 vezes; D₂₅ – corresponde a diluição de 25 vezes; D₁₀ – corresponde a diluição de 10 vezes. Todos os dados foram expressos como média (n=3) ± desvio padrão da média.

A liberação do 5-FU encapsulado (isoladamente e com o IRN) foi similar à do fármaco livre. Foi possível perceber uma liberação quase que imediata de quase todo o conteúdo lipossomal, cerca de 85% desde o primeiro tempo avaliado (30 minutos) e essa concentração permaneceu praticamente constante até o final do experimento. Esse estudo foi realizado com o emprego de diferentes diluições da formulação lipossomal SpHL-5-FU-FOL (10, 25 e 100x), e em todas elas o teor de liberação do 5-FU permaneceu praticamente constante em todos os tempos avaliados. Isso nos permitiu concluir que o fármaco difunde imediatamente para o meio exterior quando é diluído. Dessa maneira, visando preparar uma formulação lipossomal que apresente uma membrana mais rígida, realizamos a substituição do DOPE por DPPC no preparo de lipossomas contendo 5-FU. Essa formulação possuiria o potencial de favorecer a retenção do fármaco na preparação lipossomal devido a maior temperatura de transição de fase principal do DPPC

6.4.3.2 Lipossomas de DPPC

6.4.3.2.1 Preparo e caracterização

Os parâmetros de diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação para diversas formulações de 5-FU estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. Diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de encapsulação do 5-FU

Formulações	Diâmetro Médio (nm)	Índice de Polidisperssão (IP)	Potencial Zeta (mV)	% de Encapsulação	Carga de droga (mg/mL)
LIP (DPPC)5-FU	135 ± 8	0,09 ± 0,07	- 9,6 ± 1,9	15,5 ± 4,17	1,2 ± 0,33

Nota: Todos os dados foram expressos como média (n=3) ± desvio padrão da média

Pode-se perceber que a substituição do fosfolípide não alterou os parâmetros físico-químicos e químicos dos lipossomas, uma vez que os valores do diâmetro, IP,

potencial zeta e teor de encapsulação mantiveram semelhantes. O tamanho reduzido dos lipossomas é desejável para a sua administração endovenosa, sendo, portanto, adequado o resultado obtido.

6.4.3.2.2 Estudo de liberação de 5-FU

Avaliou-se a liberação do 5-FU a partir de LIP (DPPC)5-FU empregando como meio o tampão HEPES pH 7,4. e na figura 19 estão apresentados os resultados desse perfil de liberação até o tempo de 24h.

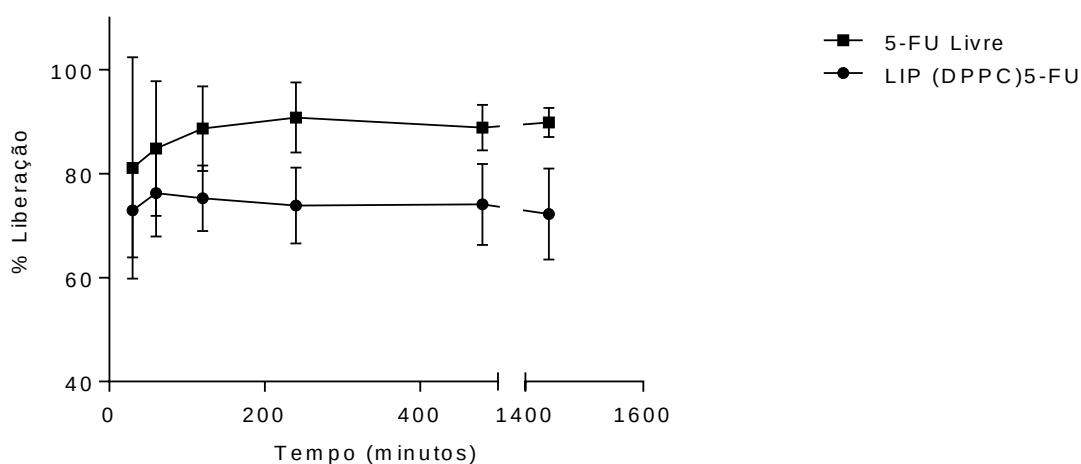


Figura 19 - Avaliação do perfil de liberação do 5-FU encapsulado em LIP (DPPC)5-FU

Nota: Todos os dados foram expressos como média ($n=3$) $\pm$ desvio padrão da média

Nesse estudo foi avaliado se a membrana de diálise permitiria a passagem do fármaco livre e foi constatada a passagem de todo o 5-FU (concentração de 1,2mg/ml) nos primeiros tempos do estudo. Os resultados mostraram uma liberação de cerca de 40% do 5-FU encapsulado no primeiro tempo avaliado (10 minutos). A partir de 30 min, mais de 70% do 5-FU contido nos lipossomas foi liberado e até o tempo de 24 horas essa porcentagem permaneceu praticamente inalterada.

6.4.3.2.3 Estudo de liberação de IRN

O perfil de liberação de IRN a partir das formulações SpHL-IRN e SpHL-5-FU/IRN está representado na Figura 20. Para ambas as formulações lipossomais com IRN, o fármaco foi sendo liberado gradativamente até o tempo de 8h com cerca de 80% do conteúdo lipossomal liberado e até o tempo de 24h praticamente não se observou liberação adicional significativa. Como o IRN é uma pró-droga e é convertida em seu metabólito ativo, SN-38, por carboxiesterases presentes principalmente no fígado e intestino, o fato de a formulação lipossomal ter um perfil de liberação lenta quando em meio aquoso nos permite sugerir que, junto com um maior tempo de circulação, as formulações lipossomais contendo IRN têm uma maior probabilidade de alcançar o sítio de interesse e apresentarem uma maior atividade antitumoral. Além disso, esse direcionamento à região de interesse pode permitir a administração de menores doses do fármaco com mesmo efeito antitumoral e com menor ocorrência de efeitos adversos (TARDI *et al.*, 2006; ADIWIJAYA *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o controle realizado com a diálise de solução de IRN livre apresentou a sua passagem pela membrana até o tempo de 2 horas, o que indica que a mesma é adequada para a avaliação do estudo de liberação de IRN a partir das formulações lipossomais.

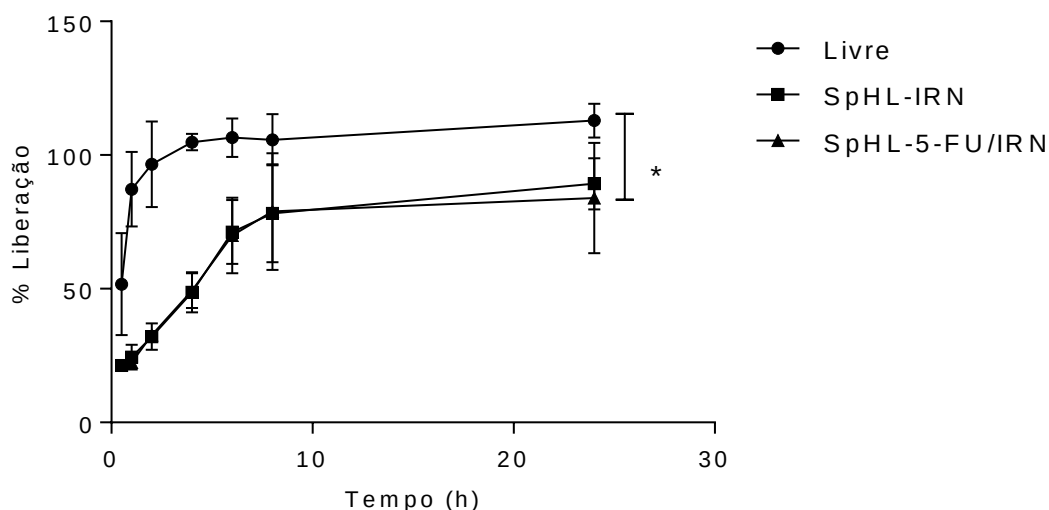


Figura 20 - Avaliação do perfil de liberação do IRN encapsulado em SpHL-IRN-FOL ou em SpHL-5-FU/IRN-FOL. Todos os dados foram expressos como média ($n=3$) $\pm$ desvio padrão da média. *Representa diferença significativa ($p<0,05$) entre as formulações lipossomais de IRN e o fármaco livre em todos os tempos avaliados. Todos os dados foram analisados por análise de variância ANOVA seguido por teste de Tukey.

6.4.3.3 Estudos de atividade antitumoral *in vivo*

A atividade antitumoral de preparações de IRN livre, SpHL-IRN-FOL e mistura de SpHL-IRN-FOL + SpHL-5-FU-FOL foi avaliada em camundongos BALB/c portadores de tumor colorretal CT26 e os resultados de avaliação do volume tumoral estão apresentados na Figura 21.

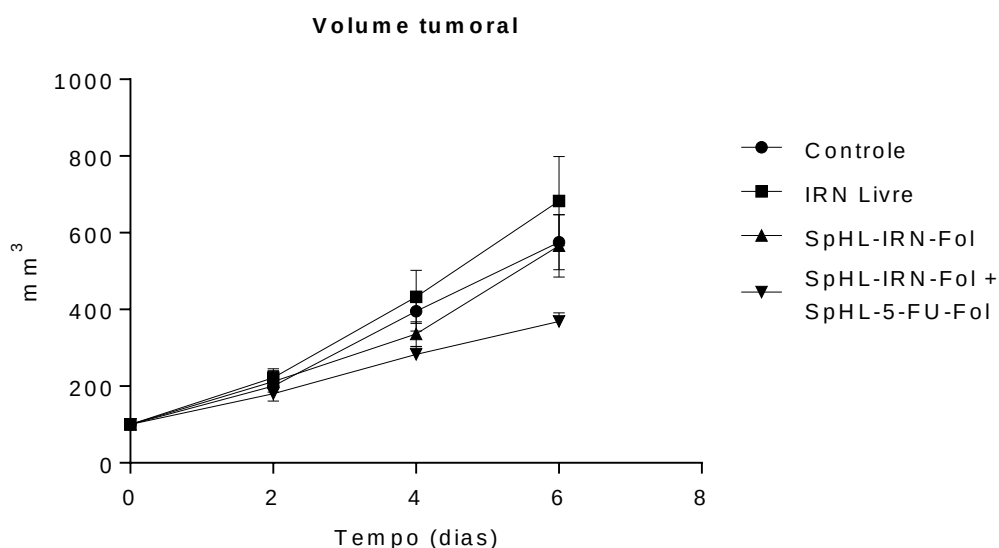


Figura 21 - Avaliação do volume tumoral em modelo murino de câncer colorretal tratado com injeção intravenosa de salina (grupo controle); IRN Livre; SpHL-IRN-Fol e mistura SpHL-IRN-Fol + SpHL-5-FU-Fol

Foi realizado um estudo para verificar se o acréscimo de 5-FU à formulação lipossomal de IRN provocaria um ganho em atividade antitumoral, assim como ocorre em protocolos de tratamento disponíveis (XIE *et al.*, 2020;) e em alguns estudos empregando lipossomas com esses quimioterápicos (TARDI *et al.*, 2009, HARASYM *et al.*, 2007). Os resultados preliminares mostraram que os grupos de animais tratados com IRN livre e SpHL-IRN-Fol apresentaram um crescimento tumoral semelhante aos animais tratados com salina. No entanto, foi observado um menor volume tumoral para os animais tratados com a mistura de SpHL-IRN-Fol e SpHL-5-FU-Fol após 8 dias do início do tratamento. Consideramos esses resultados preliminares porque foi detectada uma contaminação das células CT26 por micoplasma, mas não tivemos tempo hábil para a aquisição de novas células para a confirmação desses resultados.

Os valores da variação dos pesos dos animais após as 4 doses de tratamento foram equivalentes para os grupos avaliados.

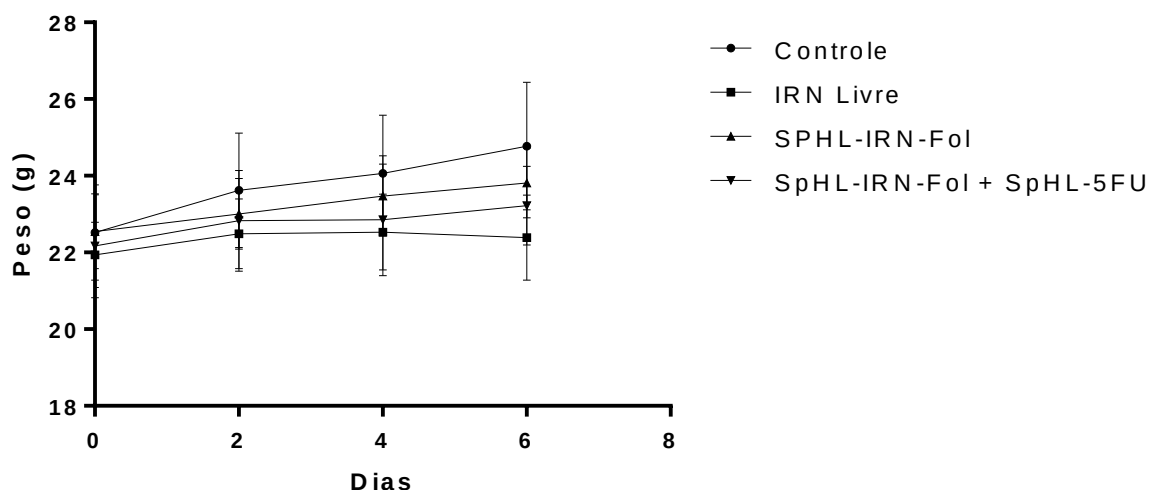


Figura 22 - Avaliação do peso corporal dos animais após administração endovenosa de salina (grupo controle); IRN Livre; SpHL-IRN-FOL e SpHL-IRN-FOL + SpHL-5FU-Fol).

6.5 Discussão

O câncer colorretal é um dos tumores mais letais, cerca de um quarto de todos os pacientes diagnosticados apresentam doença metastática e aproximadamente metade desenvolverá metástases no decorrer do tratamento (SIEGEL *et al.*, 2019; SONBOL *et al.*, 2019). O tratamento do câncer colorretal metastático avançado é realizado atualmente mediante o emprego de quimioterapia citotóxica com a adição de um imunoterápico com o objetivo de prolongar a sobrevida enquanto preserva ou melhora a qualidade de vida (VAN *et al.*, 2009). Em geral, a razão para empregar a terapia combinada é que, primeiro, quando vários fármacos com diferentes alvos moleculares são aplicados, o processo de adaptação ao câncer, como mutações celulares, que leva à resistência ao tratamento pode ser retardado. E segundo lugar, quando vários fármacos têm como alvo a mesma via celular poderiam funcionar sinergicamente para maior eficácia terapêutica e maior seletividade do alvo. (SONBOL *et al.*, 2019). Porém, os regimes de combinação atualmente disponíveis muitas vezes limitam-se à administração de dois ou mais fármacos anticancerígenos que podem ter incompatibilidades físico-químicas ou diferenças farmacocinéticas que dificultariam o

efeito sinérgico dos fármacos. Apesar do ganho terapêutico, geralmente o emprego de vários quimioterápicos leva a um aumento dos efeitos adversos, e com isso o uso de nanocarreadores vem sendo uma estratégia encontrada para reduzir esses problemas a partir da co-encapsulação de quimioterápicos.

Como já descrito existem vários protocolos de tratamento para o câncer colorretal, sendo a combinação de 5-FU e IRN amplamente empregada, porém eles ainda apresentam elevada toxicidade além de altos níveis de resistência. Por isso o emprego de lipossomas contendo esses dois fármacos é uma excelente estratégia para melhorar a resposta terapêutica. Existem diversos estudos empregando lipossomas para melhorar a atividade antitumoral e/ou reduzir os efeitos adversos da quimioterapia do câncer colorretal (HARE *et al.*, 2013; LE *et al.*, 2017; CASADÓ *et al.*, 2018), e neste trabalho empregamos lipossomas multifuncionalizados como ferramenta para aumentar a concentração e liberação dos fármacos no tecido tumoral.

