

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

Marcus Vinícius de Melo Novais

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO NA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE  
DOXORRUBICINA E GLICOEVATROMONOSÍDEO COM AS HIDROXILAS DA  
GLICOSE PERACETILADAS CO-ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS  
FUSOGÊNICOS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA**

Belo Horizonte

2018

Marcus Vinícius de Melo Novais

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO NA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE  
DOXORRUBICINA E GLICOEVATROMONOSÍDEO COM AS HIDROXILAS DA  
GLICOSE PERACETILADAS CO-ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS  
FUSOGÊNICOS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA**

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

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mônica Cristina de Oliveira

Coorientadora: Dr<sup>ª</sup>. Sávvia Caldeira de Araújo Lopes

Belo Horizonte

2018

N935a Novais, Marcus Vinícius de Melo.  
Avaliação do efeito sinérgico na atividade citotóxica de doxorrubicina e glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas co-encapsulados em lipossomas fusogênicos de circulação prolongada [recurso eletrônico] / Marcus Vinícius de Melo Novais. – 2018.  
1 recurso eletrônico (104 f. : il.) : pdf

Orientadora: Mônica Cristina de Oliveira.  
Coorientadora: Sávvia Caldeira de Araújo Lopes.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Câncer – Teses. 2. Doxorrubicina – Teses. 3. Glicosídeos cardíacos – Teses. 4. Lipossomas – Teses. I. Oliveira, Mônica Cristina de. II. Lopes, Sávvia Caldeira de Araújo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.994



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



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO NA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE DOXORRUBICINA E GLICOEVATROMONOSÍDEO COM AS HIDROXILAS DA GLICOSE PERACETILADAS CO-ENCAPSULADOS EM LIPOSSOMAS FUSOGÊNICOS DE CIRCULAÇÃO PROLONGADA**

### MARCUS VINICIUS DE MELO NOVAIS

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

Aprovada em 22 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Mônica Cristina de Oliveira - Orientadora  
UFMG

  
Dra. Sávica Caldeira de Araújo Lopes - Coorientadora  
UFMG

  
Prof. Elaine Amaral Leite  
UFMG

  
Prof. Adriano de Paula Sabino  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2018.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”*

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar sabedoria e força para persistir, pelas bênçãos e graças concedidas em minhas jornadas para a concretização desse trabalho.

Aos meus pais, Mário e Fátima, pelo amor e apoio incondicional nas minhas decisões. Por todo esforço e dedicação para que eu conquiste todos os meus objetivos e sonhos. Vocês são maravilhosos.

Aos meus irmãos e a meu sobrinho, pela amizade, companheirismo e amor demonstrados a cada dia.

À Eliza, pelo amor, amizade, carinho, compreensão e pela participação efetiva para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À minha professora e orientadora Mônica, pela oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional durante a graduação e pós-graduação. Tenho muita sorte e orgulho de ter trabalhado em seu grupo de pesquisa. Obrigado pelo carinho, pelos conselhos, ensinamentos, disponibilidade e amizade ao longo desses anos. Você é um grande exemplo de profissionalismo e competência.

À minha coorientadora Sália, pela contribuição não apenas nesse trabalho, como durante toda minha formação. Sou imensamente grato por ter trabalhado ao seu lado.

A meu amigo Rummenigge por me permitir compartilhar as alegrias e pelo enorme apoio, mesmo nas situações mais adversas. Obrigado pelo carinho e pelos conselhos de sempre.

Aos professores do LTF e a professora Izabella, pelo interesse em contribuir com o trabalho.

Aos amigos do LTF, pela experiência compartilhada, pelo carinho e amizade.

Ao professor Rodrigo, pela experiência compartilhada e pela contribuição direta na realização desse trabalho.

Ao professor Dawidson, pela imensa disponibilidade e interesse. Agradeço por ter me recebido tão bem em seu laboratório.

Ao Marcelo, pelo enorme auxílio nos experimentos e na discussão dessa dissertação. Foi um grande prazer ter trabalhado ao seu lado.

Aos meus familiares, por todo apoio.

Aos meus amigos, pelos momentos compartilhados, pelo apoio e carinho.

À FAPEMIG, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, portanto, um problema de saúde pública. Dentre os tratamentos disponíveis para o câncer estão a intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Atualmente, a combinação de dois ou mais agentes antitumorais tem se tornado interessante para alcançar um efeito sinérgico na terapia do câncer. Dentre os fármacos disponíveis para a quimioterapia, a doxorubicina (DXR) apresenta uma potente ação antineoplásica e vem sendo utilizada no tratamento de diversos tumores. Entretanto, seu uso apresenta limitação, principalmente devido a cardiotoxicidade. Nesse contexto, sistemas nanoestruturados como os lipossomas vêm sendo desenvolvidos para o carregamento desse fármaco com o objetivo de promover o direcionamento para a região tumoral, uma vez que os tecidos tumorais apresentam maior permeabilidade e retenção para nanossistemas. Recentemente, os glicosídeos cardíacos como a digitoxina têm demonstrado um grande potencial antitumoral, contudo esses compostos apresentam baixo índice terapêutico o que pode limitar o seu uso. Além disso, alguns compostos dessa classe apresentam baixa solubilidade em água o que dificulta sua administração. Dessa maneira, os lipossomas, que são sistemas capazes de carrear fármacos hidrofílicos, lipofílicos e anfifílicos têm se mostrado como uma estratégia interessante para veiculação desses compostos, bem como para o direcionamento para a região tumoral. A proposta do presente trabalho consistiu no desenvolvimento de lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP) e DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), avaliação do sinergismo *in vitro* apresentado por essa formulação, estudo da estabilidade de armazenamento, perfil de liberação em pH fisiológico e ácido, e os ensaios de seletividade, *cumulative population doubling* (CPD), avaliação do ciclo celular e dos processos de morte envolvidos. A partir dos resultados do presente estudo, os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 apresentaram propriedades químicas e físico-químicas adequadas tais como, tamanho de  $193,9 \pm 9,3$  nm, índice de polidispersão (IP) de  $0,3 \pm 0,1$ , potencial zeta de  $-2,4 \pm 0,5$  mV e teor de encapsulação (TE) de GEVGP e DXR de  $67,5 \pm 11,1$  e  $104,2 \pm 12,0$ , respectivamente o que permitiu a obtenção da razão molar de 1:1. Essa formulação apresentou ainda índices de combinação menores que 1 na concentração inibitória de 90 % do crescimento

celular ( $CI_{90}$ ) para as três linhagens de tumor de mama humana avaliadas ( $0,52 \pm 0,39$  em MDA-MB-231,  $0,36 \pm 0,19$  em MCF-7 e  $0,73 \pm 0,40$  em SKBR-3), indicando um efeito citotóxico sinérgico da combinação de GEVGP e DXR encapsulada em lipossomas. Além disso, a formulação apresentou estabilidade de armazenamento por 90 dias em termos de diâmetro médio, IP, potencial zeta e TE de GEVGP e DXR, bem como houve uma baixa liberação de GEVGP e DXR a partir do estudo realizado por diálise durante 24 horas. Os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 apresentaram seletividade para as células tumorais testadas em comparação com fibroblastos humanos saudáveis. A avaliação do CPD demonstrou que as células sobreviventes após o tratamento com a formulação, não readquiriam a capacidade de proliferação após 21 dias. A partir dos estudos de avaliação de ciclo celular e processo de morte, pôde-se verificar que a formulação LpHS-GEVGP+DXR 1:1 promoveu a parada das células na fase G2/M e induziu baixas taxas de morte por apoptose e necrose, o que sugere que possa haver outro mecanismo de morte envolvido. Dessa maneira, os resultados dessa dissertação de mestrado sugerem que os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 podem se apresentar como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de mama.

**Palavras-chave:** câncer; doxorubicina; glicosídeos cardíacos; lipossomas; co-encapsulação.

## ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death in the world and thus a public health problem. Among treatments available for cancer are the surgery, radiotherapy and chemotherapy. Currently, the combination of two or more antitumor agents has become interesting to achieve a synergistic effect in cancer therapy. Doxorubicin (DXR) is a chemotherapeutic which has a potent antineoplastic action and has been used in the treatment of various tumors, however its use is limited, mainly due to cardiotoxicity. Therefore, nanostructured systems such as liposomes have been developed to carry this drug and target the tumor region, since tumor tissues present enhanced permeability and retention for nanosystems. Cardiac glycosides, such as digitoxin, have recently shown a great antitumor potential despite low therapeutic index which may limit their use. Furthermore, some compounds of this class have low water solubility which makes it difficult to administer. Hence, liposomes, which are systems capable of carrying hydrophilic, lipophilic and amphiphilic drugs, have been used as an interesting strategy for delivery of these compounds and targeting of the tumor region. The present work consisted in the development of fusogenic long-circulation liposomes containing glucoevatromonoside with the peracetylated glucose hydroxyls (GEVGP) and DXR in the molar ratio of 1: 1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), the evaluation of the synergism *in vitro* of this formulation, storage stability study, release profile of GEVGP and DXR from LpHS-GEVGP+DXR 1:1, determination of the selectivity index, cumulative population doubling (CPD), cell cycle and death pathways evaluation. From the results of the present study, LpHS-GEVGP+DXR 1:1 presented adequate chemical and physicochemical properties such as size of  $193, 9 \pm 9.3$  nm, polydispersity index (PI) of  $0.3 \pm 0.1$ , zeta potential of  $- 2.4 \pm 0.5$  mV and entrapment percentage (EP) of GEVGP and DXR of  $67.5 \pm 11.1$  and  $104.2 \pm 12.0$ , respectively which allowed the molar ratio of 1: 1 to be obtained. This formulation also presented combination index lower than 1 at concentration required to inhibit the growth of 90% ( $IC_{90}$ ) of three human breast tumor cell lines, such as: MDA-MB-231 ( $0.52 \pm 0.39$ ), MCF-7 ( $0.36 \pm 0.19$ ) and SKBR-3 ( $0.73 \pm 0.40$ ) in SKBR-3). These findings indicate a synergistic cytotoxic effect of the GEVGP and DXR combination encapsulated in liposomes. Moreover, the formulation showed good storage stability for 90 days in terms of mean diameter, PI, zeta potential, EP of GEVGP and DXR and presented reduced release of GEVGP and DXR from LpHS-GEVGP+DXR 1:1

after 24 hours. LpHS-GEVGP+DXR1:1 showed selectivity for the breast tumor cells tested compared to healthy human fibroblasts. Evaluation of CPD demonstrated that cells surviving after treatment with the LpHS-GEVGP+DXR1:1 did not recover the proliferation capacity after 21 days. From the studies of cell cycle and death pathways evaluation, the LpHS-GEVGP+DXR1:1 was able to arrest the cell cycle at G2/M phase and induced low death rates from apoptosis and necrosis, suggesting the existence other death process involved. Thereby the results of the present study suggest that LpHS-GEVGP+ DXR 1:1 may be a promising alternative for breast cancer treatment.