Os lipossomas preparados com 5-FU e IRN e encapsulados isoladamente ou combinados apresentaram parâmetros físico-químicos adequados, como diâmetro reduzido, distribuição de tamanho homogênea, com IP menor que 0,3. Quanto a encapsulação, considerando os resultados para o IRN, que foi encapsulado de forma ativa pelo gradiente de sulfato de amônio, os índices foram adequados com mais de 60% de encapsulação e com boa reprodutibilidade. Em relação ao 5-FU que foi encapsulado passivamente, o baixo teor de encapsulação encontrado pode ser esperado, já que o método de hidratação do filme lipídico empregado para drogas hidrofílicas depende da capacidade dos lipossomas de aprisionar a solução contendo a droga dissolvida durante a formação da vesícula. A eficácia da captura (geralmente <30%) é limitada pelo volume capturado nos lipossomas, pela solubilidade da substância e também pela capacidade dos lipossomas em manterem a substância na cavidade aquosa (ABRAHAM *et al.*, 2005).

Uma alternativa para um maior percentual de encapsulação seria o emprego de outro método de preparo dos lipossomas. Partindo-se do princípio que drogas solúveis em água que possuem funções amina protonáveis podem ser ativamente aprisionadas pelo uso de gradientes de pH, o que pode resultar em uma eficácia de captura próxima de 100%, essa poderia ser uma solução para o problema apresentado. Porém,

especificamente para esse trabalho, não foi possível empregar essa estratégia, uma vez que para maior eficiência de encapsulação do 5-FU seria necessário manter um pH básico no interior do lipossoma (COSTA *et al.*, 2003; CAMACHO *et al.*, 2017). No entanto, como objetiva-se encapsular ativamente o IRN sequencialmente, a presença de pH básico no interior das vesículas poderia comprometer a atividade antitumoral do IRN. Isso se deve ao fato de que a forma farmacologicamente ativa do IRN (anel lactônico) depende de pH ácido para se manter estável, portanto para esse caso, não seria adequado encapsular o 5-FU por gradiente de pH. Apesar disso, com o método passivo empregado, a concentração de 5-FU encapsulada nos lipossomas encontrada foi compatível com a dosagem do fármaco empregada em alguns protocolos clínicos disponíveis (SBC, 2011; Cancer Care Ontario, 2019).

Porém, os lipossomas preparados contendo 5-FU não se mostraram capazes de reter o fármaco em seu interior. Isso foi constatado ao conduzir o estudo de liberação, em que se pôde perceber uma rápida liberação do 5-FU nos primeiros minutos do estudo. Como o 5-FU é um fármaco com pequeno peso molecular (130,077 g/mol), podemos inferir que ele é capaz de difundir por esse tipo de membrana com extrema facilidade e, portanto, teria uma circulação sanguínea semelhante ao fármaco livre.

Considerando, que a meia-vida do 5-FU livre na circulação é bastante curta, em média de 10 a 20 minutos (CHENG *et al.*, 2012), muitas vezes é necessária a administração de uma dose elevada de fármaco para uma boa resposta ao tratamento e essa alta dosagem consequentemente pode levar ao aparecimento de efeitos adversos graves que podem requerer a interrupção do tratamento ou redução da dose. Esse problema por si só justifica o emprego de lipossomas de 5-FU, uma vez que o uso de lipossomas possibilita uma circulação mais prolongada do fármaco encapsulado e uma maior concentração do 5-FU no tecido tumoral comparado ao fármaco livre. Entretanto, os resultados de liberação constataram uma liberação abrupta do 5-FU em diferentes diluições e meios. À vista disso, levando-se em consideração que após administração endovenosa em camundongos há uma diluição da formulação de cerca de 10 vezes, podemos inferir que nos estudos *in vivo* o 5-FU previamente encapsulado teria biodistribuição semelhante ao fármaco livre. Consequentemente, não se justifica a encapsulação, porque não haveria ganho no tempo de circulação ou na capacidade

do fármaco em alcançar o sítio de interesse, portanto, o método e/ou tipo de lipossoma não se mostrou adequado para carrear o 5-FU seletivamente para a região tumoral.

Para tentar resolver o problema da liberação do 5-FU uma alternativa seria o preparo de lipossomas com a membrana um pouco mais rígida e, portanto, menos permeável ao fármaco encapsulado. Uma alternativa é mudança do lípide estrutural, de DOPE para DPPC. Isso porque a temperatura de transição de fase principal desses lipídeos é bem diferente, enquanto a do DOPE é 20°C a do DPPC é 41°C. Em relação aos lipídeos citados, o DPPC não possui insaturações diferentemente do DOPE e, portanto, as interações entre os grupos das cadeias carbônicas para o primeiro lípide são mais intensas e promovem essa diferença na T_c e que por sua vez afetam a fluidez e permeabilidade da membrana. (LI *et al.*, 2015)

Considerando o exposto, na temperatura corporal, a presença do DPPC faz com que a membrana lipossomal se torne mais rígida e por sua vez menos permeável ao fármaco encapsulado em relação aos lipossomas constituídos por DOPE, o que poderia possibilitar a manutenção do 5-FU no interior dos lipossomas após administração endovenosa. Os resultados mostraram que a porcentagem de encapsulação do 5-FU foi um pouco maior que em relação ao lipossoma de DOPE, porém sem diferença estatística e os estudos de liberação também tiveram resultados semelhantes aos anteriores. Entretanto, existem estudos promissores na literatura com lipossomas de DPPC encapsulando o 5-FU (SAEED *et al.*, 2019). Handali *et al.* 2018 mostraram que lipossomas de DPPC/CHOL funcionalizados tiveram maior citotoxicidade *in vitro* em diversas linhagens celulares e maior eficiência em reduzir o crescimento tumoral que o 5-FU livre. Além disso, o estudo também avalia a influência do DPPC na porcentagem de encapsulação do 5-FU, e constatou-se que uma maior concentração do lípide aumenta a encapsulação do fármaco em lipossomas o que corrobora a relevância da utilização de DPPC no preparo de lipossomas de 5-FU.

Como já comentado, o 5-FU é muito permeável à membrana lipossomal e por isso a encapsulação e manutenção do fármaco nos lipossomas de forma efetiva é um processo complexo e a escolha do método e da composição lipídica é crucial para o sucesso da encapsulação. Essa dificuldade é descrita em alguns artigos (WANG *et al.*, 2022) e reforçada pelo fato de que, apesar do 5-FU ser o principal agente empregado no tratamento do CCR, não há formulação aprovada para comercialização

com lipossomas ou nanoformulações em geral, apesar de existirem diversas pesquisas que se baseiam nessa abordagem. O mesmo acontece para lipossomas contendo IRN, a única formulação lipossomal aprovada (Onivyde®) não obteve bons resultados no tratamento do CCR, devido aos elevados níveis de resistência e é usada apenas para o câncer de pâncreas metastático e ainda com associação com outros quimioterápicos (LIU *et al.*, 2019). Esses resultados reforçam a importância da condução de estudos para o preparo de formulações que melhorem a atividade antitumoral dos quimioterápicos empregados no tratamento do CCR.

Considerando que existem estudos na literatura com resultados positivos com a combinação de fármacos em lipossomas diferentes ou mesmo com um fármaco encapsulado e o outro na forma livre acreditamos que um estudo piloto *in vivo* poderia nos dar alguma resposta a respeito da potencialidade das formulações lipossomais contendo 5-FU e IRN preparadas. Como já descrito, o estudo *in vivo* demonstrou resultados promissores, já que a formulação com os dois fármacos parece ser capaz de controlar o crescimento tumoral.

6.6 Conclusão

Os estudos permitiram a encapsulação do 5-FU em lipossomas que apresentaram parâmetros físico-químicos adequados para a administração endovenosa. Apesar da baixa porcentagem de encapsulação de 5-FU, a concentração obtida é compatível com alguns protocolos farmacoterapêuticos. Porém, devido a elevada permeabilidade do fármaco o método inicialmente escolhido para a encapsulação não foi adequado para o seu aprisionamento nos lipossomas. Demais estudos devem ser realizados para melhorar esses parâmetros, uma vez que estudos iniciais *in vivo* apresentaram uma tendência de que o emprego da combinação de 5-FU e IRN seja mais eficiente em reduzir o crescimento tumoral.

7 DISCUSSAO GERAL

A elevada incidência do CCR assim como a preocupante taxa de mortalidade tornou essa doença um importante problema de saúde pública ao redor do mundo. E para tentar reduzir esses números, tem-se incentivado a ampliação das estratégias de rastreio que são muito importantes para o diagnóstico precoce que por sua vez, é crucial para uma boa resposta ao tratamento. O tumor em estágios iniciais é abordado de forma eficaz com terapia localizada (cirurgia), entretanto, no caso de tumores localmente invasivos ou metastáticos, terapias sistêmicas tornam-se necessárias (PEREZ-HERRERO & FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

O câncer é uma doença complexa, o conjunto de células que formam o tumor são, em geral, geneticamente heterogêneas, o que significa que nem todas as células cancerosas em um tumor contêm o mesmo conjunto de mutações genéticas. (MEACHAM *et al.*, 2013) Essa heterogeneidade é um grande obstáculo no desenvolvimento de drogas antineoplásicas direcionadas. Uma das maneiras mais eficientes de atingir vários tipos de células que compõem um tumor envolve administrar vários medicamentos ao paciente. As estratégias atualmente empregadas baseam-se no conceito de que, o tratamento com múltiplas drogas levará ao maior benefício terapêutico para a maioria dos pacientes (LINTON *et al.*, 2015). Como exemplo, FOLFOXIRI, um regime de tratamento que consiste em ácido folínico, fluorouracil, oxaliplatina e irinotecano, é usado para tratar pacientes com câncer colorretal metastático. Essa combinação resulta em um ganho de 5 anos de sobrevida em comparação com o tratamento com qualquer uma dessas drogas isoladamente. Além disso, a administração de bevacizumab, um anticorpo monoclonal contra fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), para pacientes em FOLFOXIRI ou FOLFIRI (ácido folínico, fluorouracil, irinotecano) elevou ainda mais as taxas de sobrevida em comparação com FOLFOXIRI ou FOLFIRI sem bevacizumab (LOUPAKIS *et al.*, 2014; LINTON *et al.*, 2015).

De fato, evidências empíricas em oncologia mostraram que a administração de múltiplas drogas para pacientes com tumores de estágio médio a avançado é frequentemente a estratégia de tratamento com melhores resultados. Atualmente, os médicos oncologistas recorrem à administração de combinações de drogas na sua

forma livre. No entanto, a farmacocinética e interações físico-químicas impedem a administração de certas classes de medicamentos entre si, o que limita a capacidade dos oncologistas de usar combinações de medicamentos que poderiam ser benéficas. Como alternativa, a fim de otimizar a farmacoterapia do câncer pautadas em características moleculares e do microambiente tumoral, novas estratégias baseadas em sistemas nanoestruturados de direcionamento de fármacos e terapias alvo vem sendo introduzidas aos esquemas terapêuticos convencionais (KHAN, *et al.*, 2015; AL-MAHMOOD *et al.*, 2018).

Dentre os sistemas de direcionamento de fármacos destacam-se os lipossomas. Lipossoma PEGuilado de doxorubicina (Doxil®) foi a primeira formulação nanoestruturada aprovada pelo FDA para o uso clínico, devido a redução dos efeitos cardiotoxicos do fármaco e a mudança do perfil de distribuição e tempo de circulação (OLSON *et al.*, 1982; CHARROIS & ALLEN, 2003; GABIZON *et al.*, 2003; ALLEN & CULLIS, 2013).

Considerando os resultados positivos encontrados, modificações na composição dos lipossomas têm sido estudadas a fim de aumentar a especificidade, dentre estas, destacam-se os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada. Diversos estudos demonstraram que estes nanossistemas são vantajosos por reduzir de forma significativa a toxicidade de moléculas bioativas, além de potencializar a captação pelo tecido tumoral (LEITE *et al.*, 2012a; MARONI *et al.* 2012; SOARES *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2013; CARLESSO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2017; SILVA, *et al.*, 2018).

Adicionalmente, é sabido que a atividade antitumoral está associada à concentração do componente ativo no interior das células, e por esse motivo é crucial favorecer a internalização dos fármacos ou mesmo das nanoestruturas. Em estudos do nosso grupo de pesquisa, as propriedades fusogênicas dos SpHL culminaram no incremento da atividade *in vitro* e *in vivo* de diversos quimioterápicos em relação ao fármaco livre. Além disso, outra estratégia com resultados promissores, foi o recobrimento desses lipossomas com moléculas direcionadoras, como o folato, que foi capaz de potencializar a atividade do paclitaxel em modelos de tumor que expressavam receptores para folato (VANIC *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2012b, BARBOSA *et al.*, 2015;

FERREIRA *et al.*, 2017, MONTEIRO *et al.*, 2019). Diante disso, a condução de estudos *in vivo* a fim de confirmar as vantagens da funcionalização de SpHL com folato quanto a toxicidade sistêmica, o acúmulo na região tumoral e consequente incremento da atividade antitumoral em modelo de tumor colorretal torna-se uma estratégia interessante para potencializar a ação do fármaco além de reduzir possíveis efeitos tóxicos.

Considerando os SpHL-IRN-FOL, foi percebido uma maior atividade antitumoral sem aumento da toxicidade quando comparada à SpHL-IRN e IRN livre. Esses resultados confirmam que as formulações de longa circulação são vantajosas por, de uma forma geral, permitirem maior acúmulo de nanossistemas na região tumoral. A presença de cadeias de PEG₂₀₀₀ na superfície dos lipossomas, associados ao reduzido tamanho de partícula favorecem o extravasamento na região de interesse (AWASTHI *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2018), sendo que a presença do direcionamento ativo proporcionado pela funcionalização de SpHL com folato foi capaz de potencializar o acúmulo no sítio tumoral. Assim como em estudos semelhantes utilizando diferentes nanossistemas de longa circulação funcionalizados com folato (FAZILATI *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2017; PATIL *et al.*, 2018), observou-se significativo controle do crescimento tumoral ao longo do tempo nos animais que receberam a formulação funcionalizada, quando comparados aos animais controle ou formulações não direcionadas. Estes resultados são evidenciados pela redução no índice de inibição do crescimento tumoral e pelo volume tumoral relativo (VTR) significativamente menor nos animais tratados com o SpHL-FOL.

Como já comentado apesar de já existir um lipossoma de IRN (Onivyde®) aprovado para uso clínico, ele não se mostrou efetivo para o câncer colorretal e por isso é comercializado para o tratamento de câncer pancreático, mesmo assim, em associação com 5-FU e leucovorina. Por isso os resultados promissores do SpHL-IRN-FOL são tão relevantes, uma vez que alternativas aos tratamentos atuais para o CCR são cruciais para reverter os dados alarmantes de mortalidade pela doença. Dessa forma, estudos adicionais com o SpHL-IRN-FOL tornam-se necessários a fim de otimizar a formulação e além disso, é importante verificar a associação com o 5-FU uma vez que é, atualmente, a combinação mais empregada.

O 5-FU é o principal fármaco empregado no tratamento do CCR, porém seu pequeno peso molecular e propriedades químicas dificultam o aprisionamento no interior na partícula escolhida inicialmente para este estudo. Portanto, apesar de os lipossomas de 5-FU preparados nesse trabalho apresentaram parâmetros adequados para administração em animais, mesmo com o baixo percentual de encapsulação encontrado, os estudos de liberação tornaram o emprego da formulação pouco eficiente. Uma alternativa encontrada, foi a troca do lípide estrutural, DOPE por DPPC, por ser uma alternativa para aumentar a rigidez da membrana e dificultar a permeação do 5-FU. Os experimentos preliminares evidenciarem resultados positivos, porém, estudos adicionais precisam ser realizados para otimização da formulação com DPPC. Assim como para o estudo piloto de atividade antitumoral, em que a combinação lipossomal dos fármacos, IRN e 5-FU, apresentou indícios de bons resultados, porém precisam ser repetidos devido à contaminação das células tumorais por outro microrganismo.