**Keywords:** câncer; doxorubicin; cardiac glycosides; liposomes; co-encapsulation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Características para formação e desenvolvimento do câncer.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2 – Tecido mamário normal.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3 – Estrutura química da doxorubicina.....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 4 – Mecanismos de ação da doxorubicina.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5 – Estrutura química dos glicosídeos cardíacos.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 6 – Mecanismos de ação propostos para os glicosídeos cardíacos.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 7 – Estrutura química do glicoevatromonosídeo.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 8 – Representação esquemática do efeito EPR (target passivo) e target ativo dos nanossistemas.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 9 – Organização estrutural dos lipossomas.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 10 – Classificação de lipossomas quanto ao tamanho e lamelaridade...39</b>	<b>39</b>
<b>Figura 11 – Esquema da formação das fases lamelar e hexagonal da DOPE ...41</b>	<b>41</b>
<b>Figura 12 – Estrutura química do glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 13 – Incorporação do cloridrato de DXR na formulação utilizando o método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 14 – Curva dose-resposta em células de câncer de mama MDA-MB-231 para os diferentes tratamentos.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 15 – Índice de combinação em diferentes frações afetadas para as combinações de GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 em células de câncer de mama MDA-MB-231.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 16 – Índice de combinação em diferentes frações afetadas para as combinações LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 em células de câncer de mam MDA-MB-231.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 17 – Variações do diâmetro médio e IP dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 durante 90 dias de armazenamento a 4 °C.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 18 – Variações do potencial zeta dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 durante 90 dias de armazenamento a 4°C.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 19 – Variações da concentração em mM de GEVGP e DXR nos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 durante 90 dias de armazenamento a 4°C.....</b>	<b>755</b>

<b>Figura 20 – Perfil de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 em pH 5 (linha azul) e pH 7,4 (linha vermelha) .....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 21 – Avaliação in vitro a longo prazo das células sobreviventes após os seguintes tratamentos nas respectivas concentrações de <math>CI_{50}</math>: GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão molar 1:1 e LpHS-Branco em células de câncer de mama MDA-MB-231 .....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 22 – Parâmetros relativos calculados a partir do estudo de CPD após os tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão 1:1 e LpHS-Branco, em células de câncer de mama MDA-MB-231 .....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 23 – Ciclo celular da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão molar de 1:1 e LpHS-Branco. Histograma obtido por citometria de fluxo.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 24 – Porcentagem das diferentes fases do ciclo em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão 1:1 e LpHS-Branco.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 25 – Perfil do processo de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 nas respectivas <math>CI_{50}</math> .....</b>	<b>8989</b>
<b>Figura 26 – Avaliação do processo de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 nas respectivas <math>CI_{50}</math> .....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 27 – Perfil do processo de morte em células MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR 1:1 e LpHS-Branco nas respectivas <math>CI_{90}</math> .....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 28 – Avaliação do processo de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 e LpHS-Branco nas respectivas <math>CI_{90}</math> .....</b>	<b>933</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 – Intervalos de concentração dos tratamentos para a determinação da citotoxicidade em células de câncer de mama.....</b>	<b>5348</b>
<b>Tabela 2 – Condições cromatográficas utilizadas no doseamento de GEVGP por CLAE.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas no doseamento de DXR por CLAE .....</b>	<b>4854</b>
<b>Tabela 4 – Intervalos de concentração dos tratamentos para a determinação da citotoxicidade utilizando células de câncer de mama.....</b>	<b>6556</b>
<b>Tabela 5 – Descrição do efeito observado para diferentes faixas de índice de combinação.....</b>	<b>66</b>
<b>Tabela 6 – Propriedades químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 7 – Propriedades químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVPG, LpHS-DXR e LpHS-branco .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Tabela 8 – Índice de combinação na <math>Cl_{90}</math> de GEVGP+DXR e dos LpHS-GEV+DXR na razão molar de 1:1 utilizando nas linhagens celulares MCF-7 e SKBR-3 .....</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 9 – Avaliação do diâmetro médio e IP dos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar 1:1 submetida ao estudo de perfil de liberação por diálise .....</b>	<b>77</b>
<b>Tabela 10 – Valores de índice de seletividade para linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 em relação à fibroblastos humanos saudáveis .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>B-raf</b>	Isoforma B da proteína raf
<b>BRCA1</b>	<i>Breast Cancer 1</i>
<b>CHEMS</b>	Hemisuccinato de coleslerila
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
<b>CI<sub>70</sub></b>	Concentração inibitória de 70% do crescimento celular
<b>CI<sub>90</sub></b>	Concentração inibitória de 90% do crescimento celular
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de alta eficiência
<b>CPD</b>	Duplicação cumulativa da população, do inglês <i>Cumulative Population Doubling</i>
<b>CQM</b>	Creatina quinase mitocondrial
<b>DOPE</b>	Dioleilfosfatidiletanolamina
<b>DSPE-mPEG</b>	Diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao metoxi-poliétilenoglicol 2000
<b>DXR</b>	Doxorrubicina
<b>EPR</b>	Efeito de permeabilidade e retenção aumentadas
<b>ER</b>	Receptor de estrogênio
<b>ERRO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>GC</b>	Glicosídeos cardíacos
<b>GEV</b>	Glicoevatromonosídeo
<b>GEVGP</b>	Glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas
<b>gpP</b>	Glicoproteína-P
<b>HER2</b>	Receptor de crescimento epidermal do tipo 2
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IC</b>	Índice de combinação

<b>IL – 8</b>	Interleucina 8
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IP</b>	Índice de polidispersão
<b>IS</b>	Índice de seletividade
<b>LpHS</b>	Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada
<b>LpHS-Branco</b>	Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada branco
<b>LpHS-DXR</b>	Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorubicina
<b>LpHS-GEV+DXR 1:1</b>	Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas e doxorubicina na razão molar de 1:1
<b>LpHS-GEVGP</b>	Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas
<b>LUV</b>	Vesículas unilamelares grandes
<b>MLV</b>	Vesículas multilamelares grandes
<b>NAD</b>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<b>NADH</b>	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
<b>NF- <math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear <i>Kappa B</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PD-L1</b>	Ligante do receptor de morte programada 1
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>rAUC</b>	Área sob a curva relativa
<b>RendCPD</b>	CPD final relativo
<b>RPR</b>	Taxa de proliferação relativa
<b>RTCT</b>	Tempo relativo para passar o <i>threshold</i>

<b>SFM</b>	Sistema fagocitário mononuclear
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>SUV</b>	Vesículas unilamelares pequenas
<b>TE</b>	Teor de encapsulação
<b>TEM</b>	Transição epitelial-mesenquimatosa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator crescimento transformador <i>beta</i>
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Fator crescimento transformador <i>alfa</i>
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Câncer .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.1 Câncer de mama.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Tratamento farmacológico do câncer.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1 Tratamento farmacológico do câncer de mama .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.1.1 Doxorrubicina .....</b>	<b>288</b>
<b>2.2.1.2 Glicoevatromonosídeo.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.2 Quimioterapia combinada para o tratamento do câncer .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Aplicação de sistemas nanoestruturados para a liberação de fármacos na região tumoral .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3.1 Lipossomas .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3.1.1 Lipossomas de circulação prolongada .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3.1.2 Lipossomas pH-sensíveis .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4 Co-encapsulação de fármacos em sistemas nanoestruturados .....</b>	<b>42</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>45</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Métodos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.1 Avaliação do efeito citotóxico de diferentes razões de GEVGP+DXR.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.1.1 Culturas Celulares.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.1.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio de Sulforrodamina B.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.1.3 Determinação do índice de combinação para as diferentes razões de GEVGP+DXR.....</b>	<b>49</b>

<b>4.2.2 Preparo dos lipossomas fusogênicos de circulação prolongada.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.2.1 Preparo dos lipossomas contendo GEVGP .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.2.2 Preparo dos lipossomas contendo DXR .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.2.3 Preparo dos lipossomas contendo GEVGP+DXR .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.3 Caracterização química e físico-química dos Lipossomas .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.3.1 Determinação do diâmetro médio, IP e do potencial zeta .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.3.2 Determinação do teor de encapsulação de GEVGP nos lipossomas .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2.3.3 Determinação do teor de encapsulação de DXR nos lipossomas .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.4 Estudo de estabilidade dos LpHSGEVGP+DXR .....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.5 Estudo do perfil de liberação de GEVGP e DXR a partir dos LpHS-GEVGP+DXR.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2.6 Avaliação da viabilidade celular dos lipossomas pelo ensaio de SRB .....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.7 Determinação do índice de combinação para GEVGP+DXR e LpHS-GEVGP+DXR.....</b>	<b>56</b>
<b>4.2.8 Seletividade .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.9 Cumulative population doubling.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.10 Avaliação do ciclo celular.....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.11 Avaliação da via de morte por citometria de fluxo .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Análise estatística .....</b>	<b>59</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Avaliação no efeito citotóxico de diferentes razões de GEVGP+DXR.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.1 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio de SRB.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.2 Determinação do IC para as diferentes razões de GEVGP+DXR .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2 Preparo dos lipossomas fusogênicos de circulação prolongada .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3 Determinação do IC para os LpHS-GEVGP+DXR razões molares de 1:1 e 5:1 .....</b>	<b>68</b>
<b>5.4 Estudo de estabilidade dos LpHSGEVGP+DXR 1:1 .....</b>	<b>72</b>

<b>5.5 Estudo do perfil de liberação de GEVGP e DXR a partir dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1.....</b>	<b>75</b>
<b>5.6 Seletividade .....</b>	<b>78</b>
<b>5.7 Cumulative population doubling.....</b>	<b>79</b>
<b>5.8 Avaliação do ciclo celular.....</b>	<b>83</b>
<b>5.9 Avaliação da via de morte celular.....</b>	<b>87</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>96</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e, portanto, um problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) os tipos de câncer mais incidentes no mundo são os de pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão), sendo o câncer de mama o mais prevalente nas mulheres e o de próstata nos homens. Para o Brasil, a estimativa para o biênio 2016 – 2017 era de 61 mil novos casos de câncer de próstata em homens e 58 mil casos de câncer de mama em mulheres (OMS, 2018; INCA, 2018). Além da grande incidência e prevalência, o câncer de mama é umas das principais causas de morbidade e mortalidade no sexo feminino e, dessa maneira, novas estratégias terapêuticas tornam-se necessárias, visando o aumento da sobrevida das pacientes após a terapia.