8 CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, foram desenvolvidos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada recobertos com folato (SpHL-Fol), uma nanoplateforma multifuncionalizada para a entrega específica de IRN em modelo murino de tumor de câncer colorretal. Os estudos *in vivo* demonstraram preservação do perfil de segurança de SpHL-FOL determinada pela ausência de toxicidade renal, hepática e hematológica do IRN quando encapsulada em SpHL-IRN-FOL. Adicionalmente, SpHL-IRN-FOL foi capaz de se acumular de forma satisfatória no sítio de interesse, culminando na diminuição a taxa de crescimento tumoral comparado às outras formulações de IRN. Desta forma, SpHL-IRN-FOL pode ser considerada uma ferramenta multifuncional adequada e promissora para o tratamento de tumores positivos para receptores de folato, e uma potencial estratégia terapêutica para tumores não responsivos a terapias-alvo convencionais. Considerando que a combinação de IRN e 5-FU é um dos protocolos terapêuticos mais empregados também foram preparados lipossomas de 5-FU e os resultados ainda que preliminares foram promissores apesar da dificuldade de manutenção do fármaco no interior da nanopartícula. Portanto, estudos posteriores com o 5-FU se fazem necessários para avaliar se haverá ganho terapêutico com a formulação de SpHL-IRN-FOL.

9 PERSPECTIVAS

- Avaliar a pH-sensibilidade das formulações de DPPC;
- Realizar estudos de microscopia para identificação de características morfológicas das diferentes formulações propostas;
- Avaliar a atividade antitumoral em animais portadores de tumor de adenocarcinoma colorretal da combinação de lipossomas folatados contendo IRN e 5-FU;
- Avaliar a toxicidade aguda sistêmica das formulações preparadas;

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. A. *et al.* The liposomal formulation of doxorubicin. **Methods Enzymol.** 391:71–97, 2005.
- ADIWIJAYA, B. S. *et al.* Pharmacokinetics of Liposomal Irinotecan in Patients With Cancer. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, V. 102 N. 6, p. 997-1005, 2017.
- AGHDAM, M. A. *et al.* Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release. **J Control Release.** v. 351, p. 1-22, 2019.
- ALIBOLANDI, M. *et al.* Dextran-poly lactide-co-glycolide polymersomes decorated with folate-antennae for targeted delivery of docetaxel to breast adenocarcinoma in vitro and in vivo. **J Control Release.** v. 241, p. 45-56, 2016.
- ALLEN TM, CULLIS PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Adv Drug Deliv Rev**;65(1):36–48, 2013.
- AL-MAHMOOD S. *et al.* Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Deliv Transl Res**; 8(5):1483–507, 2018.
- AL-MAHMOOD, S. *et al.* Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug Deliv Transl Res.** v. 8, n. 5, p. 1483-1507, 2018.
- ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: **uma introdução. Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANDRÉ, T. *et al.* Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. **N Engl J Med.** 3;350(23):2343-51, 2004.
- ANDRÉ, T. *et al.* Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. **J Clin Oncol.** 1;27(19):3109-16, 2009.
- Anticancer Research Mar 2013, 33 (3) 1053-1060;

ARAÚJO, R. S. *et al.* Intestinal toxicity evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes loaded with cisplatin. **Eur J Pharm Sci.** v. 106, p. 142-151, 2017.

ARBUCK, S. G.; TAKIMOTO, C. H. An overview of topoisomerase I - targeting agents. **Semin Hematol.** 35: 3-12, 1998.

AVGERPOULOS, NG, BATCHELOR, TT. New treatment strategies for malignant gliomas. **The Oncol** 4: 209-224, 1999.

AZRAK, R.G. *et al.* Therapeutic synergy between irinotecan and 5- fluorouracil against human tumor xenografts. **Clin. Cancer Res.** 10:1121–1129, 2004.

BAKER, J. H. *et al.* Irinophore C, a novel nanoformulation of irinotecan, alters tumor vascular function and enhances the distribution of 5-fluorouracil and doxorubicin, **Clin. Cancer Res.** 14 (22):7260–7271, 2008.

BALA, V., RAO, S., BOYD, B. J., AND PRESTIDGE, C. A. Prodrug and Nanomedicine Approaches for the Delivery of the Camptothecin Analogue SN38. **J. Control Release** 172, 48–61, 2013.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 238–252, ago. 1965.

BAO, A. *et al.* Direct ^{99m}Tc Labeling of Pegylated Liposomal Doxorubicin (Doxil) for Pharmacokinetic and Non-Invasive Imaging Studies. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.** v. 308, n. 2, p. 419-425, 2003.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BELTRÁN-GRACIA, E *et al.* Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. **Cancer Nano.** v. 10, n. 11, p. 1-40, 2019.

BENSON III, AB. Therapy for advanced colorectal cancer. **Sem Oncol**, 25: 2-11, 1998.

BETAGERI, G.V. & PARSONS, D.L. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. **Int J Pharm.** v. 81, n. 3, p. 235-241, 1992.

BOCCI, G.; NICOLAOU, K. C.; KERBEL, R. S.; Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. **Cancer Res.** 62 (23) 6938–6943, 2002.

BOEING, T. *et al.* Irinotecan-induced intestinal mucositis in mice: a histopathological study. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 327–336, 31 mar. 2021.

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

Brar B. *et al.* Nanotechnology in Colorectal Cancer for Precision Diagnosis and Therapy, **Frontiers in Nanotechnology** ; v.3, 2673-3013, 2021.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L. & GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e Diferenciação Celulares. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo: Patologia Geral. 4. Ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 226, 2009.

BULBAKE U, DOPPALAPUDI S, KOMMINENI N, KHAN W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. **Pharmaceutics.**;9(2):1–33, 2017.

BURRIS III, HA, FIELDS, SM. Topoisomerase I inhibitors. **New Drug Therapy** 2: 333-351, 1994.

BYRNE, J. D., BETANCOURT, T & BRANNON-PEPPAS, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 60, p. 1615-1626, 2008.

CABEZA, L. *et al.* Nanoparticles in Colorectal Cancer Therapy: Latest In Vivo Assays, Clinical Trials, and Patents. **AAPS PharmSciTech.** 21 (5), 178, 2020

Cancer Research UK. **Worldwide cancer statistics.** 2020;

CARLESSO, F. N. *et al.* Preliminary data of the antipancreatic tumor efficacy and toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposome containing cisplatin. **Nuclear Medicine Communications**. v. 37, n. 7, p. 727-734, 2016.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases, **Nat. Rev. Drug Discov.** 10 (6):417–427, 2011.

CARMO, V.A.S. *et al.* Physicochemical characterization and study of in vitro interactions of pH-sensitive liposomes with the complement system. **Journal of Liposome Research**, v. 18, p. 59–70, 2008.

CASADÓ A, SAGRISTÁ ML, MORA M. A novel microfluidic liposomal formulation for the delivery of the SN-38 camptothecin: characterization and in vitro assessment of its cytotoxic effect on two tumor cell lines. **Int J Nanomedicine**. Sep 11;13:5301-5320, 2018.

CASADÓ, A. *et al.* Improved selectivity and cytotoxic effects of irinotecan via liposomal delivery: A comparative study on Hs68 and HeLa cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 65–77, nov. 2017.

CASSIDY, J. *et al.* XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.** 22, 2084–2091 (2004).

CASTLE, J. C. *et al.* Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 13 mar. 2014.

Celsion. Phase 2 Study of Thermodox as Adjuvant Therapy with Thermal Ablation (RFA) in Treatment of Metastatic Colorectal Cancer (mCRC) (**ABLATE**). **Clinical Trials**., 2016.

CHEN, S. *et al.* Intestinal glucuronidation protects against chemotherapy-induced toxicity by irinotecan (CPT-11). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 47, p. 19143–19148, 2013.

CHENG, H. *et al.* Targeted gene delivery mediated by folate-polyethylenimine-block-poly(ethylene glycol) with receptor selectivity. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 481–487, 18 mar. 2009.

CHOI J.Y. *et al.* Systemic delivery of axitinib with nanohybrid liposomal nanoparticles inhibits hypoxic tumor growth. **J Mater Chem B** 2015;3(3):408–16.

COLUCCI, G. *et al.* Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. **J. Clin. Oncol.** 23, 4866–4875 (2005)

COSTA, C. A. M. D.; MORAES, A. M. Encapsulation of 5-fluorouracil in liposomes for topical administration. **Acta Sci Technol.** (1):53–61, 2003.

CUNNINGHAM D. *et al.* Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet** Oct;352(9138):1413–8, 1998.

CUNNINGHAM D. *et al.* Final results of a randomised trial comparing 'Tomudex'® (raltitrexed) with 5-fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer. **Ann Oncol.** (9):961–5, 1996.

DAS, S. S. *et al.* Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery, Imaging, and Theragnosis. **Polymers (Basel).** v. 12, n. 6, p. 1397, 2020.

DAWIDCZYK, C. M. *et al.* State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 133–144, ago. 2014.

de BARROS, A. L. B. *et al.* Bombesin encapsulated in long-circulating pH-sensitive liposomes as a radiotracer for breast tumor identification. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 2, p. 342–350, 1 fev. 2015.

de BARROS, A. L. B. *et al.* Long-Circulating, pH-Sensitive Liposomes versus Long-Circulating, Non-pH-Sensitive Liposomes as a Delivery System for Tumor Identification. **Journal of Biomedical Nanotechnology.** v. 9, p. 1-8, 2013.

de BARROS, A. L. B. *et al.* Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.** v. 21, p. 7373–7375, 2011.

de OLIVEIRA, M. C. *et al.* pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: A physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water. **Biophysical Chemistry**, v. 87, n. 2–3, p. 127–137, out. 2000.

DOS REIS, S. B. *et al.* Mechanistic insights into the intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 134, p. 110952, fev. 2021.

DRUMMOND, D. C. *et al.* Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy. **Cancer Research**, v. 66, n. 6, p. 3271–3277, 15 mar. 2006.

DRUMMOND, D. C. *et al.* Enhanced pharmacodynamic and antitumor properties of a histone deacetylase inhibitor encapsulated in liposomes or ErbB2-targeted immunoliposomes. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3392–3401, 1 maio 2005.

FENSKE DB, CULLIS PR. Liposomal nanomedicines. **Expert Opin Drug Deliv** Jan 21;5(1):25–44,2008.

FERREIRA, D. S. *et al.* Development of a bone-targeted pH-sensitive liposomal formulation containing doxorubicin: physicochemical characterization, cytotoxicity, and biodistribution evaluation in a mouse model of bone metastasis. **Int J Nanomedicine**. v. 11, p. 3737-3751, 2016.

FERREIRA, D. S. *et al.* Evaluation of antitumor activity and cardiac toxicity of a bone-targeted pH-sensitive liposomal formulation in a bone metastasis tumor model in mice. **Nanomedicine**. v. 13, n. 5, p. 1693-1701, 2017.

FERREIRA, D. S. *et al.* pH-sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. **Ther Deliv**. v. 4, n. 9, p. 1099-1123, 2013.

FISCHEL, J. L. *et al.* Ternary combination of irinotecan, fluorouracil–folinic acid and oxaliplatin: results on human colon cancer cell lines, **Br. J. Cancer**. 84:579–585, 2001.

FONTES, A.P.S.; CESAR, E.T.; BERALDO, H. A química Inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.

FRANCO, M. S. *et al.* 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 and Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1728–1739, jan. 2019.

FRANCO, M. S. *et al.* Investigation of the antitumor activity and toxicity of cisplatin loaded pH-sensitive-pegylated liposomes in a triple negative breast cancer animal model. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, p. 102400, abr. 2021.

FRÉZARD, F. *et al.* Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**. v. 28, p. 511-518, 2005.

GABIZON, A. *et al.* In Vivo Fate of Folate-Targeted Polyethylene-Glycol Liposomes in Tumor-Bearing Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 17, p. 6551–6559, 15 dez. 2003.

GANTA S. *et al.* A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **J Control Release**. v. 126, n. 3, p. 187-204, 2008.

GAO Y, WIJEWARDHANA C, MANN JFS. Virus-like particle, liposome, and polymeric particle-based vaccines against HIV-1. **Front Immunol**. 9:345, 2018.

GARCIA-CARBONERO R, SUPKO JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. **Clin Cancer Res**. (3):641–61, 2002.

GHANBARZADEH, S.; VALIZADEH, H.; ZAKERI-MILANI, P. The Effects of Lyophilization on the Physico-Chemical Stability of Sirolimus Liposomes. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. V.3: 25-29. 2013.

GHOSH, K. *et al.* Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11305–11310, 12 ago. 2008.

GIDDING, C. E. *et al.* Vincristine Revisited. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** 29 (3), 267–287, 1999.

GOLDBERG, R. M. *et al.* A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.** 22, 23–30 (2004)

GOREN, D. *et al.* Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 1949–1957, maio 2000.

GRADY, W.M., MARKOWITZ, S.D. The Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer and Its Potential Application to Colorectal Cancer Screening. **Dig Dis Sci** 60, 762–772, 2015.

GREENE F, PAGE DL, FLEMING ID. AJCC cancer staging handbook. 6th ed. New York: **Springer**, 2002.

GREENWALT, I. *et al.* Precision Medicine and Targeted Therapies in Breast Cancer. **Surg Oncol Clin N Am.** v. 29, n. 1, p. 51-62, 2020.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P.D.; RYMAN, B.E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Letters**, v. 14, p. 95-99, 1971.

GRIVICICH, I. *et al.* The irinotecan/5-fluorouracil combination induces apoptosis and enhances manganese superoxide dismutase activity in HT-29 human colon carcinoma cells, **Chemotherapy**. 51:93–102, 2005.

GUICHARD, S. *et al.* CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumor and normal colon and liver tissues, **Br. J. Cancer**. 80 (3–4):364–370, 1999.

GUIMARÃES, D. *et al.* Quantification of drugs encapsulated in liposomes by ¹H NMR. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. V.179: 414-420. 2019.

GUINNEY, J., DIENSTMANN, R., WANG, X. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nat Med** 21, 1350–1356, 2015.

HALLER, D. G *et al.* Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. **J Clin Oncol**.1; 23(34):8671-8, 2005.

HALLER, DG. Chemotherapy in gastrointestinal malignancies. **Semin Oncol** 15 (suppl 4): 50-64, 1988.

HAMOUDEH, M. *et al.*, “Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer”, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 12, pp. 1329-1346, 2008.

HAN, M. *et al.* A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 4, p. 926–935, abr. 2009.

HANDALI S. *et al.* A novel 5-Fluorouracil targeted delivery to colon cancer using folic acid conjugated liposomes. **Biomed Pharmacother**.108:1259-1273, 2018.

HARASYM, T. O. *et al.* Increased preclinical efficacy of irinotecan and floxuridine coencapsulated inside liposomes is associated with tumor delivery of synergistic drug ratios, **Oncol. Res**. 16: 361–374, 2007.

HARE, J. I. *et al.* Treatment of Colorectal Cancer Using a Combination of Liposomal Irinotecan (Irinophore CTM) and 5-Fluorouracil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62349, 23 abr. 2013.

HEALEY, E *et al.* Comparative Effectiveness of 5-Fluorouracil with and without Oxaliplatin in the Treatment of Colorectal Cancer in Clinical Practice. **Anticancer Res**.; 33(3):1053-60, 2013.

HEINRICH, A. K. *et al.* Improved Tumor-Specific Drug Accumulation by Polymer Therapeutics with pH-Sensitive Drug Release Overcomes Chemotherapy Resistance. **Molecular Cancer Therapy**. v. 15, n. 5, p. 998-1007, 2016.

HIGINIO DOPESO *et al.*; Aprataxin Tumor Levels Predict Response of Colorectal Cancer Patients to Irinotecan-based Treatment. **Clin Cancer Res**; 16 (8): 2375–2382, 2010.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

HONG, J. Folate-modified Annonaceous acetogenins nanosuspensions and their improved antitumor efficacy. **Int J Nanomedicine**. v. 12, p. 5053-5067, 2017.