Geralmente, o tratamento do câncer é realizado através de intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Diversas classes de quimioterápicos são empregados no tratamento do câncer e, dentre elas, os antibióticos antitumorais como a daunorrubicina e a doxorrubicina (DXR) apresentam grande importância (SLINGERLAND *et al.*, 2013; UNNATI, 2013). A DXR vem sendo utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer e seu principal mecanismo de ação tem sido atribuído a sua capacidade de intercalar na hélice do DNA, bem como se ligar às proteínas envolvidas no processo de replicação como a topoisomerase II. Entretanto, a elevada toxicidade, principalmente cardíaca, relacionada a DXR, bem como os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células a esse fármaco têm limitado o seu uso (MEREDITH; CRISPIN, 2016; MINOTTI *et al.*, 2004; MEREDITH, 2016; LAGE, 2003). Com a intenção de minimizar os efeitos adversos da DXR a partir do direcionamento para a região tumoral, bem como contornar os problemas relacionados a resistência, vários sistemas nanoestruturados carreadores de DXR ou da combinação de DXR com outros agentes antineoplásicos têm sido desenvolvidos (NUÑES *et al.*, 2016).

Recentemente, os glicosídeos cardíacos (GC), que apresentam o uso tradicional no tratamento da insuficiência cardíaca, têm demonstrado um interessante potencial citotóxico (SLINGERLAND *et al.*, 2013; UNNATI *et al.*, 2013). Dentre os GC, o

glicoevatromonosídeo (GEV) apresentou elevada citotoxicidade frente a diversos tipos de linhagens celulares tumorais (CARVALHO, 2012). Os mecanismos citotóxicos desses compostos envolvem principalmente a inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  que pode levar a indução de apoptose (YU, 2003; ORRENIUS, 2003; MCCONKEY *et al.*, 2000). Apesar do potencial citotóxico, o baixo índice terapêutico dos GC apresenta-se como uma limitação para o uso na clínica. Nesse contexto, têm-se desenvolvido nanossistemas carreadores com o objetivo de promover o direcionamento e reduzir a toxicidade desses compostos (HODGINS, 2004).

Atualmente, a combinação de dois ou mais agentes antitumorais tem se tornado interessante para alcançar o efeito sinérgico na terapia do câncer. Nesse sentido, o desenvolvimento da nanotecnologia tem proporcionado uma excelente estratégia de combinação, permitindo a entrega simultânea de compostos para o local de interesse, mediante o uso de um único veículo. Além disso, as nanopartículas são consideradas veículos promissores de entrega de compostos biologicamente ativos para a terapia do câncer, com base na sua capacidade de prolongar o tempo de circulação, reduzir a toxicidade sistêmica e aumentar o acúmulo no sítio tumoral (CHOU, 2006; FAN *et al.*, 2010).

Dentre os diversos nanossistemas disponíveis, os lipossomas são sistemas versáteis que permitem a veiculação de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, bem como apresentam propriedades de direcionamento de fármacos para a região tumoral, podendo conseqüentemente aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade (NEW, 1990; SHI *et al.*, 2016).

Tendo em vista a utilização de sistemas carreadores para a co-encapsulação de substâncias bioativas, o desenvolvimento de lipossomas contendo DXR e um derivado de GC, torna-se interessante no sentido de aprimorar o efeito terapêutico desses agentes e proporcionar alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer de mama.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Câncer

O câncer é caracterizado por um crescimento descontrolado de células, que podem se espalhar e invadir outros tecidos e órgãos. Normalmente, o desenvolvimento de um tecido é regulado pelo equilíbrio entre células em estado de proliferação e células em repouso, sendo que a perda dessa regulação é determinante para o desenvolvimento do câncer. Sabe-se que o surgimento do câncer pode estar relacionado a fatores externos, como o tabaco, organismos infecciosos e dietas não saudáveis, bem como por fatores internos como mutações hereditárias, hormônios e condições imunes (BELKACÉMI *et al.*, 2007; WHO, 2018; ACS, 2018).

Weinberg e Hanahan descreveram um conjunto de características relacionadas ao desenvolvimento do câncer, que incluem a manutenção da sinalização proliferativa, a evasão de fatores supressores de crescimento, a invasão e metástase, a imortalidade replicativa, bem como a indução da angiogênese e a resistência aos mecanismos de morte celular. Atualmente, os mesmos autores descreveram a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição pelo sistema imune como duas novas características para o desenvolvimento do câncer. Além disso, foram descritos também dois fatores responsáveis por desencadear a formação de neoplasias, a instabilidade genômica e a promoção de tumores a partir de respostas inflamatórias (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG 2011).

**Figura 1 – Características para formação e desenvolvimento do câncer**



Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Conforme mencionado, nos tecidos normais há um controle bem estabelecido da produção e liberação de fatores de crescimento, que permitem a homeostase do número de células, garantindo a função e a manutenção da arquitetura. Durante o desenvolvimento da carcinogênese, as células podem adquirir a capacidade de manter a sinalização proliferativa por diferentes vias, como a partir da produção de fatores de crescimento e mutações somáticas em vias de sinalização intracelular. Atualmente, sabe-se que aproximadamente 40 % dos melanomas humanos contêm mutações que afetam a estrutura da proteína B-raf, resultando em uma proliferação celular descontrolada (DAVIES; SAMUELS, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Torna-se importante ressaltar ainda que, a proliferação celular descontrolada não envolve apenas a desregulação dos mecanismos de divisão celular, mas também alterações no metabolismo energético. Palova e Thompson organizaram recentemente essas alterações metabólicas em seis características, absorção desregulada de glicose e aminoácidos, modos oportunistas de aquisição de nutrientes, aumento da demanda de nitrogênio, alterações na regulação de genes relacionados a metabólitos e interações metabólicas com o microambiente, que permitem o desenvolvimento do tecido tumoral (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Além de induzir e sustentar os sinais de estimulação de crescimento, as células cancerígenas também desenvolvem mecanismos de evasão de fatores supressores de crescimento como as proteínas retinoblastoma, p53 e TGF- $\beta$  que regulam de forma inibitória a proliferação celular, permitindo assim o crescimento tumoral

(HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outra característica importante durante o desenvolvimento do câncer é o desequilíbrio que ocorre entre a proliferação celular e os processos de morte, tais como as vias apoptóticas. Esse comprometimento pode estar relacionado principalmente ao desequilíbrio entre os sinais de iniciação apoptóticos e os fatores antiapoptóticos da família de proteínas reguladoras Bcl-2 (FOUAD; AANEI, 2017).

A neovascularização também é de grande importância para a carcinogênese, uma vez que o tumor não ultrapassa 2 a 3 mm<sup>3</sup> sem a formação de uma nova vasculatura. A neovascularização está associada a alguns reguladores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial A (VEGF-A), uma proteína sinalizadora que se liga a receptores estimulatórios na superfície das células endoteliais vasculares, promovendo a formação de novos vasos (FOLKMAN, 1971; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As células tumorais apresentam ainda a capacidade de se disseminarem pelo organismo atingindo locais diferentes do tumor primário. É importante ressaltar que células epiteliais são imóveis e estreitamente aderidas entre si e com a matriz extracelular. A superação dessa imobilidade está relacionada à transição epitelial-mesenquimatosa (TEM) que permite que as células cancerosas possam migrar para novos sítios formando tumores secundários (YE; WEINBERG, 2015).

Após atingirem a corrente sanguínea, quase a totalidade das células tumorais são reconhecidas e eliminadas por linfócitos T. Conseqüentemente, menos de 0,1 % das células que atingem os vasos sanguíneos é capaz de se instalar em outros tecidos. Dessa maneira, as células que são capazes de evadir da detecção e eliminação imune crescem de forma descontrolada formando novos tumores (MALMBERG, 2004; MACK; MARSHALL, 2010).

Com base no documento *World Cancer Report 2014* da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é umas das principais causas de morte no mundo e, portanto, um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. Nesses países, é esperado que, nas próximas décadas, o impacto do câncer na população

corresponda a 80 % dos mais de 20 milhões de novos casos estimados em todo o mundo para 2025 (WHO, 2018; INCA, 2018).

A estimativa para o Brasil no biênio 2016 - 2017, apontou a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. De acordo com o perfil epidemiológico, os cânceres mais frequentes seriam os de próstata (61 mil) em homens e mama (58 mil) em mulheres (INCA, 2018).

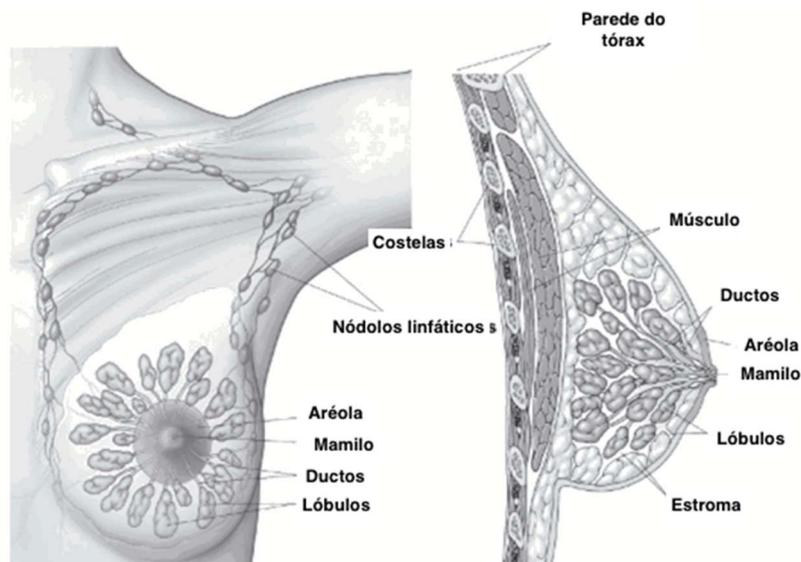
Atualmente, o câncer de mama é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no sexo feminino dentre todos os tipos de câncer. Sendo assim, o estudo de novas estratégias terapêuticas torna-se necessário, visando o aumento da sobrevida dos pacientes após a terapia.