HUSSAIN A. *et al.* Elastic liposomes as novel carriers: recent advances in drug delivery. **Int J Nanomedicine**;12: 5087–108, 2017.

JACKMAN, AL, FARRUGIA, DC, GIBSON, W. ZD1694 (Tomudex): a new thymidylate synthase inhibitor with activity in colorectal cancer. **Eur J Cancer** 31A: 1277-1282, 1995.

JAIN, A. & JAIN, S. K. Stimuli-responsive Smart Liposomes in Cancer Targeting. **Curr Drug Targets**. v. 19, n. 3, p. 259-270, 2018.

JANSEN, W. J. M. *et al.* CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenograft: Characterization of cellular sensitivity determinants. **International Journal of Cancer**, v. 70, n. 3, p. 335–340, 27 jan. 1997.

JUANG, V. *et al.* pH-Responsive PEG-Shedding and Targeting Peptide-Modified Nanoparticles for Dual-Delivery of Irinotecan and microRNA to Enhance Tumor-Specific Therapy. **Small**, v. 15, n. 49, p. 1903296, 2019.

KANEDA, N.; NAGATA, H.; FURUTA, T. *et al.* Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. **Cancer Res**. 50: 1715-1720, 1990.

KANG, B.W. *et al.* Bevacizumab plus FOLFIRI or FOLFOX as third-line or later treatment in patients with metastatic colorectal cancer after failure of 5-fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin: a retrospective analysis. **Med. Oncol**. 26 (1):32–37, 2009.

KARANTH, H. & MURTHY, R. S. R. pH-sensitive liposomes--principle and application in cancer therapy. **J Pharm Pharmacol**. v. 59, n. 4, p. 469-483, 2007.

KATHRYN, M. *et al.* A novel liposome-encapsulated synergistic combination of doxorubicin and 5FU for low dose chemotherapy; **J Control Release**. 10; 229:154–162, 2016.

KAWATO, Y, AONUMA, M, HIROTA, Y, *et al.* Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. **Cancer Res.** 51: 4187-4191, 1991.

KHAN, D. R. *et al.* Use of Targeted Liposome-based Chemotherapeutics to Treat Breast Cancer. **Breast Cancer.** v. 9, n. 2, p. 1-5, 2015.

KHANNA, R. *et al.* Proficient metabolism of irinotecan by a human intestinal carboxylesterase, **Cancer Res.** 60 (17) 4725–4728, 2000.

KISHIMOTO, H. *et al.* Development of a clinically-precise mouse model of rectal cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79453, 12 nov. 2013.

KLIBANOV, A.L. *et al.* Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposomes. **FEBS Letters**, v. 268, p. 235-237, 1990.

KOOPMAN, M. *et al.* Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. **Lancet** 370, 135–142, 2007.

KRAFT, J. C. *et al.* Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 1, p. 29–52, 2014.

KUEBLER J. P. *et al.*, Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. **J Clin Oncol.** 1;25(16): 2198-204, 2007.

KUIPERS, E., Grady, W., Lieberman, D. *et al.* Colorectal cancer. **Nat Rev Dis Primers** 1, 15065 (2015).

KUNIMOTO, T. *et al.* Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. **Cancer Res.** 47: 5944-5947, 1987.

LAVELLE, F. *et al.* Preclinical evaluation of CPT11 and its active metabolite SN-38, **Semin. Oncol.** 23 (1 Suppl. 3) 11–20, 1996.

LE V. M. *et al.* Enhanced anticancer efficacy and tumor targeting through folate-PEG modified nanoliposome loaded with 5-fluorouracil. **Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.** 8 015008, 2017.

LEE, Y. & THOMPSON, D.H. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.** v. 9, n. 5, p. 2-76, 2017.

LEITE, E. A. *et al.* Acute Toxicity Study of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Administered in Mice. **Journal of Biomedical Nanotechnology.** v. 8, p. 1-11, 2011.

LI, L. *et al.* Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia. **Journal of Controlled Release.** V.143: 274–279, 2010.

LIN X, GU N. Surface properties of encapsulating hydrophobic nanoparticles regulate the main phase transition temperature of lipid bilayers: a simulation study. **Nano Res.** ;7(8):1195–204, 2014.

LINTON SS, SHERWOOD SG, DREWS KC, KESTER M. Targeting cancer cells in the tumor microenvironment: opportunities and challenges in combinatorial nanomedicine. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.**;8(2):208-22, 2016.

LIU X. *et al.* Improved Efficacy and Reduced Toxicity Using a Custom-Designed Irinotecan-Delivering Silicasome for Orthotopic Colon Cancer. **ACS Nano.** 2019 Jan 22;13(1):38-53.

LOHADE, A. A. *et al.* A Novel Folate-Targeted Nanoliposomal System of Doxorubicin for Cancer Targeting. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 6, p. 1298–1311, 2016.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P. PG.5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer.** 3(5):330-8, 2003.

LOUPAKIS F. *et al.* Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med** 2014, 371:1609–1618

LU Y, LOW PS. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. **Adv Drug Deliv Rev.** ;54(5):675–93, 2002.

MADNI, M. A. *et al.* Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401–426, 26 ago. 2014.

MARONI, L. C. *et al.* Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. **Experimental Biology and Medicine**. v. 237, p. 973–984, 2012.

MATHIJSEN, R. H. *et al.* Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). **Clin. Cancer Res.** 7 (8):2182–2194, 2001.

MAYER, L.D. *et al.* Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice, **Mol. Cancer Ther.** 5. 854–1863, 2006.

MCCARTHY, J. R. *et al.* Targeted nanoagents for the detection of cancers. **Mol Oncol.** v. 4, p. 511-528, 2010.

MEACHAM CE, MORRISON SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. **Nature** 2013, 501:328– 337.

MEISEL J. L. *et al.* Evolution of Targeted Therapy in Breast Cancer: Where Precision Medicine Began. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**. v. 38, p. 78-86, 2018.

MERINO M, ZALBA S, GARRIDO MJ. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. **J Control Release**; 275:162–76, 2018.

MEYERHARDT JA, MAYER RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. **N Engl J Med**; 352:476–487, 2005.

MIRANDA, S. E. M. *et al.* Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110936, jan. 2021.

MONTEIRO N, MARTINS A, REIS RL, NEVES NM. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. **J R Soc Interface**;11(101):20140459, 2014.

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

MONTEIRO, L. O. M. *et al.* Paclitaxel-Loaded Folate-Coated pH-Sensitive Liposomes Enhance Cellular Uptake and Antitumor Activity. **Mol Pharm.** v. 16, n. 8, p. 3477-3488, 2019.

MÜHR-WILKENSCHOFF F. *et al.* A pilot study of irinotecan (CPT-11) as single-agent therapy in patients with locally advanced or metastatic esophageal carcinoma. **Int J Colorectal Dis**;18(4):330–4, 2003.

MÜLLER RH, MÄDER K, GOHLA S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art. **Eur J Pharm Biopharm**, 3;50(1):161–77, 2000.

MURTHY AVR, GUYOMARC'H F, LOPEZ C. The temperature-dependent physical state of polar lipids and their miscibility impact the topography and mechanical properties of bilayer models of the milk fat globule membrane. **Biochim Biophys Acta Biomembr**;1858(9):2181–90, 2016.

NALWA H S AND WEBSTER T J E. Cancer Nanotechnology (Los Angeles, CA: **American Scientific Publishers**, 2007.

NUNES SS *et al.* Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes. **Drug Deliv Transl Res**;9(1):123–30, 2019.

O'CONNELL JB, MAGGARD MA, KO CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:1420–1425.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. **Biochimica et Biophysica Acta.** v., 1372, p. 301-310, 1998.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. **Life Science**, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

PASZKO, E. & SENGE M. O. Immunoliposomes. **Curr Med Chem**. v. 19, p. 5239-5277, 2012.

PATRA, J. K. *et al.* Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, 2018.

PÉREZ-HERRERO, E. & FERNÁNDEZ-MEDARDE A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **Eur J Pharm Biopharm**. v. 93, p. 52-79, 2015.

PIEDBOIS P. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol**;16(1):301–8, 1998.

PILLAI, G. Nanomedicines for Cancer Therapy: An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development. **SOJ Pharm. Pharm. Sci.** 1 (2), 13, 2014.

RAMSAY, E. C *et al.* IrinophoreC: a liposome formulation of irinotecan with substantially improved therapeutic efficacy against a panel of human xenograft tumors, **Clin. Cancer Res.** 14 (4);1208–1217, 2008.

RAYMOND, E. *et al.* Dosage adjustment and pharmacokinetic profile of irinotecan in cancer patients with hepatic dysfunction. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 21, p. 4303–4312, 2002.

RIVIERE K. *et al.* Anti-tumor activity of liposome encapsulated fluoroorotic acid as a single agent and in combination with liposome irinotecan. **J Control Release**;10;153(3):288-96, 2011.

RIVORY, L. P. *et al.* Kinetics of the in vivo interconversion of the carboxylate and lactone forms of irinotecan (CPT-11) and of its metabolite SN-38 in patients. **Cancer Res.** 54(24): 6330–6333, 1994.

ROTHENBERG, ML. *et al.* Phase II trial of irinotecan in patients with progressive or rapidly recurrent colorectal cancer. **J Clin Oncol.** 14: 1128-1135, 1996.

SADZUKA, Y. *et al.* Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome. **International Journal of Pharmaceutics**, v.238, 171–180, 2002.

SAEED A. *et al.* Nano-erythrocyte membrane-chaperoned 5-fluorouracil liposomes as biomimetic delivery platforms to target hepatocellular carcinoma cell lines, Artificial Cells, **Nanomedicine, and Biotechnology**, 47:1, 989-996,2019.

SALIBA, F. *et al.*, Pathophysiology and therapy of irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment, **J. Clin. Oncol.** 16 (8):2745–2751, 1998.

SASAKI, Y. *et al.* Simultaneous administration of CPT-11 and fluorouracil: alteration of the pharmacokinetics of CPT-11 and SN-38 in patients with advanced colorectal cancer. **J Natl Cancer.** Inst 86: 1096-1098, 1994.

SEYMOUR, M. T. *et al.* Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRCFOCUS): a randomised controlled trial. **Lancet** 370, 143–152,2007.

SHIA J. *et al.* Immunohistochemical expression of folate receptor alpha in colorectal carcinoma: patterns and biological significance. **Hum Pathol.** (4):498-505, 2008.

SHIMADA, Y. *et al.* Phase II study of CPT-11, a new Camptothecin derivative, in metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol.** 11: 909-913, 1993.

SHINOHARA, H. *et al.* Intensified regression of colon cancer liver metastases in mice treated with irinotecan and the immunomodulator JBT 3002. **Journal of Immunotherapy**, v. 23, n. 3, p. 321–331,2000.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics,.CA **Cancer J Clin.** 2019;69(1):7-34, 2019.

SIEGEL, D.P., Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic, and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. **Biophysical Journal**, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

SILVA, J. DE O. *et al.* Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109323, 2019.

SILVA, J. O. *et al.* pH-Sensitive, Long-Circulating Liposomes as an Alternative Tool to Deliver Doxorubicin into Tumors: a Feasibility Animal Study. **Molecular Imaging and Biology**. 2016.

SILVA, J. O. *et al.* Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: A preclinical approach. **Toxicol Appl Pharmacol**. v. 352, p. 162-169, 2018.

SOARES, D. C. *et al.* Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing ^{159}Gd -DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice. **Eur J Pharm Sci**. v. 45, n. 1-2, p. 58-64, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA (SBC); Cancer de colon: tratamento quimioterápico, 2011.

SOE, Z. C. *et al.* Folate receptor-mediated celastrol and irinotecan combination delivery using liposomes for effective chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 718–728, 2018.

SONBOL MB.*et al.* The Role of Maintenance Strategies in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. **JAMA Oncol.**;6(3), 2020.

SPITZNER, M. *et al.* A novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy. **Cancers**. v. 6, p. 1986-2011, 2014.

SRIRAMAN, S. K. *et al.* Anti-cancer activity of doxorubicin-loaded liposomes co-modified with transferrin and folic acid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 40–49, ago. 2016.

STEWART, AF, SCHUTZ, G. Camptothecin - induced in vivo topoisomerase I cleavages in the transcriptionally active tyrosine aminotransferase gene. **Cell** 50: 1109-1117, 1987.

STORM, G. *et al.* Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, p. 31-48, 1995.

STRICKER, T. P. & KUMAR, V. Neoplasias. In: ABBAS, A. K. *et al.* Robbins e Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**. P. 671, 2010.

SUK, J. S. *et al.* PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 1, n. 99, p. 28-51, 2016.

SUNG, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**. p. 209–249, 2021.

TAKIMOTO CH, WRIGHT J, ARBUCK SG. Clinical applications of the camptothecins. **Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr**;1400(1–3):107–19, 1998.

TAKIMOTO, CH, ARBUCK, SG. Camptothecins; Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice. Philadelphia (USA), **Lippincott-Raven**. 463-484, 1996.

TAKIMOTO, CH, KIEFFER, LV, ARBUCK, SG. DNA topoisomerase I inhibitors. Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers Annual 17. **Elsevier Science**. 79-113, 1997.

TAN, P. H. *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. **Histopathology**. v. 77, n. 2, p. 181-185, 2020.

TARDI, P. G. *et al.* Coencapsulation of irinotecan and floxuridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1768, n. 3, p. 678–687, 2007.

TARDI, P. *et al.* In vivo maintenance of synergistic cytarabine: daunorubicin ratios greatly enhances therapeutic efficacy. **Leuk. Res.** 33: 129–139, 2009.

TAYO, L. L. Stimuli-responsive nanocarriers for intracellular delivery. **Biophys Rev.** v. 9, n. 6, p. 931-940, 2017.

TORCHILIN, V.P.; TRUBETSKOY, V.S. In vivo visualizing of organs and tissues with liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 5, p. 795-812, 1995.

US National Institute of Health (2016). ClinicalTrial.gov.

VALORI, R. *et al.* European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition — quality assurance in endoscopy in colorectal cancer screening and diagnosis. **Endoscopy** 44, SE88–SE105, 2012.

VAN ARK-OTTE, J. *et al.* Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 12, p. 2171–2176, jun. 1998.

VAN CUTSEM E, OLIVEIRA J; ESMO Guidelines Working Group. Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol.** (suppl 4):61-63, 2009.

VEMURI, S. & RHODES, C. T. Development and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review. **Pharm Acta Helv.** n. 70, p. 95-111, 1995.

VERREAULT, M. *et al.* Irinophore C, a lipid-based nanoparticulate formulation of irinotecan, is more effective than free irinotecan when used to treat an orthotopic glioblastoma model. **J. Controlled Release.** 158 (1) 34–43, 2012.

VOGELSTEIN B. *et al.* Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med.** 319:525–532, 1988.

WANG, W *et al.* Liposomal 5-Fluorouracil Polymer Complexes Facilitate Tumor-Specific Delivery: Pharmacokinetics Using Microdialysis. **Pharmaceutics** 2022, 14, 221.

WEI, H. *et al.* Active loading liposomal irinotecan hydrochloride: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 5, p. 303–311, out. 2013.

WISEMAN, L. R.; MARKHAM, A. Irinotecan, A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the management of advanced colorectal cancer, **Drugs** 52 (4):606–623, 1996.

WOODLE, M.C.; LASIC, D.D. Sterically stabilized liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 113, n. 2, p. 171-199, 1992.

WORKING, P. K. *et al.* Pharmacokinetics, Biodistribution and Therapeutic Efficacy of Doxorubicin Encapsulated in Stealth Liposomes (Doxil). **Journal of Liposome Research**. v. 4, n. 1, p. 667-687, 1994.

WU, B. *et al.* MRI-guided targeting delivery of doxorubicin with reduction-responsive lipid-polymer hybrid nanoparticles. **Int J Nanomedicine**. v. 12, p. 6871-6882, 2017.

XIE YH, CHEN YX, FANG JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. **Signal Transduct Target Ther**; 5(1):22, 2020.

XING, H., HWANG, K. & LU, Y. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. **Theranostics**. v. 6, n. 9, p. 1336-1352, 2016.

XU, G. *et al.* Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 8, p. 2605–2611, ago. 2002.

YANG, Y. *et al.* Folate-Modified Poly(malic acid) Graft Polymeric Nanoparticles for Targeted Delivery of Doxorubicin: Synthesis, Characterization and Folate Receptor Expressed Cell Specificity. **J Biomed Nanotechnol**. v. 11, n. 9, p. 1628-1639, 2015.

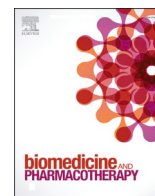
YOTHERS, G.*et al.* Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Nature Medicine**. v. 18, n. 11, p. 1639-1645, 2012.

ZAMANI P. *et al.* Nanoliposomes as the adjuvant delivery systems in cancer immunotherapy. **J Cell Physiol**:5189–99, 2018.

ZHANG Z, YAO J. Preparation of irinotecan-loaded folate-targeted liposome for tumor targeting delivery and its antitumor activity. **AAPS PharmSciTech**;13(3):802–10, 2012.

ZYLBERBERG, C. & MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Deliv.** v. 23, n. 9, p. 3319-3329, 2016.

APÊNDICE – ARTIGO pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment, Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 144, 2021.



pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment

Shirleide Santos Nunes^a, Sued Eustaquio Mendes Miranda^a, Juliana de Oliveira Silva^a, Renata Salgado Fernandes^a, Janaína de Alcântara Lemos^a, Carolina de Aguiar Ferreira^b, Danyelle M. Townsend^c, Geovanni Dantas Cassali^d, Mônica Cristina Oliveira^a, André Luís Branco de Barros^{e,*}

^a Department of Pharmaceutical Products, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Medical Physics, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53705, USA

^c Department of Drug Discovery and Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Medical University of South Carolina, USA

^d Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Liposomes
Irinotecan, polyethylene glycol
Antitumor activity
Folate-coated

ABSTRACT

Irinotecan (IRN) is a semisynthetic derivative of camptothecin that acts as a topoisomerase I inhibitor. IRN is used worldwide for the treatment of several types of cancer, including colorectal cancer, however its use can lead to serious adverse effects, as diarrhea and myelosuppression. Liposomes are widely used as drug delivery systems that can improve chemotherapeutic activity and decrease side effects. Liposomes can also be pH-sensitive to release its content preferentially in acidic environments, like tumors, and be surface-functionalized for targeting purposes. Herein, we developed a folate-coated pH-sensitive liposome as a drug delivery system for IRN to reach improved tumor therapy without potential adverse events. Liposomes were prepared containing IRN and characterized for particle size, polydispersity index, zeta potential, concentration, encapsulation, cellular uptake, and release profile. Antitumor activity was investigated in a murine model of colorectal cancer, and its toxicity was evaluated by hematological/biochemical tests and histological analysis of main organs. The results showed vesicles smaller than 200 nm with little dispersion, a surface charge close to neutral, and high encapsulation rate of over 90%. The system demonstrated prolonged and sustained release in pH-dependent manner with high intracellular drug delivery capacity. Importantly, the folate-coated pH-sensitive formulation had significantly better antitumor activity than the pH-dependent system only or the free drug. Tumor tissue of IRN-containing groups presented large areas of necrosis. Furthermore, no evidence of systemic toxicity was found for the groups investigated. Thus, our developed nanodrug IRN delivery system can potentially be an alternative to conventional colorectal cancer treatment.

1. Introduction

Camptothecins are efficient antineoplastic alkaloid-derived compounds that belong to the family of the topoisomerase I interactive substances [1]. Topotecan and irinotecan (IRN) are two camptothecins that have already been approved by the US Food and Drug Administration (FDA) [1,2]. IRN (7-Ethyl-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)

carbonyloxycamptothecin) is a first-line drug approved for the treatment of a variety of cancer types, including colorectal, lung, and gynecological cancers [3]. While it can be used as a monotherapy, it is usually administered in combination with cytotoxic agents, including oxaliplatin and 5-fluorouracil (5-FU) and as a rescue therapy in 5-FU-refractory disease [4,5]. The primary target, Topo1 is ubiquitously expressed and consequently the drug has been shown to have serious side effect with

* Correspondence to: Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
E-mail addresses: brancodebarros@yahoo.com.br, albb@ufmg.br (A.L. Branco de Barros).

<https://doi.org/10.1016/j.biopharm.2021.112317>

Received 9 September 2021; Received in revised form 29 September 2021; Accepted 6 October 2021

Available online 8 October 2021

0753-3322/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

large inter-individual variability. The toxicities associated with IRN include myelosuppression (neutropenia) and gastrointestinal disorders (mainly diarrhea), which are recognized as constituting dose-limiting toxicity for this drug [4,6].

IRN is a prodrug which has a complex pharmacologic profile and is extensively metabolized in vivo. Metabolism in the gastrointestinal tract occurs in three major steps starting with the conversion of water-soluble IRN to generate the potent metabolite SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin). In the second step, SN-38 is metabolized to a glucuronide which can be exported to the intestine and reactivated to its toxic form by bacterial β -glucuronidase where it can be reabsorbed. The local reactivation of the drug in the intestinal tract is attributed to its toxicity [7].

Efforts to identify biomarkers to determine which patient population will be more impacted has not been successful. Consequently, alternative platforms for delivery are a viable option that can incorporate precision medicine into the drug delivery system. This notion is further supported by the complex pharmacokinetic profile of the drug following intravenous administration [8]. SN-38 has 100- to 1000-fold more potent antitumor effects, however, after intravenous administration of free IRN, only less than 5% of IRN is converted to SN-38, mainly in the liver. The most active form of camptothecin contains an open lactone configuration, which is formed through an esterification reaction in the presence of the enzyme carboxyl esterase. Carboxyl esterase is present in all tissues, including tumors [3,9] and it is more prominent in acidic environments. In this context, IRN pharmacokinetic profile would greatly benefit from a tool that can protect and stabilize IRN and enable its conversion to the most active metabolite more specifically in the tumor tissue.

Nanoparticle-based drug delivery systems have emerged as promising tools to alter pharmacokinetic profile of drugs [8–10]. More specifically, drug delivery strategies focused on the stabilization of the lactone ring of IRN to avoid its inactivation have been previously reported. Liposomes are considered to be one of the most promising drug delivery systems designed to encapsulate a wide range of drugs and provide suitable strategies to improve the efficacy of chemotherapeutics in cancer treatment [11–13]. Encapsulating a drug into liposomes is highly advantageous as it can improve its pharmacokinetics, promote its intracellular uptake, and allow selective delivery to tumor cells, often resulting in decreased undesirable side effects and increased maximum tolerated dose [14,15].

Several strategies have been explored to improve the pharmacokinetics and targeting of liposomal formulations to further optimize the activity/toxicity of encapsulated drugs [4]. Our research group has successfully employed long-circulating pH-sensitive liposomes (SpHL) for treatment of several types of solid tumors [16–20]. To the best of our knowledge, we will describe, for the first time, the use of pH-sensitive liposomes encapsulated with IRN for treatment of colorectal cancer. Our approach is founded in knowledge that the tumor environment normally has a lower pH than normal tissues. Such acidic conditions will promote cellular uptake of SpHL via endosome formation and allow local targeted drug release in the tumor [16,21].

Furthermore, the use of nanoparticles such as liposomes can leverage tumor specificity through the addition of surface molecular markers for tumor targeting and accumulation [22–25]. Folate, for example, is a molecule used in different metabolic cycles during amino acid synthesis to support and promote cell growth. Folate receptor is overexpressed in the tumor environment while only minimally distributed in normal tissues, resulting in an optimal targeting approach. Functionalization of liposomes with folate is a great tumor targeting strategy that can further improve its pharmacokinetic profile and potential drug antitumor activity [26,27].

Herein, we have developed a novel liposome-based targeted drug delivery system as a tool to improve IRN tumor therapy efficiency with low toxicity profile. The development and characterization of controlled release pH-sensitive liposomes encapsulated with IRN was carried out

and investigated as a promising anti-tumor agent in a murine model of colorectal cancer.

2. Material and methods

2.1. Materials

Trihydrated irinotecan hydrochloride (IRN) was donated from EUROFARMA Laboratórios SA (São Paulo, Brazil). The dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), and distearoylphosphatidylethanolamine polyethyleneglycol2000 (DSPE-PEG2000/DSPE-PEG-FOL) were supplied by Lipoid GmbH (USA). Cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) and cholesterol (CHOL) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Company (St Louis, USA). Glucose was purchased from Vetec Química Fina Ltda (São Paulo, Brazil). All solvents (high-performance liquid chromatography analytical grade) and other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil). The subcutaneous tumor model was established in 8–10-week-old female BALB/c mice purchased from CEBIO-UFMG (Belo Horizonte, Brazil). Animals were kept under SPF condition with free access to standard food and water. All animal studies were approved by the local Ethics Committee for Animal Experiments of Federal University of Minas Gerais, Brazil (protocol # 102/2020).

2.2. Methods

2.2.1. Liposome preparation

Liposomes were prepared according to the lipid film hydration method [28], followed by size calibration. Briefly, chloroform aliquots of DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000 (5.8:3.7:0.5 molar ratio, respectively; total lipid concentration was equal to 40 mM) or DOPE, CHEMS, DSPE-PEG2000, and DSPE-PEG2000-Fol (5.8:3.7:0.45:0.05 molar ratio, respectively; total lipid concentration was equal to 40 mM) were transferred to a flask and the solvent was removed at low pressure to prepare SpHL and SpHL-Fol, respectively. Aliquots of 0.1 M NaOH solution were added to lipid film to promote complete ionization of CHEMS molecules, and subsequently, the formation of a lamellar structure. Then, lipid film was hydrated with 300 mM ammonium sulfate solution, at room temperature, under vigorous stirring [29]. The liposomes obtained were calibrated by extrusion using polycarbonate membranes of 0.4 μ m, 0.2 μ m, and 0.1 μ m, 5 cycles per membrane, using the Lipex Biomembranes extruder, Model T001 (Vancouver, Canada). After, ammonium sulfate in the external medium was removed by ultracentrifugation (Ultracentrifuge Optima® L-80XP, Beckman Coulter, Brea, USA) at 150,000g, 4 °C, for 120 min. The pellet was resuspended with 0.9% (w/v) NaCl solution. Afterward, 10 mg/mL solution of IRN was incubated with SpHL or SpHL-Fol dispersion during 2 h at 4 °C. The non-encapsulated IRN was removed by ultracentrifugation using the same method described above.

2.2.2. Liposomes physicochemical characterization

2.2.2.1. Size distribution, zeta potential and encapsulation efficiency (% EE). The mean diameter of liposomes was determined by dynamic light scattering at 25 °C at an angle of 90°. The zeta potential was evaluated by electrophoretic mobility determination at an angle of 90°. Size and zeta potential measurements were performed in triplicate using the nano ZS90 Zetasizer equipment (Malvern Instruments, England). The samples were diluted using a 0.9% (w/v) NaCl solution. The encapsulation efficiency (EE) of IRN in liposomes was determined by HPLC, using phosphate buffer: acetonitrile (70:30 v/v) + 0.2% triethylamine (pH 2.5, adjusted with phosphoric acid) as the mobile phase, and a reversed-phase C18 column with fluorescence detection [30].

2.2.2.2. Nanoparticle tracking analysis. The measurements were

performed using the Nanosight NS300 equipment (Malvern Instruments, England). The samples were prepared after dilution in ultrapure water (same external phase as the formulations) and introduced into the Nanosight sample chamber with a disposable syringe. The samples were measured at room temperature for 60 s with automatic detection. The suspension was irradiated by a laser source and light scattering. Images were captured by a charge-coupled device camera.

2.2.3. pH-sensitive drug release study

Drug release was carried out through dialysis with cellulose membranes (MWCO12000 Da) in HEPES-saline buffer at two different pHs (pH 5 and 7.4). Dialysis bags containing 500 μ L of SpHL-IRN or free drug were added to vials containing 50 mL of the buffer and kept under agitation at 37 °C. At 30 min, 1, 2, 4, 8, and 24 h, aliquots of 1 mL of the buffer were collected and the same volume was replaced so that the concentration of the solution did not vary the amount of drug released was then calculated by HPLC.

2.2.4. Confocal microscopy

CT26 murine colon cancer tumor cells were seeded in 6-well plates with sterile coverslips (2.5×10^5 cells/well) at 24 h before treatment. Cells were exposed to a solution of IRN, SpHL-IRN, or SpHL-IRN-Fol, at a drug concentration of 5 μ M, for 12 h. After washing with PBS, cells were fixed with 3.7% (v/v) formaldehyde solution, slides were assembled using Prolong Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific - Waltham, USA). Cells were analyzed in "Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI/UFMG)" using the LSM 880 microscope with Airyscan detector (ZEISS - Oberkochen, Germany). For image acquisition, a 63x objective lens and a Diode 370 nm (excitation of IRN) laser were used. The images were processed using the ZEN Blue Edition software version 2.3 lite (ZEISS -Oberkochen, Germany).

2.2.5. In vivo studies

2.2.5.1. Cell culture. CT26 cells were grown in RPMI-1640 medium (Gibco, USA), supplemented by 10% (v/v) fetal bovine serum, penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 mg/mL). Cells were kept in humidified air (95%) containing 5% CO₂ at 37 °C. After 3–5 days of culture the cells were trypsinized and cell viability was assessed after staining with Trypan Blue. After centrifugation (5 min at 330 g), cells were resuspended in culture medium for inoculation into the BALB/c mice.

2.2.5.2. Tumor inoculation. Aliquots (100 μ L) with 1.0×10^6 of CT26 cells were subcutaneously injected into the right flank of female BALB/c mice. Tumor cells were allowed to grow in vivo for 10 days until tumors reached, approximately, 100 mm³.

2.2.5.3. Antitumor activity. After tumor development, mice were randomly split into 4 groups (n = 6 for each group): saline (control group); free IRN; SpHL-IRN; and SpHL-IRN-FOL. The total dose of IRN in all treatment groups was 120 mg/kg, divided into 4 administrations (30 mg/kg), every 2 days. Throughout the study, mice were weighed, and tumors were measured with caliper every 2 days, until the end of the experiment (Day 8) when mice were sacrificed. Tumor volumes were calculated from the formula:

$$V = (d_1)^2 \times d_2 \times 0.5$$

Where d_1 and d_2 , represent the smallest and largest diameter, respectively. The inhibition ratio IR) was calculated on day 8 (D₈), as follows:

$$IR = 1 - (\text{Mean RTV of drug-treated group} / \text{Mean RTV of control group}) \times 100.$$

Where, RTV = Tumor volume D₈/Tumor volume D₀.

2.2.5.4. Hematological and biochemical study. At the end of the study,

the animals were euthanized immediately after whole blood was collected by puncture of the brachial plexus into tubes containing anticoagulant (EDTA). The hematological parameters evaluated included hemoglobin, number of red blood cells, hematocrit, hematimetric indices, red blood cell distribution width (RDW), global and differential leukocyte count and number of platelets, as described in our laboratory previously [31].

Plasma was obtained through centrifugation (3000 rpm, 15 min) and biochemical parameters were quantified. Renal function was evaluated through blood urea nitrogen and creatinine parameters and liver function through amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST) analysis [32].

2.2.5.5. Histological analysis. At the end of the study, the main organs (primary tumor, lungs, large intestine, liver and kidneys) were excised, embedded in paraffin and submitted to hematoxylin-eosin (H&E) staining for toxicity analysis [32].

2.2.6. Statistical analysis

All data are expressed as mean $\pm$ SD. Means among the various groups were compared by an analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test (GraphPad PRISM, version 6.0). A P-value of < 0.05 was considered be statistically significant.

3. Results

3.1. Size distribution, zeta potential and encapsulation efficiency (% EE)

The mean diameter, polydispersity index, zeta potential, % EE, and the drug loading of the liposomal formulations are described in Table 1.