### **2.1.1 Câncer de mama**

O câncer de mama é a neoplasia maligna não cutânea mais frequente no sexo feminino, com incidência crescente, sobretudo nos países desenvolvidos. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou que no ano de 2016 haveria 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil (INCA, 2018). Diversos fatores de risco relacionados ao câncer de mama têm sido constantemente identificados, e incluem o envelhecimento, fatores ligados à vida reprodutiva da mulher, histórico familiar, consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição a radiação, alta densidade de tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) e mutações genéticas (SILVA *et al.*, 2008; INCA, 2018).

A mama é composta por glândulas produtoras de leite (lóbulos), ductos, tecidos adiposo e conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 2). Diversos fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  estão envolvidos no desenvolvimento do tecido mamário. As glândulas exócrinas mamárias são responsáveis pela produção de leite após a parturição. Essas glândulas respondem ao estrogênio, bem como a fatores de crescimento alterando a arquitetura do tecido durante a pré-puberdade, puberdade, idade sexual, gravidez, lactação e pós-menopausa (MACIAS; HINCK, 2012; ACS, 2018).

**Figura 2 – Tecido mamário normal**



**Fonte: adaptado de ACS, 2018.**

A maioria dos cânceres de mama têm início nas células que compõem os ductos. O carcinoma invasivo de mama é um tumor capaz de migrar para tecidos adjacentes e possui grande tendência a metástases. As metástases originárias do câncer de mama atingem principalmente os ossos, pulmões e fígado (SILVA *et al.*, 2008). O surgimento do câncer de mama tem sido associado à inativação funcional do gene BRCA1, que codifica uma proteína que atua na glândula mamária realizando diversas funções. Nas células normais a proteína codificada pelo BRCA1 repara lesões no DNA, regula a transcrição, sinalização de estrogênio e inativação do cromossomo X. A inativação desse gene resulta em carcinomas mais agressivos, ocorrendo mais comumente em mulheres na pré-menopausa, com idade compreendida entre 30 a 40 anos (SILVA *et al.*, 2008).

O câncer de mama é uma doença heterogênea e difere muito entre os pacientes (intertumoral) e mesmo dentro de cada tumor (intratumoral). A heterogeneidade clínica e morfológica é refletida pelos diferentes estadiamentos e classificação histopatológica dos tumores (TURASHVILI; BROGI, 2017). Clinicamente, o câncer de mama é categorizado com base na existência de receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e receptor para o fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2). Os carcinomas de mama que não expressam ER, PR e HER2 são denominados triplo negativo. Este tipo de carcinoma constitui um grupo

extremamente heterogêneo histologicamente e geneticamente, além disso as possibilidades terapêuticas disponíveis não são eficientes (PARK *et al.*, 2011).

A elucidação dos mecanismos envolvidos na carcinogênese, bem como o estudo das características bioquímicas e histopatológicas são de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos e formulações com propriedades antitumorais.

## **2.2 Tratamento farmacológico do câncer**

O tratamento do câncer pode ser realizado através de intervenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Mais recentemente, tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfirínicos e a imunoterapia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma dessas modalidades de tratamento com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica (DOLMANS, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Uma das principais formas de intervenção médica no tratamento do câncer é a quimioterapia. Atualmente, diversas classes de antineoplásicos são empregados no tratamento do câncer tais como: os alquilantes polifuncionais, (mostarda nitrogenada, mostarda fenilalanina, ciclofosfamida, cisplatina e ifosfamida); os agentes antimetabólitos (6-mercaptopurina, 6- tioguanina, 5-fluorouracila, metotrexato e citosina-arabinosídeo C); os antibióticos antitumorais (mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, bleomicina, daunorrubicina, actinomicina D, doxorubicina (DXR) e seus análogos mitoxantrona e epirrubicina); os inibidores mitóticos como os alcalóides da vinca (vincristina, vimblastina e vindesina), o taxol e os derivados da podofilotoxina (etoposídeo e teniposídeo) (ALMEIDA *et al.*, 2005).

A maioria dos fármacos antitumorais tem a capacidade de destruir rapidamente as células cancerígenas *in vitro*. Contudo, a administração *in vivo* desses agentes quimioterápicos resulta em uma ação não específica, lesando também as células normais, em especial as células de rápido crescimento como as gastrointestinais, as capilares e as do sistema imunológico. Dessa maneira, o principal desafio consiste no desenvolvimento de agentes antineoplásicos com baixa toxicidade e elevada eficácia antitumoral (LEITE *et al.*, 2012; MARONI *et al.*, 2012; VANNEMAN; DRANOFF, 2012).

Os compostos derivados vegetais têm apresentado um papel importante no desenvolvimento de antitumorais. Os primeiros agentes terapêuticos utilizados na clínica foram os alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina, utilizados no tratamento de leucemias, linfomas, bem como nos tumores de mama e pulmão. Posteriormente, outros derivados vegetais como o paclitaxel e etoposídeo passaram a ser utilizados no tratamento do câncer. Atualmente, os glicosídeos cardíacos (GC) como a digoxina e digitoxina, vêm sendo estudados quanto ao seu potencial antitumoral (SLINGERLAND *et al.*, 2013; UNNATI, 2013).

### **2.2.1 Tratamento farmacológico do câncer de mama**

Os estádios iniciais do câncer de mama geralmente são tratados mediante a intervenção cirúrgica, sendo o tipo mais comum a mastectomia. Em certos casos, utiliza-se ainda a radioterapia como tratamento após os procedimentos cirúrgicos. Em relação à quimioterapia, é importante ressaltar que em diversos casos ela pode ser recomendada como terapia neoadjuvante (antes da cirurgia) ou ainda adjuvante (após a cirurgia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; ACS, 2018).

Os quimioterápicos mais utilizados incluem as antraciclina, como a DXR e a epirrubina, os taxanos como paclitaxel e docetaxel, além do 5-fluorouracil, ciclofosfamida e carboplatina. Utiliza-se ainda nos casos de câncer de mama avançado a cisplatina e a gencitabina, dentre outros fármacos (ACS, 2018).

Nos casos de câncer de mama ER positivo ou PR positivo, as opções de tratamento adjuvante geralmente são o tamoxifeno, um antagonista competitivo de estrogênio, ou inibidores de aromatase como o anastrozol. Podem ainda ser utilizados ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracila, DXR e taxanos. Já nos casos de carcinomas de mama que superexpressam HER2, geralmente utiliza-se o trastuzumabe, um anticorpo monoclonal anti-HER2. Alguns tratamentos associam um anticorpo monoclonal ao quimioterápico, permitindo assim a ligação específica e, conseqüentemente, maior liberação do fármaco na região tumoral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; NUÑES *et al.*, 2016).

O câncer de mama triplo negativo tende a ser o tipo mais agressivo. Uma vez que não pode ser utilizado a terapia receptor específico, é fundamental a utilização de quimioterápico, como DXR, paclitaxel e cisplatina. Atualmente, a imunoterapia

sistêmica, como os inibidores da ligação de PD-L1, pembrolizumab e nivolumab, vem sendo utilizada para erradicar células neoplásicas em casos de câncer de mama triplo negativo, a partir da estimulação do sistema imunológico (KATZ; ALSHREDI, 2018; ACS, 2018).

Atualmente, os GC têm demonstrado um importante potencial na utilização para o tratamento do câncer de mama. Tal potencial foi observado, inicialmente, por Stenkvisst e colaboradores que perceberam que as células das pacientes que recebiam digitálicos para tratamento da insuficiência cardíaca, apresentavam características mais benignas em relação às pacientes que não recebiam o tratamento. Stenkvisst demonstrou também que a recorrência dos tumores 5 anos após a mastectomia era 9,6 vezes maior nas pacientes que não recebiam o tratamento com digitálicos (STENKVIST *et al.*, 1979; STENKVIST *et al.*, 1980; STENKVIST *et al.*, 1982).

Sendo assim, uma vez que a DXR é um quimioterápico amplamente utilizado na clínica e os GC têm demonstrado boas propriedades antitumorais, o estudo desses compostos torna-se interessante do ponto de vista do desenvolvimento de novos fármacos e formulações, visando o aumento da disponibilidade de alternativas terapêuticas efetivas para o tratamento do câncer.

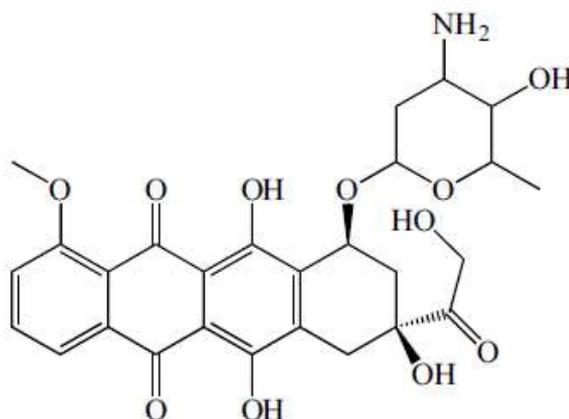
#### 2.2.1.1 Doxorrubicina

A DXR é um antibiótico antraciclínico com potente ação antineoplásica e amplo espectro de atividade, prescrito isoladamente ou em combinação com outros agentes (MINOTTI *et al.*, 2004). Frequentemente, a DXR tem sido utilizada no tratamento de leucemia aguda, câncer de mama, sarcomas de tecidos moles, linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Entretanto, apesar da alta eficácia, a DXR não é seletiva para células cancerígenas, e logo, seu uso é significativamente limitado devido à toxicidade. Essa toxicidade afeta, frequentemente, o coração, cérebro, fígado e rins (MEREDITH; CRISPIN, 2016).