Liposomes were homogeneous (low PDI) with a diameter smaller than 200 nm. The zeta potential was close to neutrality for all formulations, which can be beneficial for its pharmacokinetic properties [33]. DLS results were further validated by nanoparticulate tracking studies (Fig. S1), in which a monodispersed population was found with the majority (90%) of particles having 155 nm in diameter.

3.2. pH-sensitive drug release studies

In vitro pH sensitivity was evaluated for SpHL-IRN and free IRN at different pHs (7.4 and 5.0) and the results are shown in Fig. 1.

In vitro pH-sensitivity of SpHL-IRN was evaluated as a function of time at different pHs (7.4 and 5.0), Fig. 1. No statistical changes were observed with free drug. However, the IRN encapsulated in liposomes presented a pH and time- dependent release demonstrating a greater stability and retention capability of the nanoparticle [34]. As seen in Fig. 1, up to the 30 min timepoint, the release pattern of IRN encapsulated in SpHL is similar at both pHs. However, at timepoints of 1, 2 and

Table 1

Physicochemical characterization of SpHL, SpHL-Fol, SpHL-IRN and SpHLIRN-Fol.

Formulation	Mean Diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	% EE	Drug loading (mg/mL)
SpHL-blank	159.2 $\pm$ 3.9	0.09 $\pm$ 0.03	-4.1 $\pm$ 0.6	–	–
SpHL-fol-blank	160.1 $\pm$ 4.0	0.09 $\pm$ 0.03	-4.1 $\pm$ 0.6	–	–
SpHL-IRN	169.0 $\pm$ 6.0	0.12 $\pm$ 0.05	-11.1 $\pm$ 0.8	66.2 $\pm$ 3.0	6.6 $\pm$ 0.3
SpHL-FOL-IRN	165.2 $\pm$ 3.1	0.12 $\pm$ 0.08	-9.10 $\pm$ 1.2	62.3 $\pm$ 0.9	6.2 $\pm$ 0.1

Note: Data are expressed by the mean (n = 3) $\pm$ S.D. of the mean. All data were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-test (P > 0.05).

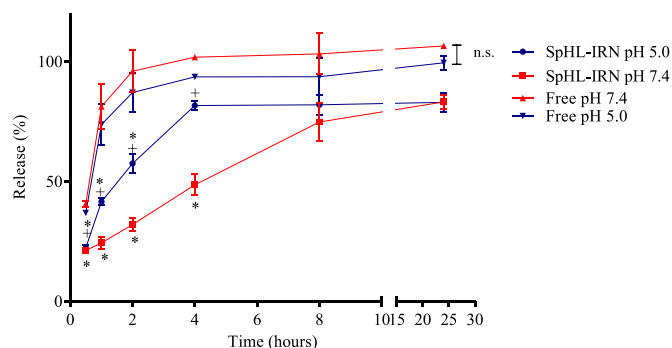


Fig. 1. pH dependent release of IRN. The percent release profile of SpHL-IRN at pH 7.4 (red lines) and pH 5.0 (blue lines) is shown over 24 h. **Note:** * $P < 0.05$ as compared with free-IRN (pH 5 and pH 7); + $P < 0.05$ between the SpHL-IRN pH 7.4. Data are expressed by the mean ($n = 3$) $\pm$ S.D. of the mean. All data were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4 h a more pronounced release of the drug is found at pH 5 when compared to pH 7.4 ($p < 0.05$), which corroborates the hypothesis that a pH reduction promotes a destabilization of the nanosystem, culminating in greater drug release. These finding confirm the pH sensitivity for SpHL, which might be beneficial for the drug delivery in the tumor microenvironment [16].

3.3. Confocal microscopy

To validate drug release and uptake in colon cancer cells we performed confocal microscopy, Fig. 2. IRN was visualized intracellularly, localized mostly in the cytoplasmic and peri-nuclear regions. A small uptake in the nuclei can be observed for all groups (Free IRN, SpHL-IRN, SpHL-IRN-Fol) investigated. These results suggest the efficient IRN delivery inside the cell for all formulations at the evaluated time [35].

3.4. Anti-tumor activity

The antitumor activity of free-IRN and liposomal preparations (SpHL-IRN and SpHLIRN-Fol) were evaluated in CT26 tumor-bearing BALB/c mice. Tumor volume growth curves (Fig. 3A) had drastically different profiles among the groups. Animals that received liposomal formulations had significantly smaller tumor volumes when compared to control groups (saline and free IRN groups), $p < 0.05$. In addition, the animals that received liposomal formulation functionalized with folate (SpHLIRN-Fol) had significantly smaller tumor volumes than any other group, including non-functionalized SpHL-IRN. These data support that folate was advantageous in tumor targeting and anti-tumor activity. Fig. 3B shows the tumor volumes at the end of the experiment for all the

groups, confirming the higher efficiency of SpHL-IRN-Fol in controlling tumor growth.

The tumor volume inhibition ratio (TV-IR), shown in Table 2, corroborates the data presented in tumor growth curves. Overall, liposomal formulations were more effective at inhibiting tumor growth than free IRN or saline. Treatment with SpHL-IRN-Fol resulted in an even more extensive tumor growth inhibition when compared to SpHL-IRN (57.8% and 41.5%, respectively).

3.5. Hematological and biochemical study

Hematological parameters of control and mice treated with Free-IRN, SpHL-IRN and SpHL-IRN-Fol are shown in Table 3. RBC and platelets counts, HGB concentrations, and HCT values were similar in all groups and presented no significant difference ($p > 0.05$) when compared to those of the control group. In addition, there was no change in the leukocyte series for all groups.

Biochemical parameters indicative of renal (blood urea nitrogen and serum creatinine) and hepatic (ALT and AST) toxicity did not show significant changes among groups. These results are consistent with the lack of histological alteration that was observed in the renal and hepatic tissue of the mice treated with different formulations containing IRN, which confirms that the treatment at the doses used, as expected, did not cause high toxicity (Fig. 4A–D). Additionally, body weight measurements were taken to evaluate overall toxicity of administered formulations. No significant body weight changes were found after therapeutic administration in any of the groups investigated ($p > 0.05$) (Fig. 4E).

3.6. Histological analysis

Both tumor and normal tissues were evaluated by histology for necrosis and metastasis. Histological analysis of colorectal cancer tumors is presented in Fig. 5. Treatment with free IRN, SpHL-IRN or SpHL-IRN-Fol, showed extensive necrosis due to IRN-induced cell death (Fig. 5F; 5G and 5H, respectively). Liver and large intestine tissues were evaluated for the appearance of metastases (Fig. 6) however no metastatic foci were found in the tissues evaluated.

4. Discussion

Conventional systemic therapies for the treatment of cancer consist mostly of antineoplastic drugs that, in general, have low specificity and high toxicity, which limits the either the dose that can be administered or the number of cycles a patient can undergo. In the last few decades, with new understandings of the molecular characteristics of tumors and its microenvironment, anticancer therapy research focus has shifted to include more specialized and targeted approaches [36,37]. Among these strategies, the use of nanostructured drug delivery systems has had a profound impact on cancer therapeutics research. A wide range of nanomaterials have emerged as alternative tools that can deliver

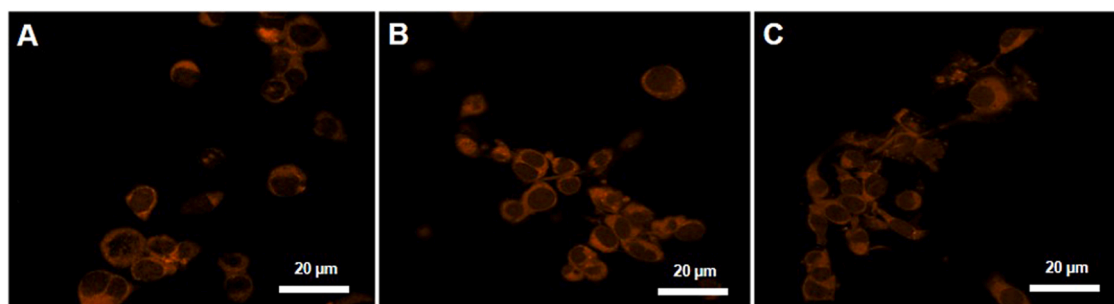


Fig. 2. Liposomal encapsulated IRN is efficiently taken up in colon cancer cells. Confocal microscopy images of CT26 murine colon cancer tumor cells after 24 h-incubation with A = free IRN, B = SpHL-IRN or C = SpHLIRN-Fol treatments (IRN concentration 5 μ M). Amplification of 63 $\times$. Diode 370 nm (excitation of IRN).

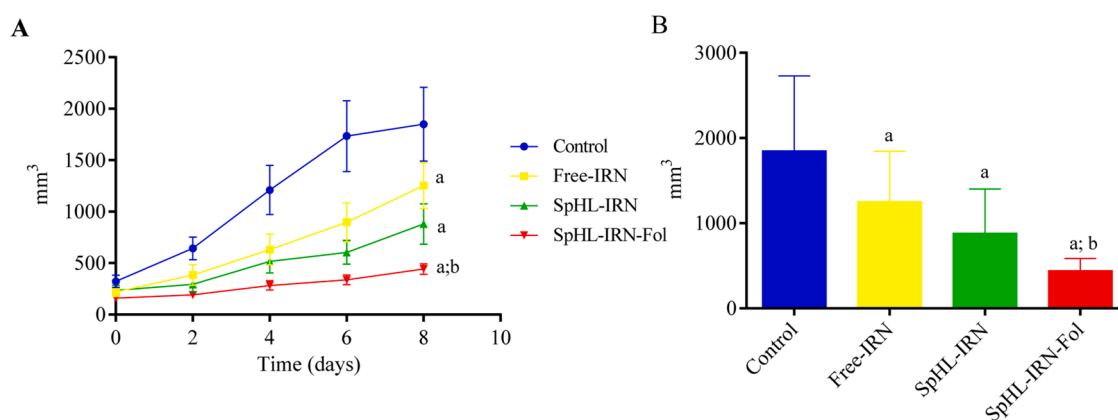


Fig. 3. Liposomes containing IRN are more effective than free drug. (A) Antitumor effect of SpHL (control group), IRN, SpHL-IRN, and SpHL-IRN-Fol on the growth of CT26 colon tumor-bearing female BALB/c mice. Each treatment was intravenously administered 3 times, every 2 days, at dose of 30 mg/kg. (B) Volume tumoral at the end of the experiments, day 8, after treatments. **Note:** Data are expressed by the mean $\pm$ standard deviation of the mean ($n = 6$). Growth curves were analyzed by regression. a Represents statistical differences ($P < 0.05$) as compared with control group. b Represents statistical differences ($P < 0.05$) as compared with free-IRN. All data were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-test.

Table 2

Relative tumor volume (RTV) and tumor growth inhibition ratio (IR) after administration of free-IRN, SpHL-IRN and SpHL-IRN-Fol.

Treatment group	RTV	IR (%)
Free-IRN	5,9 $\pm$ 3,21	16,6
SpHL-IRN	4,1 $\pm$ 1,43	41,5
SpHL-IRN-Fol	2,9 $\pm$ 1,42 ^a	57,8

Note: ^aRepresents significant difference as compared with the Free-IRN P-values less than 0.05; the data were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's test. Data expressed as mean $\pm$ S.D. of the mean ($n = 6$).

Table 3

Hematological parameters of control mice treated with 3 doses of IRN formulations.

Parameters	Treatments			
	CTL	IRN	SPHL-IRN	SPHL-IRN-Fol
RBC (cell/mm ³ $\times 10^6$)	4,9 $\pm$ 2,2	5,3 $\pm$ 1,0	5,7 $\pm$ 0,9	5,9 $\pm$ 0,5
Hemoglobin (g/L)	9,0 $\pm$ 4,7	8,3 $\pm$ 2,6	10,3 $\pm$ 2,2	11,0 $\pm$ 1,4
HCT (%)	25,1 $\pm$ 10,6	27,4 $\pm$ 5,3	28,8 $\pm$ 4,6	30,3 $\pm$ 2,5
WBC (cell/mm ³ $\times 10^3$)	6,5 $\pm$ 4,2	2,5 $\pm$ 1,0	3,1 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 1,0
Granulocyte (cell/mm ³ $\times 10^3$)	2,9 $\pm$ 1,9	1,2 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5
Not granulocyte (cell/mm ³ $\times 10^3$)	3,56 $\pm$ 2,3	1,3 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,6	1,5 $\pm$ 0,5
RDW (%)	14,9 $\pm$ 1,6	16,2 $\pm$ 1,3	16,1 $\pm$ 0,4	15,8 $\pm$ 1,0
PLT (cell/mm ³ $\times 10^3$)	261,2 $\pm$ 157,0	211,3 $\pm$ 78,5	276,4 $\pm$ 55,9	233,5 $\pm$ 78,3

Note: Evaluation of the hematological parameters was carried out 10 days after treatment of mice with the IRN formulations. Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. Abbreviations: HGB (hemoglobin), RBC (red blood cells), HTC (hematocrit), PLT (platelets), WBC (total white blood cells). Data expressed as mean $\pm$ S.D. of the mean ($n = 6$). All data were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-test ($P > 0.05$).

otherwise toxic chemotherapeutics to tumor sites with improved therapeutic efficacy. Among the available versatile materials, liposomes have been extensively employed as smart carriers able to modify bio-distribution, metabolism, and in vivo elimination of drugs [16,38–40].

It is well known that antitumor activity is directly proportional to the intracellular concentration of the active drugs/metabolites [16,21] and its toxicity is correlated with the amount of drug distributed to off-target tissues. Thus, an ideal drug carrier should be specifically taken up by the tumor and allow internalization of the drug into tumor cells while reducing drug uptake by healthy tissue. The ability to design liposomes to both be pH sensitive and promote active tumor targeting makes it an attractive candidate as a drug nanocarrier. The pH responsiveness of liposomes may be attributed to the presence of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) in the liposome bilayer. Since DOPE by itself is incapable of forming a lamellar structure, the use of stabilizing agents such as cholesteryl hemisuccinate (CHEMS) is required for a liposome structure formation. At physiological pH, CHEMS is ionized and inserted between the DOPE molecules resulting in electrostatic repulsions between the CHEMS ionized carboxyl groups and DOPE phosphate groups, resulting in the formation of a liposomal bilayer. In contrast, at a lower pH, CHEMS is protonated promoting destabilization of the liposomal structure and consequently drug release. Since the tumor microenvironment is more acidic than surrounding healthy tissue, a targeted and optimized drug released is obtained resulting in optimized chemotherapeutic drug action [11,16,41,42]. In addition to their optimal fusogenic properties, the inclusion of targeting moieties on the liposomal surface, such as folic acid, can lead to increased tumor targeting capabilities and chemotherapeutic efficacy [27]. With all that in mind, we have constructed pH-sensitive liposomes with tumor targeting capabilities, encapsulated with a chemotherapeutic drug IRN, for improved therapeutic response in colorectal cancer.

In the present study, the liposomes (SpHL-IRN-Fol and SpHL-IRN) were successfully synthesized with similar and monodisperse vesicle diameter in all formulations. Liposomes were obtained with a diameter of less than 200 nm, which allows its extravasation to the tumor tissue by EPR effect [43]. SpHL-IRN-Fol and SpHL-IRN presented slightly negative zeta potential due to the presence of phosphate groups of the phospholipids in the liposome composition. However, the presence of PEG chains on the surface of the liposome produces a hydrophilic layer and reduces its electrophoretic mobility resulting in a zeta potential close to neutrality [40]. This is important because, once in the blood stream, conventional nanoparticles and negatively charged particles can be opsonized and massively cleared by phagocytosis by immune cells and removed from systemic circulation, and consequently, avoid the effective delivery of the nano drug to organs [44].

Cytotoxic drugs encapsulated in liposomes are normally unable to act on their therapeutic targets or cause toxicity until they are released from the confines of the carrier, and thus liposomal drug delivery can

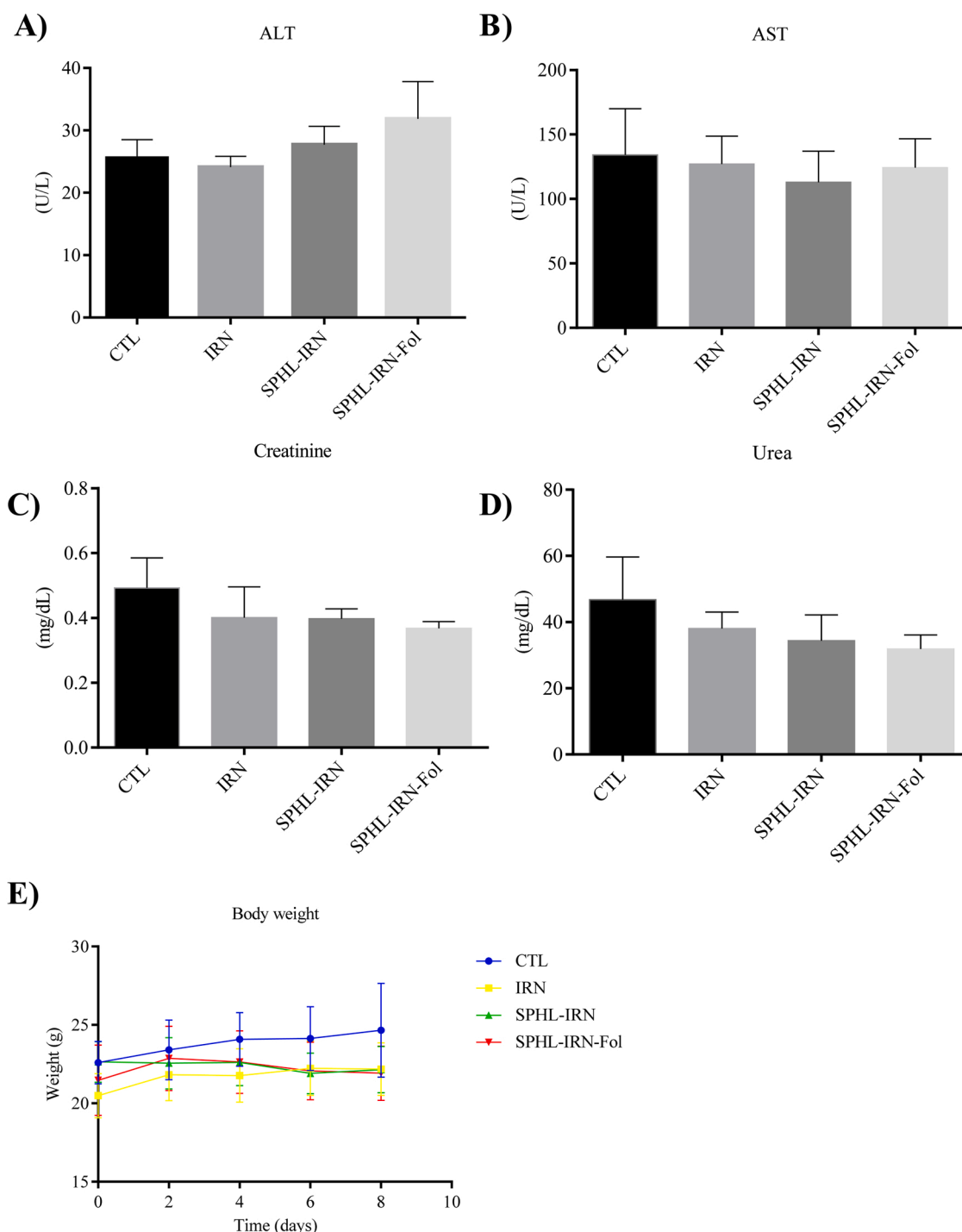


Fig. 4. Evaluation of kidneys and liver toxicity. Biochemical parameters of control mice treated with 3 doses of IRN formulations were evaluated for kidneys toxicity (A and B), liver toxicity (C and D) and body weight (E). Data expressed as mean $\pm$ S.D. of the mean ($n = 6$). **Note:** Evaluation of the biochemical parameters was carried out 10 days after treatment of mice with the IRN formulations. Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. Abbreviations: ALT (alanine aminotransferase), and AST (aspartate aminotransferase). All data were analyzed by one-way ANOVA analysis of variance followed by Tukey's post-test ($P > 0.05$).

itself be regarded as a prodrug strategy [34]. Although local activation of IRN to SN-38 has yet to be shown, carboxylesterases have a widespread distribution in different tumor types and are active in macrophages, where liposomes are primarily captured [45–47]. Thus, the ability of liposomal-mediated drug release at the desired tissue is extremely important. The pH-sensitive liposomes showed a greater release of liposomal content in acidic pH when compared to physiological pH. This is advantageous to achieve optimal balance between tumor uptake and protection of off-target tissue, especially when the

encapsulated drug is considered a prodrug. pH sensitivity allowed IRN to be released only after it reached tumor sites where it can be activated locally [48].

Since IRN is a prodrug and is usually activated once inside the cells, its internalization is extremely important. However, only a few studies have reported the subcellular localization of camptothecin derivatives and the published results are somewhat heterogeneous [35]. Herein, confocal microscopy images demonstrated the presence of IRN in the intracellular environment in all groups evaluated, which confirms that

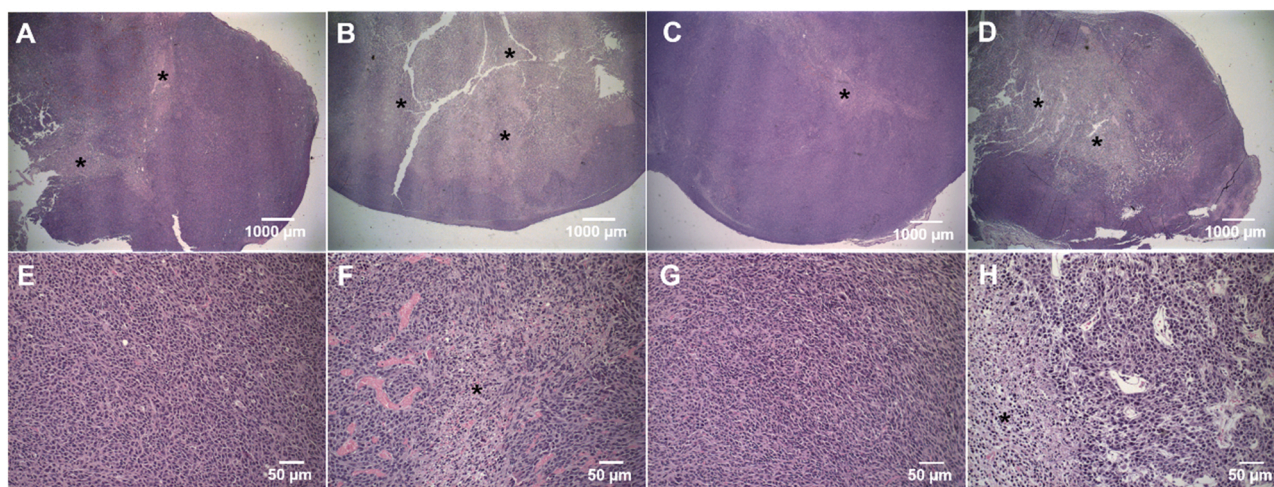


Fig. 5. Histopathological analysis of tumor necrosis. Histological sections of primary tumor from CT26 colorectal tumor-bearing female BALB/c mice treated with free IRN, SpHL-IRN or SpHL-IRN-Fol stained by hematoxylin & eosin. (A) control group at amplification of 2x. (B) Free-IRN-treated at amplification of 2x. (C) SpHL-IRN-treated at amplification of 2x. (D) SpHL-IRN-Fol-treated at amplification of 2x. (E) control group at amplification of 20x. (F) Free-IRN-treated at amplification of 20x. (G) SpHL-IRN-treated at amplification of 20x. (H) SpHL-IRN-Fol-treated at amplification of 20x. The black asterisks indicate areas of tumor necrosis.

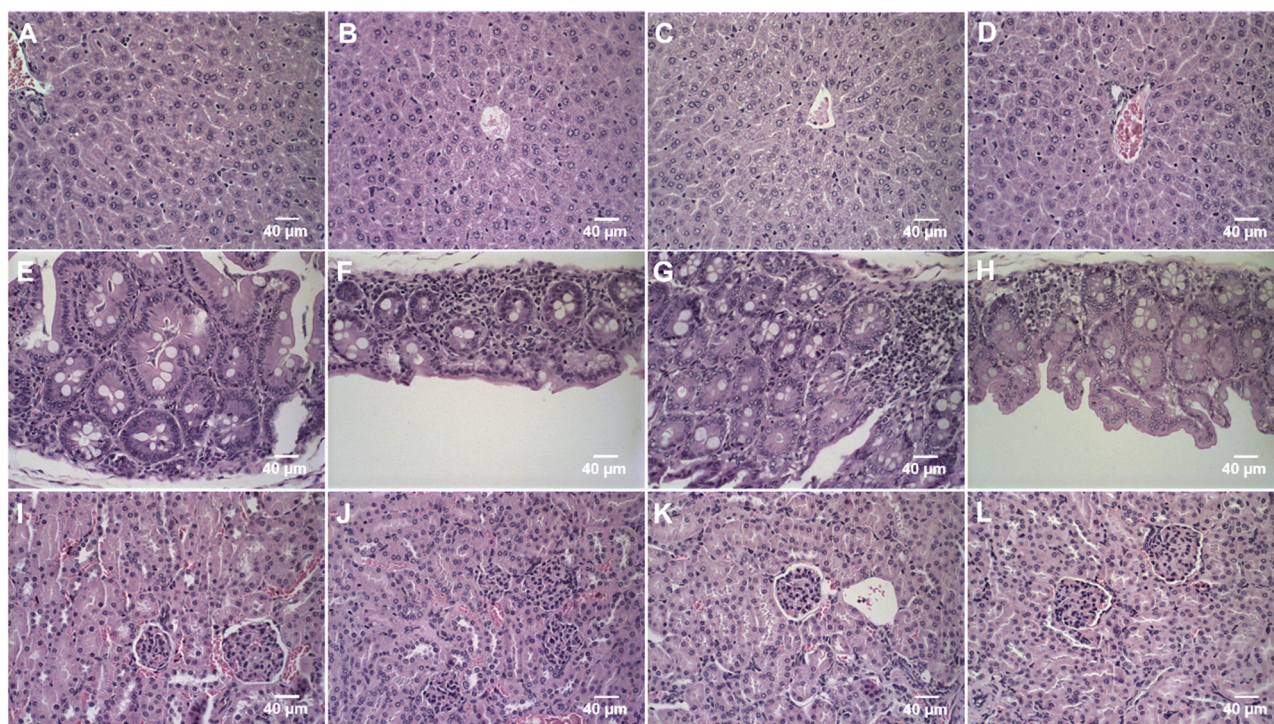


Fig. 6. Histopathological analysis of liver and intestinal toxicity. Histological sections of tissues from CT26 colorectal tumor-bearing female BALB/c mice treated with free IRN, SpHL-IRN or SpHL-IRN-Fol stained by hematoxylin & eosin. (A) control group liver. (B) Free-IRN-treated liver. (C) SpHL-IRN-treated liver. (D) SpHL-IRN-Fol-treated liver. (E) control group large intestine. (F) Free-IRN-treated large intestine. (G) SpHL-IRN-treated large intestine. (H) SpHL-IRN-Fol-treated large intestine. (I) control group kidney. (J) Free-IRN-treated kidney. (K) SpHL-IRN-treated kidney. (L) SpHL-IRN-Fol-treated kidney. Amplification of 40x.

encapsulation into liposomal formulations did not compromise the capacity of IRN to be internalized by tumor cells.

The CT26 colorectal tumor-bearing BALB/c mouse model is a commonly used experimental animal model to study angiogenesis and antitumor activity of several pharmaceutical formulations [49]. Heterotopic implantation models such as subcutaneous tumor implants in mice have been traditionally used to evaluate antitumor treatment because of their reproducibility and monitoring of tumor formation [49, 50]. Our results demonstrated fast tumor growth in the control group.

Even though IRN treatment is potentially highly active against CT26 colorectal tumor cells *in vivo*, a very high tumor growth rate was still observed in animals that received free IRN [51]. However, drug encapsulation in liposomes enhanced its antitumor activity. More importantly, active targeting of liposomes with the presence of acid folate contributed positively for anti-tumor effects. Significantly lower tumor volumes were found for animals administered with SpHL-IRN-Fol when compared to all other groups investigated. That group had the highest inhibition rate (57.8%), which had around 3.4 times higher

anti-tumor efficiency than the free drug. Comparable tumor growth inhibition was previously reported to folate-coated liposomes highlighting the efficiency of using folate-targeting [52]. Histological analysis of tumor tissue presented similar morphological characteristics among groups with central areas of necrosis and proliferation of pleomorphic cells at the periphery infiltrated by leukocytes (Fig. 4) [25]. However, the histological analysis of the primary tumor showed greater necrosis areas in the SpHL-IRN-Fol treated group when compared to all other groups investigated. These data make it clear that not only drug encapsulation but also pH sensitiveness and active targeting the greatly enhanced the antitumor activity. In fact, some studies have shown that folate-targeted liposomes had a potential role in overcoming drug resistance because of the bypass of the P-glycoprotein efflux pump [53, 54]. Gabizon et al. also described that FR-targeted liposomal delivery could reverse multidrug resistance to doxorubicin [53]. Since heterotopic tumor models lack fully developed tumor microenvironments, further studies in more clinically relevant tumor models such as orthotopic models are necessary for better assessment of positive impact of active targeting in anti-tumor efficacy.

Noteworthy, no apparent systemic toxicity was found in any of the groups investigated. Body weight measurements as well as hematological and biochemical tests (hepatic and renal) revealed no acute toxicity to liposome formulations. Altogether, our results indicate the potential of our formulated IRN encapsulated liposome as an alternative drug delivery system for colorectal cancer [55,56].

5. Conclusion

In this study, we developed and characterized a folate-coated and pH-sensitive liposome drug delivery system containing irinotecan (SpHL-IRN-Fol) for the treatment of colorectal cancer. This novel multifunctional formulation demonstrated to have significantly improved antitumor activity than IRN alone with no evidence of toxicity. These data support further preclinical development of SpHL-IRN-Fol as a promising drug delivery system for the treatment of colorectal cancer.

CRediT authorship contribution statement

Shirleide Santos Nunes: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft; **Sued Eustaquio Mendes Miranda:** Formal analysis, Investigation; **Juliana de Oliveira Silva:** Formal analysis, Investigation; **Renata Salgado Fernandes:** Formal analysis, Investigation; **Janaina de Alcântara Lemos:** Formal analysis, Investigation; **Carolina de Aguiar Ferreira:** Formal analysis, Writing – review & editing; **Danyelle M. Townsend:** Writing – review & editing; **Geovanni Dantas Cassali:** Formal analysis, Visualization; **Mônica Cristina Oliveira:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – review & editing; **André Luís Branco de Barros:** Conceptualization, Methodology, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Conflict of interest statement

The authors declare they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brazil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq-Brazil) for their financial support and scholarship. The authors also thank the “Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG (CAPI/UFMG)” for the assistance with confocal images. DMT is supported by the NCCR P20RR024485 in the Analytical Redox Biochemistry Core Facility at MUSC.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.biopha.2021.112317.