A estrutura química da DXR (Figura 3) apresenta uma aglicona e um açúcar. A aglicona consiste em um anel tetracíclico com dois grupos adjacentes quinona-hidroquinona, um grupo metoxi e uma cadeia lateral curta contendo um grupamento carbonila. O açúcar, denominado daunosamina, está ligado ao anel por uma ligação

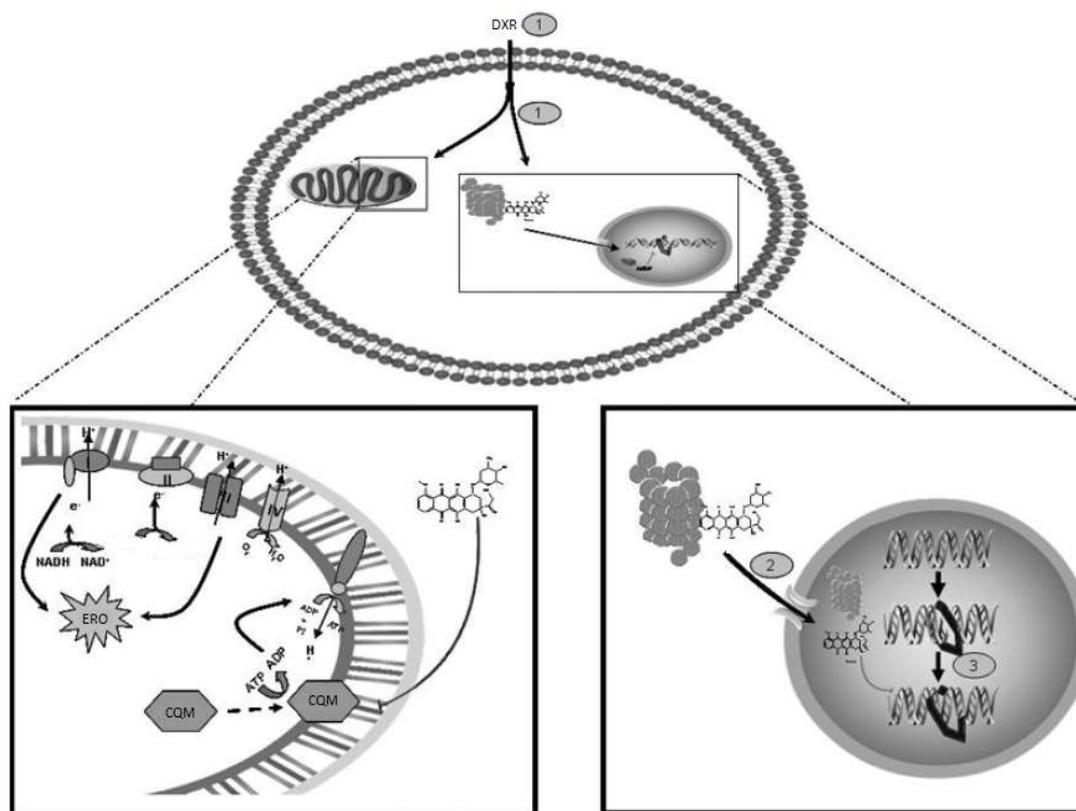
glicosídica. A daunosamina é responsável pela solubilidade aquosa da DXR, enquanto o anel tetracíclico corresponde à região hidrofóbica (MINOTTI *et al.*, 2004).

**Figura 3 – Estrutura química da doxorubicina**



Diversos mecanismos têm sido atribuídos à atividade antitumoral da DXR (Figura 4). Além da sua capacidade de se intercalar na hélice do DNA e se ligar às proteínas envolvidas no processo de replicação como a topoisomerase II, outro mecanismo de ação proposto está relacionado à habilidade da DXR em produzir radicais livres no interior da cadeia respiratória das mitocôndrias. A formação de radicais livres ocorre uma vez que esse fármaco pode atuar comoceptor de elétrons a partir de uma reação na presença de NADH desidrogenase. Tal reação resulta na formação de um radical semiquinona, que pode causar danos oxidativos ao DNA. Estudos recentes têm sugerido também que a atividade das antraciclinas seja modulada por proteossomas, responsáveis por transportar a molécula de DXR do citoplasma para o núcleo após a entrada na célula por difusão passiva. Uma vez no núcleo, a DXR é liberada do proteossoma e pode se intercalar com o DNA devido a alta afinidade (KIYOMIYA, 2001; MINOTTI *et al.*, 2004; MEREDITH, 2016, BOX, 2007).

**Figura 4 – Mecanismos de ação da doxorubicina**



A DXR se liga ao proteossoma e é transportada para o núcleo, onde se dissocia e se liga ao DNA (passos 1, 2 e 3). Um dos principais mecanismos de ação é a intercalação com a fita de DNA ou ligação às proteínas envolvidas na replicação e transcrição do material genético. Além disso, a DXR pode interagir com a mitocôndria se ligando a cardiolipina e bloqueando a ligação da creatina quinase mitocondrial (CQM). Adicionalmente, a presença de DXR na cadeia respiratória mitocondrial pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

Fonte: adaptado de CARVALHO *et al.*, 2009.

A especificidade mitocondrial da DXR tem sido relacionada a sua alta afinidade pela cardiolipina, um fosfolípide presente na membrana das mitocôndrias. Essa afinidade, além de desencadear mecanismos citotóxicos a partir da formação de ERO, também é responsável pela cardiotoxicidade causada por esse fármaco, uma vez que as células cardíacas apresentam grande quantidade de mitocôndrias. A cardiotoxicidade é um dos principais efeitos adversos relacionados a administração de DXR (GOORMAGHTIGH *et al.*, 1990; HOYE, 2008; PETRIOLI *et al.*, 2008).

Apesar de ser amplamente utilizada na clínica, a terapia convencional com DXR tem sido ineficiente devido ao desenvolvimento de resistência. Em diversos tumores as células não são sensíveis à DXR devido ao efluxo do fármaco, mediado principalmente pela glicoproteína P (gpP) (LAGE, 2003).

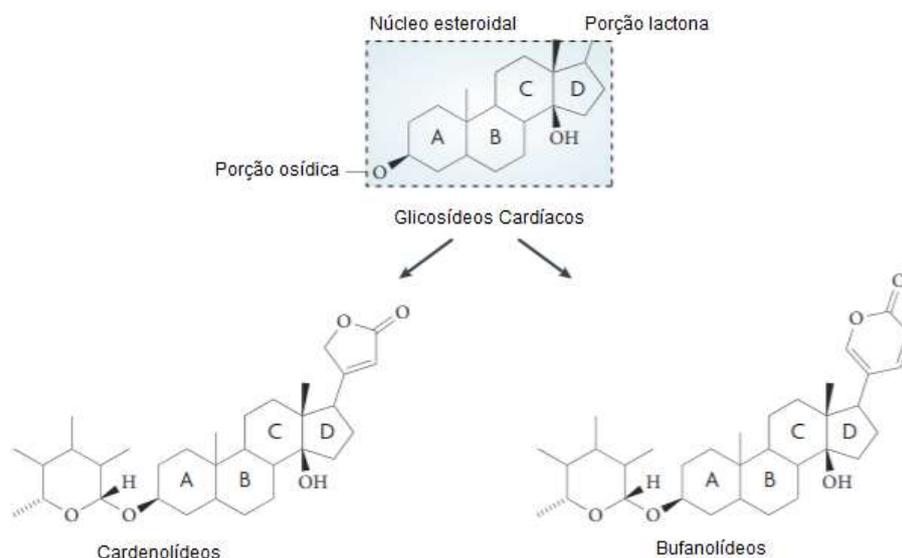
Recentemente, com a intenção de minimizar os efeitos adversos da DXR a partir do direcionamento para a região tumoral, bem como contornar os problemas relacionados a resistência, vários sistemas nanoestruturados carreadores de DXR ou da combinação de DXR com outros agentes antineoplásicos têm sido desenvolvidos (NUÑES *et al.*, 2016).

#### 2.2.1.2 Glicoevatromonosídeo

Os derivados vegetais vêm sendo utilizados no tratamento de diversas doenças humanas. Atualmente, mais de 50 % dos fármacos em uso clínico são de origem natural e muitos desses fármacos apresentam propriedades antitumorais. Dentre os compostos derivados vegetais, os GC, que apresentam o uso tradicional no tratamento da insuficiência cardíaca, têm demonstrado recentemente um interessante potencial citotóxico (SLINGERLAND *et al.*, 2013; UNNATI *et al.*, 2013).

Os GC são constituídos por um núcleo esteroidal duplamente substituído por um anel insaturado de lactona na posição 17 e um açúcar na posição 3 (Figura 5). A natureza da lactona caracteriza o subgrupo desses glicosídeos. Os cardenolídeos possuem um anel insaturado de cinco membros (butirolactona), enquanto os bufanolídeos apresentam um anel insaturado de seis membros (pirona). Diversos açúcares podem estar ligados a porção aglicona, sendo os mais comuns a glicose, galactose, manose, ramnose e digitalose. A adição desses açúcares pode afetar a farmacodinâmica, bem como o perfil farmacocinético desses compostos (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

**Figura 5 – Estrutura química dos glicosídeos cardíacos**



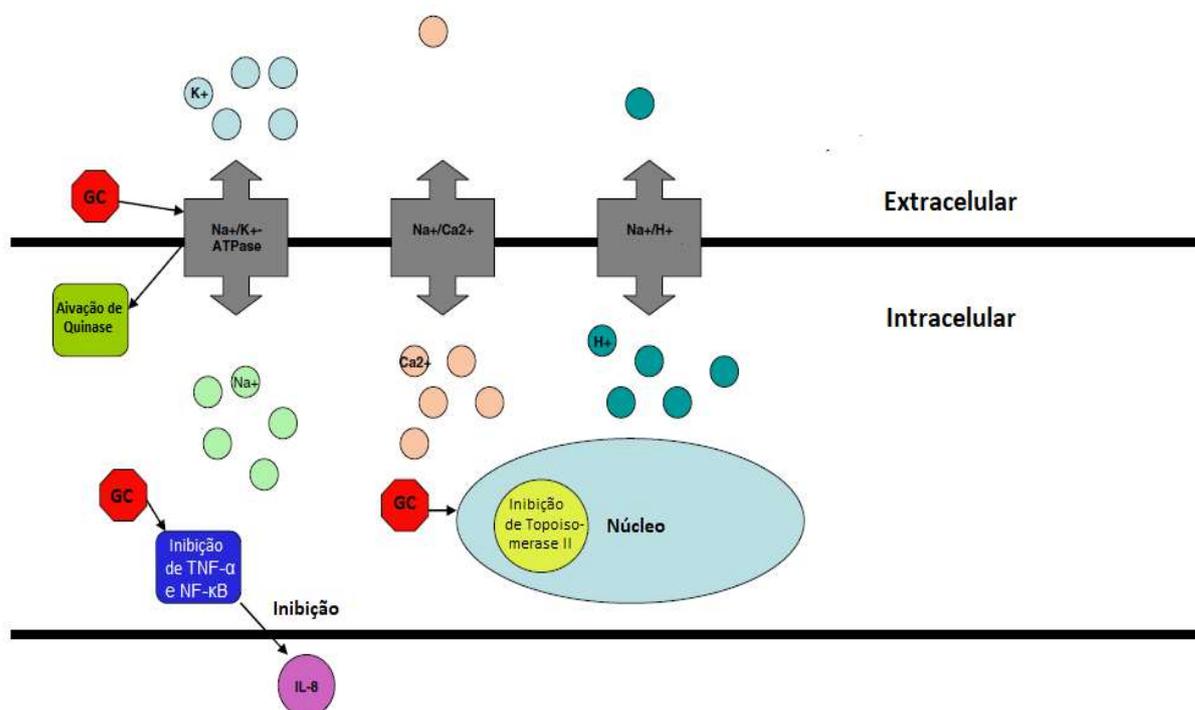
**Fonte: adaptado de PRASSAS; DIAMANDIS, 2008.**