References

- [1] H. Wei, J. Song, H. Li, Y. Li, S. Zhu, X. Zhou, X. Zhang, L. Yang, ScienceDirect Active loading liposomal irinotecan hydrochloride: preparation, in vitro and in vivo evaluation, *Asian J. Pharm. Sci.* 8 (2013) 303–311, <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.10.006>.
- [2] P. Piedbois, Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 301–308, <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.1.301>.
- [3] W.J.M. Jansen, B. Zwart, S.T.M. Hulscher, G. Giaccone, H.M. Pinedo, E. Boven, CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenograft: characterization of cellular sensitivity determinants, *Int. J. Cancer* 70 (1997) 335–340, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970127\)70:3<335::AID-IJC15>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970127)70:3<335::AID-IJC15>3.0.CO;2-E).
- [4] A. Casadó, M.L. Sagristá, M. Mora, A novel microfluidic liposomal formulation for the delivery of the SN-38 camptothecin: characterization and in vitro assessment of its cytotoxic effect on two tumor cell lines, *Int. J. Nanomed.* 13 (2018) 5301–5320, <https://doi.org/10.2147/IJN.S166219>.
- [5] J.I. Hare, R.W. Neijzen, M. Anantha, N. Dos Santos, N. Harasym, M.S. Webb, T. M. Allen, M.B. Bally, D.N. Waterhouse, Treatment of colorectal cancer using a combination of liposomal irinotecan (Irinophore CTM) and 5-fluorouracil, *PLoS One* 8 (2013), e62349, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062349>.
- [6] R. Garcia-Carbonero, J.G. Supko, Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 641–661.
- [7] S. Chen, M.F. Yueh, C. Bigo, O. Barbier, K. Wang, M. Karin, N. Nguyen, R.H. Tukey, Intestinal glucuronidation protects against chemotherapy-induced toxicity by irinotecan (CPT-11), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 19143–19148, <https://doi.org/10.1073/pnas.1319123110>.
- [8] E. Raymond, V. Boige, S. Faivre, G.J. Sanderink, O. Rixe, L. Vernillet, C. Jacques, M. Gattineau, M. Ducreux, J.P. Armand, Dosage adjustment and pharmacokinetic profile of irinotecan in cancer patients with hepatic dysfunction, *J. Clin. Oncol.* 20 (2002) 4303–4312, <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.03.123>.
- [9] C.H. Takimoto, J. Wright, S.G. Arbuck, Clinical applications of the camptothecins, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.* 1400 (1998) 107–119, [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00130-4](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00130-4).
- [10] Q. Du, X. Qin, M. Zhang, Z. Zhao, Q. Li, X. Ren, A mitochondrial-metabolism-regulatable carrier-free nanodrug to amplify the sensitivity of photothermal therapy, *ChemComm* 57 (2021) 8993–8996, <https://doi.org/10.1039/d1cc02755g>.
- [11] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- [12] J.C. Kraft, J.P. Freeling, Z. Wang, R.J.Y. Ho, Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 29–52, <https://doi.org/10.1002/jps.23773>.
- [13] J.Y. Choi, T. Ramasamy, T.H. Tran, S.K. Ku, B.S. Shin, H.G. Choi, C.S. Yong, J. O. Kim, Systemic delivery of axitinib with nanohybrid liposomal nanoparticles inhibits hypoxic tumor growth, *J. Mater. Chem. B* 3 (2015) 408–416, <https://doi.org/10.1039/c4tb01442a>.
- [14] C.M. Dawidczyk, C. Kim, J.H. Park, L.M. Russell, K.H. Lee, M.G. Pomper, P. C. Searson, State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: lessons learned from FDA-approved nanomedicines, *J. Control. Release* 187 (2014) 133–144, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.036>.
- [15] M.A. Madni, M. Sarfraz, M. Rehman, M. Ahmad, N. Akhtar, S. Ahmad, N. Tahir, S. Ijaz, R. Al-Kassas, R. Löbenberg, Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 17 (2014) 401–426, <https://doi.org/10.18433/j3cp55>.
- [16] J.O. Silva, R.S. Fernandes, S.C.A. Lopes, V.N. Cardoso, E.A. Leite, G.D. Cassali, M. C. Marzola, D. Rubello, M.C. Oliveira, A.L.B. de Barros, pH-sensitive, long-circulating liposomes as an alternative tool to deliver doxorubicin into tumors: a feasibility animal study, *Mol. Imaging Biol.* 18 (2016) 898–904, <https://doi.org/10.1007/s11307-016-0964-7>.
- [17] F.N. Carlesso, R.S. Araújo, L.L. Fuscaldi, S.E.M. Miranda, D. Rubello, C.S. Teixeira, D.C. Dos Reis, E.A. Leite, J.N. Silveira, S.O.A. Fernandes, G.D. Cassali, M.C. De Oliveira, P.M. Colletti, A.L.B. de Barros, V.N. Cardoso, Preliminary data of the antipneumatic tumor efficacy and toxicity of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing cisplatin, *Nucl. Med. Commun.* 37 (2016) 727–734, <https://doi.org/10.1097/MNM.0000000000000505>.
- [18] M.S. Franco, C.A. Silva, E.A. Leite, J.N. Silveira, C.S. Teixeira, V.N. Cardoso, E. Ferreira, G.D. Cassali, A.L. Branco de Barros, M.C. Oliveira, Investigation of the antitumor activity and toxicity of cisplatin loaded pH-sensitive-pegylated liposomes in a triple negative breast cancer animal model, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 62 (2021), 102400, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102400>.
- [19] M.S. Franco, M.C. Roque, A.L.B. de Barros, J. de Oliveira Silva, G.D. Cassali, M. C. Oliveira, 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, *Biomed. Pharmacother.* 109 (2019) 1728–1739, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.011>.

- [20] S.B. dos Reis, J. de Oliveira Silva, F. Garcia-Fossa, E.A. Leite, A. Malachias, G. Pound-Lana, V.C.F. Mosqueira, M.C. Oliveira, A.L.B. de Barros, M.B. de Jesus, Mechanistic insights into the intracellular release of doxorubicin from pH-sensitive liposomes, *Biomed. Pharmacother.* 134 (2021), 110952, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110952>.
- [21] M.C. De Oliveira, V. Rosilio, P. Lesieur, C. Bourgaux, P. Couvreur, M. Ollivon, C. Dubernet, pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in excess water, *Biophys. Chem.* 87 (2000) 127–137, [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(00\)00180-0](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00180-0).
- [22] L.O.F. Monteiro, R.S. Fernandes, L. Castro, D. Reis, G.D. Cassali, F. Evangelista, C. Loures, A.P. Sabino, V. Cardoso, M.C. Oliveira, A. Branco De Barros, E.A. Leite, Paclitaxel-loaded folate-coated pH-sensitive liposomes enhance cellular uptake and antitumor activity, *Mol. Pharm.* 16 (2019) 3477–3488, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00329>.
- [23] Y. Lu, P.S. Low, Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 675–693, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00042-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00042-X).
- [24] D.C.F. Soares, V.N. Cardoso, A.L.B. De Barros, C.M. De Souza, G.D. Cassali, M.C. De Oliveira, G.A. Ramalhes, Antitumoral activity and toxicity of PEG-coated and PEG-folate-coated pH-sensitive liposomes containing 159Gd-DTPA-BMA in Ehrlich tumor bearing mice, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (2012) 58–64, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.018>.
- [25] J. de Oliveira Silva, R.S. Fernandes, C.M. Ramos Oda, T.H. Ferreira, A.F. Machado Botelho, M. Martins Melo, M.C. de Miranda, D. Assis Gomes, G. Dantas Cassali, D. M. Townsend, D. Rubello, M.C. Oliveira, A.L.B. de Barros, Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model, *Biomed. Pharmacother.* 118 (2019), 109323, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109323>.
- [26] A.A. Lohade, R.R. Jain, K. Iyer, S.K. Roy, H.H. Shimpi, Y. Pawar, M.G.R. Rajan, M. D. Menon, A novel folate-targeted nanoliposomal system of doxorubicin for cancer targeting, *AAPS PharmSciTech* 17 (2016) 1298–1311, <https://doi.org/10.1208/s12249-015-0462-2>.
- [27] Z.C. Soe, R.K. Thapa, W. Ou, M. Gautam, H.T. Nguyen, S.G. Jin, S.K. Ku, K.T. Oh, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, Folate receptor-mediated celastrol and irinotecan combination delivery using liposomes for effective chemotherapy, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 170 (2018) 718–728, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.013>.
- [28] A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13 (1965) 238–252, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6).
- [29] D. dos Santos Ferreira, B.L. Jesus de Oliveira Pinto, V. Kumar, V.N. Cardoso, S. O. Fernandes, C.M. Souza, G.D. Cassali, A. Moore, D.E. Sosnovik, C.T. Farrar, E. A. Leite, R.J. Alves, M.C. de Oliveira, A.R. Guimarães, P. Caravan, Evaluation of antitumor activity and cardiac toxicity of a bone-targeted pH-sensitive liposomal formulation in a bone metastasis tumor model in mice, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 13 (2017) 1693–1701, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.005>.
- [30] P.G. Tardi, R.C. Gallagher, S. Johnstone, N. Harasym, M. Webb, M.B. Bally, L. D. Mayer, Coencapsulation of irinotecan and flouxiridine into low cholesterol-containing liposomes that coordinate drug release in vivo, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1768 (2007) 678–687, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2006.11.014>.
- [31] J. de Oliveira Silva, S.E.M. Miranda, E.A. Leite, A. de Paula Sabino, K.B.G. Borges, V.N. Cardoso, G.D. Cassali, A.G. Guimarães, M.C. Oliveira, A.L.B. de Barros, Toxicological study of a new doxorubicin-loaded pH-sensitive liposome: a preclinical approach, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 352 (2018) 162–169, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.037>.
- [32] S.E.M. Miranda, J. de A. Lemos, R.S. Fernandes, J. de O. Silva, F.M. Ottoni, D. M. Townsend, D. Rubello, R.J. Alves, G.D. Cassali, L.A.M. Ferreira, A.L.B. de Barros, Enhanced antitumor efficacy of lapachol-loaded nanoemulsion in breast cancer tumor model, *Biomed. Pharmacother.* 133 (2021), 110936, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110936>.
- [33] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 1), *Trop. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 255–264, <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>.
- [34] D.C. Drummond, C.O. Noble, Z. Guo, K. Hong, J.W. Park, D.B. Kirpotin, Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy, *Cancer Res.* 66 (2006) 3271–3277, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4007>.
- [35] A. Casadó, M. Mora, M.L. Sagristá, S. Rello-Varona, P. Acedo, J.C. Stockert, M. Canete, A. Villanueva, Improved selectivity and cytotoxic effects of irinotecan via liposomal delivery: a comparative study on Hs68 and HeLa cells, *Eur. J. Pharm. Sci.* 109 (2017) 65–77, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.024>.
- [36] D.R. Khan, M.N. Webb, T.H. Cadotte, M.N. Gavette, Use of targeted liposome-based chemotherapeutics to treat breast cancer: supplementary issue: Targeted therapies in breast cancer treatment, *Breast Cancer Basic Clin. Res.* 9 (2015) 1–5, <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29421>.
- [37] S. Al-Mahmood, J. Sapiezynski, O.B. Garbuzenko, T. Minko, Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options, *Drug Deliv. Transl. Res.* 8 (2018) 1483–1507, <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>.
- [38] D.B. Fenske, P.R. Cullis, Liposomal nanomedicines, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 25–44, <https://doi.org/10.1517/17425247.5.1.25>.
- [39] K. Ghosh, C.K. Thodeti, A.C. Dudley, A. Mammoto, M. Klagsbrun, D.E. Ingber, Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 11305–11310, <https://doi.org/10.1073/pnas.0800835105>.
- [40] S.S. Nunes, R.S. Fernandes, C.H. Cavalcante, I. da Costa César, E.A. Leite, S.C. A. Lopes, A. Ferretti, D. Rubello, D.M. Townsend, M.C. de Oliveira, V.N. Cardoso, A.L.B. de Barros, Influence of PEG coating on the biodistribution and tumor accumulation of pH-sensitive liposomes, *Drug Deliv. Transl. Res.* 9 (2019) 123–130, <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0583-8>.
- [41] A.L.B. de Barros, L. das, G. Mota, D.C.F. Soares, M.M.A. Coelho, M.C. Oliveira, V. N. Cardoso, Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 7373–7375, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.016>.
- [42] A.L.B. De Barros, L. Das Graças Mota, M.M.A. Coelho, N.C.R. Corrêa, A.M. De Góes, M.C. Oliveira, V.N. Cardoso, Bombesin encapsulated in long-circulating pH-sensitive liposomes as a radiotracer for breast tumor identification, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 342–350, <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.1910>.
- [43] R.H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 161–177, [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4).
- [44] H. Cheng, J.L. Zhu, X. Zeng, Y. Jing, X.Z. Zhang, R.X. Zhuo, Targeted gene delivery mediated by folate-polyethylenimine-block-poly(ethylene glycol) with receptor selectivity, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 481–487, <https://doi.org/10.1021/bc8004057>.
- [45] D.C. Drummond, C. Marx, Z. Guo, G. Scott, C. Noble, D. Wang, M. Pallavicini, D. B. Kirpotin, C.C. Benz, Enhanced pharmacodynamic and antitumor properties of a histone deacetylase inhibitor encapsulated in liposomes or ErbB2-targeted immunoliposomes, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 3392–3401, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2445>.
- [46] G. Xu, W. Zhang, M.K. Ma, H.L. McLeod, Human carboxylesterase 2 is commonly expressed in tumor tissue and is correlated with activation of irinotecan, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 2605–2611, <https://doi.org/10.12171891>.
- [47] J. Van Ark-Otte, M.A. Kedde, W.J.F. Van der Vijgh, A.M.C. Dingemans, W.J. M. Jansen, H.M. Pinedo, E. Boven, G. Giaccone, Determinants of CPT-11 and SN-38 activities in human lung cancer cells, *Br. J. Cancer* 77 (1998) 2171–2176, <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.362>.
- [48] M. Han, C.X. He, Q.L. Fang, X.C. Yang, Y.Y. Diao, D.H. Xu, Q.J. He, Y.Z. Hu, W. Q. Liang, B. Yang, J.Q. Gao, A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo, *Pharm. Res.* 26 (2009) 926–935, <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9795-9>.
- [49] H. Kishimoto, M. Momiyama, R. Aki, H. Kimura, A. Suetsugu, M. Bouvet, T. Fujiwara, R.M. Hoffman, Development of a clinically-precise mouse model of rectal cancer, *PLoS One* 8 (2013), e79453, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079453>.
- [50] J.C. Castle, M. Loewer, S. Boegel, J. de Graaf, C. Bender, A.D. Tadmor, V. Boiguerin, T. Bukur, P. Sorn, C. Paret, M. Diken, S. Kreiter, Ö. Türeci, U. Sahin, Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma, *BMC Genom.* 15 (2014) 1–12, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-190>.
- [51] H. Shinohara, C.D. Bucana, J.J. Killian, I.J. Fidler, Intensified regression of colon cancer liver metastases in mice treated with irinotecan and the immunomodulator JBT 3002, *J. Immunother.* 23 (2000) 321–331, <https://doi.org/10.1097/00002371-200005000-00005>.
- [52] S.K. Sriraman, G. Salzano, C. Sarisozen, V. Torchilin, Anti-cancer activity of doxorubicin-loaded liposomes co-modified with transferrin and folic acid, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 105 (2016) 40–49, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.05.023>.
- [53] A. Gabizon, A.T. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, H. Shmeeda, S. Zalipsky, In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 6551–6559.
- [54] D. Goren, A.T. Horowitz, D. Tzemach, M. Tarshish, S. Zalipsky, A. Gabizon, Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1949–1957.
- [55] T. Boeig, M.B. Gois, P. de Souza, L.B. Somensi, D. de, M.G. Sant'Ana, L.M. da Silva, Irinotecan-induced intestinal mucositis in mice: a histopathological study, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 87 (2021) 327–336, <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04186-x>.
- [56] V. Juang, C.H. Chang, C.S. Wang, H.E. Wang, Y.L. Lo, pH-responsive PEG-shedding and targeting peptide-modified nanoparticles for dual-delivery of irinotecan and microRNA to enhance tumor-specific therapy, *Small* 15 (2019), 1903296, <https://doi.org/10.1002/smll.201903296>.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 102/2020

Título do projeto: Emprego de lipossomas pH-sensíveis funcionalizados com folato contendo irinotecano para o tratamento do câncer colorretal

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Andre Luis Branco de Barros

Unidade: Faculdade de Farmácia

Departamento: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Situação atual: Decisão Final - Aprovado

Aprovado na reunião "on line" do dia 08/06/2020. Validade: 08/06/2020 à 07/06/2025.
Belo Horizonte, 08/06/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br