O mecanismo de ação cardiotônica dos GC foi descrito há aproximadamente 50 anos, quando Schatzman e colaboradores identificaram esses compostos como inibidores específicos da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ . Essa bomba é uma proteína transmembrana que utiliza a energia proveniente da hidrólise de ATP para transportar ativamente íons potássio ( $\text{K}^+$ ) para o interior das células e íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) para o meio extracelular. A bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  também apresenta um importante papel na regulação do volume e pH citoplasmáticos por meio dos trocadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , bem como na condução de vários processos secundários, como o transporte de glicose e aminoácidos dependentes de  $\text{Na}^+$ . A inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  aumenta os níveis de  $\text{Na}^+$  no interior dos cardiomiócitos, e por consequência, promove um aumento da troca de  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , levando a maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, aumentando assim a força de contratilidade do coração (efeito inotrópico positivo). A ação exercida pelos GC possibilitou a utilização da digoxina e digitoxina como agentes de primeira linha no tratamento da insuficiência cardíaca (RAHIMTOOLA; TAK, 1996; SCHEINER-BOBIS, 2002; PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Conforme já mencionado, a partir dos estudos de Stenkvis e colaboradores nas décadas de 1960 e 1980, iniciou-se uma maior investigação do potencial antitumoral

dos GC. Atualmente, diversos possíveis mecanismos de ação antineoplásica dos GC vêm sendo descritos (Figura 6). Um desses mecanismos é que a inibição da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase promove a redução da concentração de  $\text{K}^+$ , bem como o aumento nas concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, o que pode levar a indução de apoptose a partir da clivagem de caspases, liberação de citocromo C e ativação de endonucleases (YU, 2003; ORRENIUS, 2003; MCCONKEY *et al.*, 2000). Outros mecanismos relacionados a atividade dos GC envolvem a acidificação celular, ativação de proteína quinase, inibição da produção de interleucina 8, que está envolvida na resistência à apoptose, angiogênese e metástase, assim como a inibição da produção de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , o que resulta em indução de apoptose (JUNCKER *et al.*, 2009; LIANG *et al.*, 2007). Estudos recentes têm demonstrado ainda que a digitoxina pode promover a inibição de topoisomerase II. Além disso os GC podem levar ao acúmulo de células na fase S e G2/M do ciclo celular, bem como promover a indução de morte autofágica (SLINGERLAND *et al.*, 2013; JUNCKER *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2005).

**Figura 6 – Mecanismos de ação propostos para os glicosídeos cardíacos**



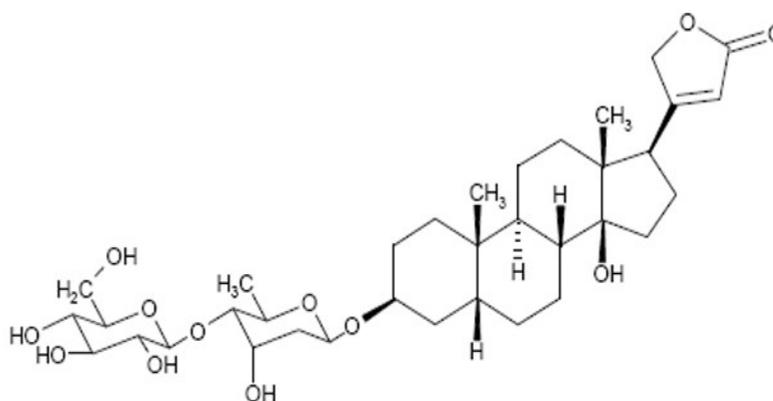
Fonte: adaptado de SLINGERLAND, 2013.

Alguns derivados de GC já se encontram em fase de estudo clínico para o tratamento do câncer, como derivados da espécie *Nerium oleander*, a digoxina e um

cardenolídeo semissintético derivado da oxovuscarina extraído da espécie *Calotropis procera* (SLINGERLAND, 2013; JUNCKER *et al.*, 2009; MENGER *et al.*, 2013).

Em uma triagem realizada com uma série de cardenolídeos de origem vegetal e semissintética, avaliou-se o potencial citotóxico desses compostos em células tumorais de pulmão e rabiomiossarcoma. Nesse estudo, o glicoevatromonosídeo (GEV) apresentou maior citotoxicidade e seletividade dentre os compostos testados. Além disso, o GEV promoveu a parada do ciclo celular na fase G2M, bem como alteração na expressão de proteínas das vias de morte celular como NF-κB em células de tumor de pulmão (CARVALHO, 2012). Devido a complexidade estrutural do GEV (Figura 7), a síntese completa desse composto torna-se difícil. O GEV pode ser isolado em pequena escala a partir das espécies de *Digitalis lanata*, bem como *Digitalis heywoodii*. Munkert e colaboradores obtiveram o GEV a partir da biotransformação e semissíntese de precursores desse cardenolídeo obtidos em maiores quantidades a partir da espécie de *Digitalis lanata* (MUNKERT *et al.*, 2017).

**Figura 7 – Estrutura química do glicoevatromonosídeo**



Fonte: adaptado de CARVALHO, 2012.

Devido ao baixo índice terapêutico, o uso de GC deve ser monitorado com cuidado e a adoção de estratégias para reduzir sua toxicidade é de grande relevância. Nesse contexto, nanossistemas carreadores lipossomais contendo digoxina, digitoxina e oleandrina, apresentaram menor toxicidade sistêmica, além de direcionamento à região tumoral e maior eficácia antitumoral em relação aos GC administrados na forma não encapsulada (HODGINS, 2004).

Portanto, tendo em vista o grande potencial citotóxico do GEV, os trabalhos realizados para a otimização da produção em larga escala desse composto, bem como os sistemas desenvolvidos para a redução da toxicidade, torna-se interessante o seu estudo para a obtenção de novas formulações com potencial terapêutico no tratamento do câncer.

### **2.2.2 Quimioterapia combinada para o tratamento do câncer**

A combinação de dois ou mais agentes antitumorais tem se tornado interessante para alcançar o efeito sinérgico na terapia do câncer. Diversos fatores tais como a exposição sequencial ou simultânea dos agentes ao tecido tumoral, a cinética de ativação dos fármacos, individualmente, e a compatibilidade química, precisam ser considerados para selecionar a melhor estratégia de combinação (FAN *et al.*, 2010). A utilização de múltiplos fármacos, que apresentam diferentes mecanismos de ação, pode aumentar a eficácia do efeito terapêutico, assim como reduzir a dose utilizada, minimizando os efeitos adversos e o desenvolvimento da resistência (CHOU, 2006).

As combinações de fármacos antitumorais podem atuar de maneira sinérgica, aditiva ou antagônica dependendo dos compostos associados, bem como da razão utilizada para a combinação. Apesar dessa relação ser facilmente avaliada *in vitro*, onde as razões podem ser bem controladas, torna-se difícil a correlação dessas informações para comportamentos *in vivo*, uma vez que a farmacocinética dos compostos individuais pode ser diferente (PAVILLARD *et al.*, 2001; MAYER *et al.*, 2006).

Nesse contexto, o desenvolvimento da nanotecnologia tem proporcionado uma estratégia de combinação, permitindo a entrega simultânea de compostos para o local de interesse mediante o uso de um único veículo. Além disso, as nanopartículas são consideradas veículos promissores de entrega de compostos biologicamente ativos para a terapia do câncer com base na sua capacidade de prolongar o tempo de circulação, reduzir a toxicidade sistêmica e aumentar o acúmulo no sítio tumoral.

## **2.3 Aplicação de sistemas nanoestruturados para a liberação de fármacos na região tumoral**

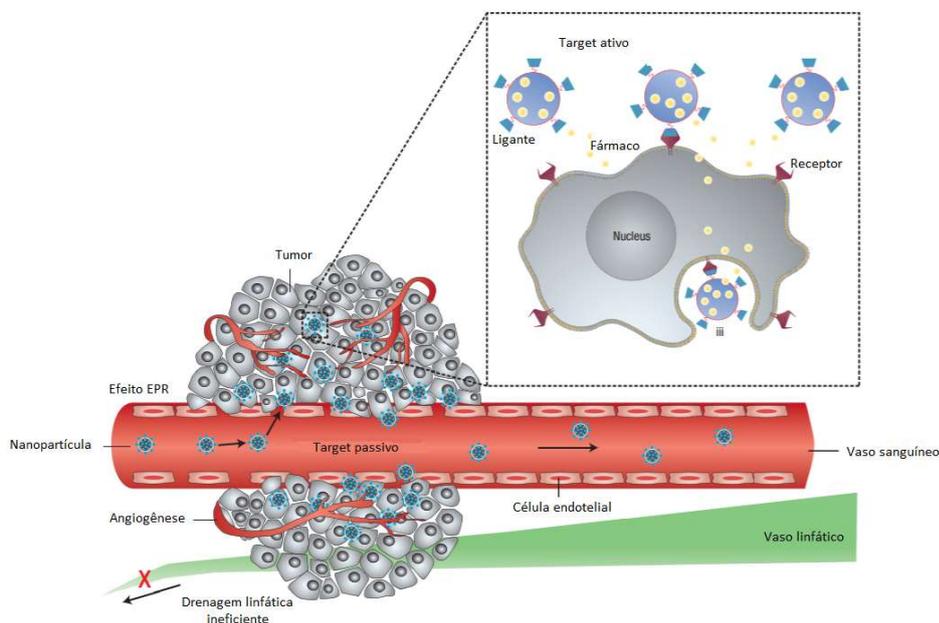
O crescente interesse na utilização da nanotecnologia para o câncer é atribuído em

grande parte à sua excelente característica de entrega de fármacos, possibilidade de uso em diagnóstico e a natureza terapêutica de alguns nanomateriais. Diversos nanossistemas tais como lipossomas, nanopartículas de albumina e micelas poliméricas já foram aprovados para o tratamento do câncer e vários outros estão em investigação clínica em diferentes modalidades terapêuticas como quimioterapia, hipertermia, radioterapia, terapia de RNA interferente e imunoterapia (SHI *et al.*, 2016; FERRARI, 2005).

A maioria das nanopartículas terapêuticas são administradas sistemicamente. Os capilares sanguíneos contínuos ou fenestrados, em tecidos saudáveis, apresentam permeabilidade restrita de acordo com o peso molecular. Entretanto, em tecidos tumorais há um aumento na permeabilidade vascular, o que possibilita o extravasamento dos nanocarreadores. Esse aumento da permeabilidade em tumores é consequência da formação rápida e defeituosa de novos vasos sanguíneos. Além disso, a drenagem linfática ineficiente retém os nanossistemas na região tumoral. Esse mecanismo é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (Figura 8) e possibilita uma entrega seletiva da substância bioativa incorporada em nanossistemas (*target* passivo) na região tumoral (TORCHILIN, 2007; WONG *et al.*, 2007, PEER *et al.*, 2007).

Diversos fatores podem influenciar biologicamente o efeito EPR tais como a ligação das nanoestruturas a proteínas plasmáticas, o tempo de circulação sanguínea, o extravasamento e interação com o microambiente tumoral, a penetração no tecido tumoral e a internalização celular. Além disso, características da nanopartícula, como tamanho, geometria, rigidez, porosidade, composição e presença de ligantes (*target* ativo) também podem influenciar nesse processo e consequentemente nos resultados terapêuticos (PEER *et al.*, 2007).

**Figura 8 – Representação esquemática do efeito EPR (target passivo) e target ativo dos nanossistemas**



**Fonte: adaptado de PEER *et al.*, 2007.**

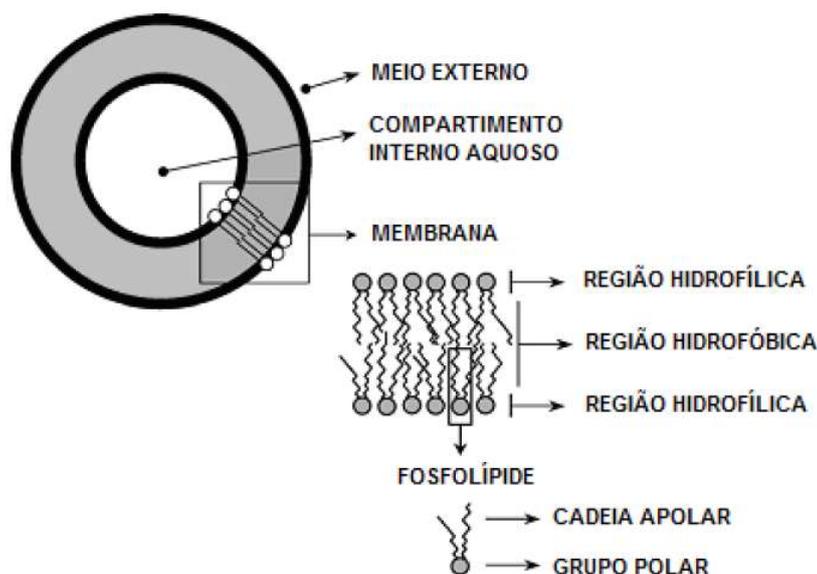
Conforme descrito anteriormente, a nanotecnologia tem contribuído de forma importante para a oncologia nas últimas décadas. Os lipossomas (como exemplo os lipossomas contendo DXR) Doxil<sup>®</sup> e Myocet<sup>®</sup>, foram as primeiras nanopartículas terapêuticas a receber aprovação para uso clínico no câncer. A partir de então, diversos sistemas nanoestruturados foram aprovados para uso clínico como lipossomas contendo daunorrubicina (DaunoXome<sup>®</sup>), lipossomas contendo vincristina (Marqibo<sup>®</sup>), nanopartículas de albumina contendo paclitaxel (Abraxane<sup>®</sup>), micelas poliméricas contendo paclitaxel (Genexol<sup>®</sup>PM) e diversos outros encontram-se em alguma etapa de estudo clínico como lipossomas contendo cisplatina e lipossomas contendo paclitaxel (SHI *et al.*, 2016).

Dessa maneira, dentre os diversos sistemas nanoestruturados utilizados, os lipossomas têm apresentado relevância significativa no carregamento e direcionamento de substâncias antitumorais e apresentam-se como uma excelente estratégia no desenvolvimento de novas formulações para serem utilizadas no tratamento do câncer.

### 2.3.1 Lipossomas

Lipossomas são vesículas esféricas que se organizam espontaneamente em meio aquoso, constituídas geralmente por uma ou mais camadas fosfolípídicas e orientadas concentricamente em torno de um compartimento aquoso (Figura 9) (NEW, 1990; LASIC, 1998).

**Figura 9 – Organização estrutural dos lipossomas**



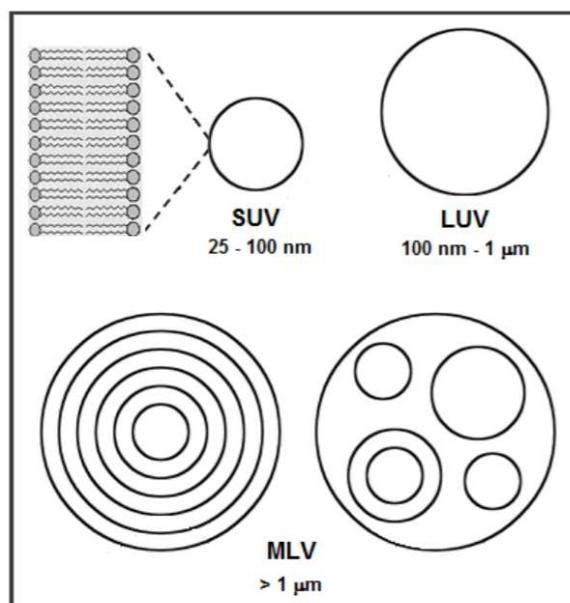
Fonte: adaptado de FREZARD, 2007.

Estes sistemas foram descritos pela primeira vez por Bangham e colaboradores em 1965 como modelo de membranas biológicas. Devido à propriedade anfífilica dos fosfolípidos presentes na bicamada, os lipossomas são capazes de incorporar substâncias de caráter hidrofílico em seu compartimento aquoso, substâncias lipofílicas no interior da bicamada lipídica e substâncias anfífilicas na interface entre o compartimento aquoso e a bicamada lipídica (NEW, 1990).

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas como tamanho, lamelaridade, carga superficial e composição lipídica. De acordo com o diâmetro das vesículas e lamelaridade, as principais formas reconhecidas são: (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV), que são formadas por uma única bicamada lipídica e apresentam diâmetro médio entre 25 a 100 nm; (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV), quando apresentam uma única bicamada

lipídica e o diâmetro médio das vesículas é maior que 100 nm: (iii) vesículas multilamelares grandes (MLV), que são formados por várias bicamadas sucessivas separadas por compartimentos aquosos e que apresentam diâmetro médio entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  (Figura 10) (NEW, 1990; LOPES *et al.*, 2013).

**Figura 10 – Classificação de lipossomas quanto ao tamanho e lamelaridade**



Fonte: adaptado de LOPES *et al.*, 2013.

De acordo com a carga dos lípidos presentes na constituição das bicamadas, os lipossomas podem adquirir diferentes cargas em sua superfície, sendo classificados como catiônicos, aniônicos ou neutros. Uma ferramenta bastante utilizada para determinação da carga e, com isso, para a detecção da magnitude de interações repulsivas entre as partículas coloidais, é a medida do potencial zeta das vesículas (CASALS *et al.*, 2003).

Os lipossomas podem ser classificados ainda em convencionais ou de circulação prolongada. Os lipossomas convencionais geralmente são constituídos por fosfolípidos e colesterol, podendo-se utilizar um fosfolípido carregado positiva ou negativamente para promover a repulsão eletrostática entre as vesículas e, com isso, aumentar a estabilidade. Quando administrados por via endovenosa estes lipossomas podem ser reconhecidos pelas opsoninas, o que permite sua captação por órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo fígado, baço e

medula óssea, sendo então rapidamente removidos da circulação sanguínea (VEMURI; RHODES, 1995).

Com o objetivo de promover o escape dos lipossomas dos mecanismos de captação extracelulares e aumentar o tempo de circulação, várias alterações na constituição da bicamada lipídica têm sido propostas.

#### 2.3.1.1 Lipossomas de circulação prolongada

Os lipossomas de circulação prolongada podem ser obtidos por diferentes métodos, incluindo o revestimento da superfície lipossomal com polímeros hidrofílicos sintéticos, como os polietilenoglicóis (PEG) ou compostos hidrofílicos naturais, como o monossialogangliosídeo GM1 e fosfatidilinositol. A camada hidrofílica desses polímeros forma uma “cabeleira” envolvendo os lipossomas, dificultando seu reconhecimento e associação com as opsoninas. Com isso, os lipossomas são capturados mais lentamente pelos órgãos do SFM, permanecendo por mais tempo em circulação na corrente sanguínea (TORCHILIN, 2007).

Uma alternativa para promover o escape de lipossomas do reconhecimento pelo SFM é a utilização de lipossomas pequenos, neutros e com membrana rígida. Entretanto, esse tipo de lipossoma tem sérias desvantagens como sistema de liberação de fármacos, que incluem: pequeno volume interno de encapsulação, aumento do diâmetro das vesículas durante armazenamento, poucas substâncias disponíveis para esse tipo de formulação e perfil farmacocinético dose-dependente (PAPAHADJOPOULOS; GABIZON., 1995).

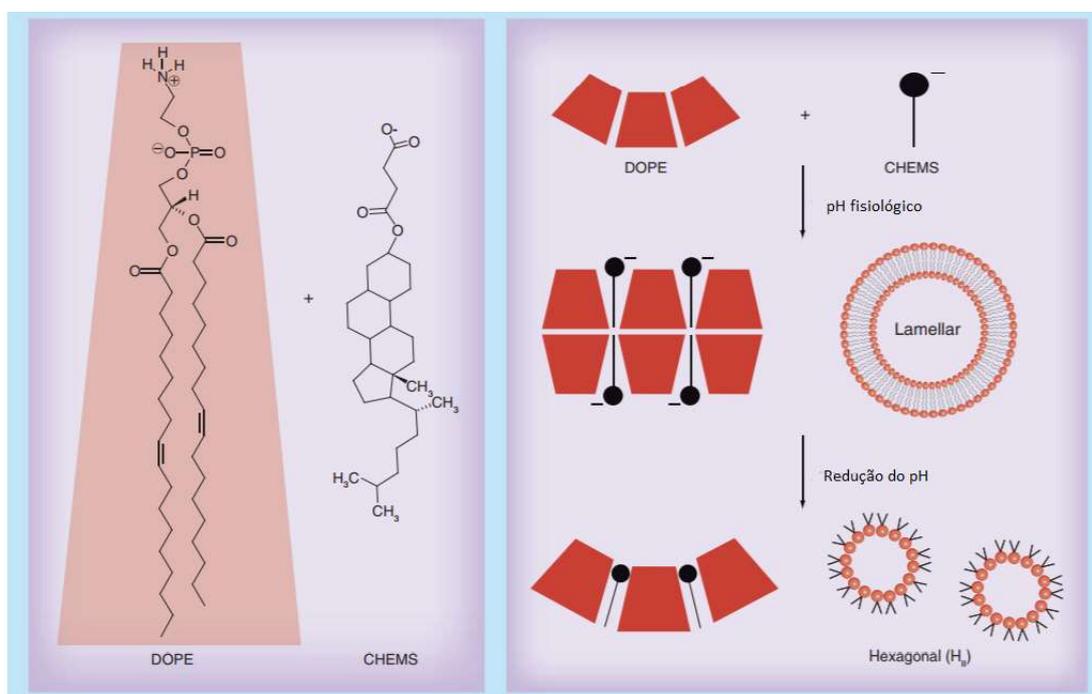
Na tentativa de direcionar os sistemas lipossomais para seus sítios específicos, bem como aumentar a liberação do fármaco nessas regiões, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas em busca de novos sistemas carreadores. Os lipossomas polimórficos, por exemplo, apresentam mudanças em sua estrutura devido a alterações como temperatura e pH. Um dos lipossomas polimórficos bastante estudados são os lipossomas pH-sensíveis (BATISTA *et al.*, 2007).

#### 2.3.1.2 Lipossomas pH-sensíveis

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE) como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE).

Esses derivados organizam-se em meio aquoso, na temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de formar vesículas. Sendo assim, para a formação dos lipossomas, é necessária a adição de moléculas estabilizadoras de membrana, geralmente grupos carboxilados como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico encontram-se sob a forma ionizada, aniônica. Ao se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, os grupos carboxilados promovem repulsão eletrostática com os grupos fosfatos dos fosfolípides, favorecendo a formação de bicamadas (Figura 11) (SIEGEL, 1986).

**Figura 11 – Esquema da formação das fases lamelar e hexagonal da DOPE**



Fonte: adaptado de FERREIRA *et al.*, 2013.

Os lipossomas pH-sensíveis têm sido utilizados como sistema de liberação de fármacos em tecidos tumorais e no interior dos endossomas, uma vez que esses tecidos e compartimentos apresentam uma redução do pH. Essa redução promove a protonação dos grupos carboxilados, levando à desestruturação da bicamada lipídica, e conseqüentemente, à liberação do fármaco no sítio específico. Os mecanismos moleculares pelos quais os lipossomas transpõem a membrana endossomal para alcançarem o citoplasma ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, algumas hipóteses são postuladas para explicar esse processo. Uma

primeira hipótese propõe que após a endocitose, a membrana dos lipossomas pH-sensíveis pode se fundir à membrana endossomal havendo a liberação do material encapsulado para o citoplasma, sendo que esse processo ocorre devido às propriedades fusogênicas da bicamada constituída pela DOPE. Outra possibilidade é que após a desestabilização dos lipossomas, as moléculas encapsuladas se difundam pela membrana endossomal para o citoplasma. Por fim, sugere-se que a desestabilização dos lipossomas pH-sensíveis promova o início da desestabilização da membrana endossomal, provavelmente pela formação de poros, que conduz à liberação do conteúdo encapsulado para o citoplasma (SIMÕES *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2013).

Recentemente, os nanocarreadores lipídicos, dentre eles os lipossomas, têm ganhado cada vez mais atenção devido à sua capacidade para co-encapsular agentes terapêuticos e sincronizar a entrega para sítios específicos.

#### **2.4 Co-encapsulação de fármacos em sistemas nanoestruturados**

Atualmente, a combinação de fármacos antitumorais tem se apresentado viável. Entretanto, a entrega desses fármacos ao sítio específico continua sendo um grande desafio. Nesse contexto, a utilização de nanossistemas pode proporcionar diversas vantagens na combinação de agentes antitumorais, tais como: aumento do tempo de meia-vida, proteção do composto contra degradação, redução da imunogenicidade, veiculação de compostos hidrofóbicos, hidrofílicos e anfifílicos simultaneamente, direcionamento para a região tumoral, promoção da captação celular e do tráfego intracelular apropriado, obtenção de efeito sinérgico entre os compostos e liberação simultânea dos compostos no alvo. Todas essas propriedades podem aumentar a eficácia dos agentes antitumorais, bem como reduzir a toxicidade (ELDAR-BOOCK *et al.*, 2013).

A escolha do nanossistema torna-se, portanto, importante para eficácia da terapia combinada. Sendo assim, a seleção deve ser realizada de acordo com as propriedades físico-químicas das moléculas utilizadas, com a intenção de explorar diferentes características tais como carga, hidrofobicidade e reações de conjugação com sítios específicos. Com base nessas características, diferentes nanossistemas têm sido utilizados para cada combinação (ELDAR-BOOCK *et al.*, 2013).

Várias estratégias têm sido adotadas para o desenvolvimento de sistemas lipossomais como alternativa para a co-encapsulação de agentes antitumorais. Diversos estudos têm demonstrado que a co-encapsulação em lipossomas promoveu o aumento das atividades antitumoral, citotóxica e antiproliferativa, bem como a redução da toxicidade sistêmica. Além disso, esses sistemas têm apresentado ainda a capacidade de reverter a resistência à fármacos desenvolvida por algumas células cancerígenas (VAHED, 2013).

Wang e colaboradores desenvolveram uma formulação lipossomal contendo salinomicina e DXR para o tratamento de células de carcinoma de mama. Essa formulação apresentou maior efeito na inibição do crescimento das células em relação a associação não encapsulada (KIM *et al.*, 2015).

No trabalho de Chiu e colaboradores foi desenvolvida uma formulação lipossomal co-encapsulando DXR e irinotecano e avaliada a eficácia dessa formulação em modelo xenográfico de tumor de ovário humano. A formulação promoveu o aumento da sobrevida dos animais, o que foi justificado pela manutenção da razão molar encapsulada na circulação sanguínea, bem como pelo maior tempo de exposição ao tumor (SHAIKH *et al.*, 2013).

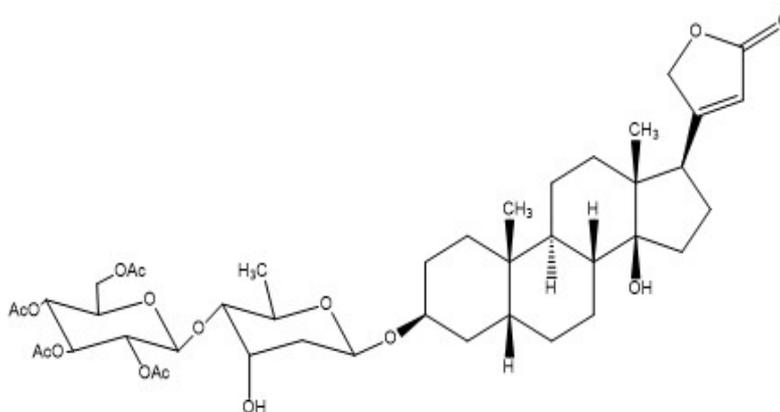
Resultados do recente estudo de fase III de lipossomas contendo citarabina e daunorrubicina na razão molar de 5:1 (Vyxeos, também conhecido como CPX-351), demonstraram que a administração dessa formulação aumentou a sobrevida dos pacientes com leucemia mielóide aguda para 9,56 meses em relação a 5,95 meses obtido com o regime de tratamento com citarabina e daunorrubicina livres (SHI *et al.*, 2016).

Sendo assim, tendo em vista os diversos estudos utilizando sistemas carreadores para a co-encapsulação de substâncias bioativas e uma vez que a DXR e o GEV apresentam características físico-químicas diferentes, bem como diferentes mecanismos de ação antitumoral, o desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada contendo essas duas substâncias torna-se interessante no sentido de aprimorar o efeito terapêutico desses agentes.

Para a encapsulação no sistema lipossomal foi selecionado um composto intermediário da síntese do GEV, o glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da

glicose peracetiladas (GEVGP) (Figura 12). A presença dos grupos acetil aumenta a lipofilia desse composto em relação ao GEV, o que pode promover maior eficiência de encapsulação, bem como maior estabilidade de armazenamento uma vez que o GEVGP interage fortemente com a bicamada lipídica dos lipossomas.

**Figura 12 – Estrutura química do glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas**



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar química e físico-quimicamente e avaliar a estabilidade de uma formulação de lipossomas fusogênicos de circulação prolongada, contendo GEVGP e DXR (LpHS-GEVGP+DXR) co-encapsulados, bem como avaliar o sinergismo na atividade citotóxica em linhagens de células de câncer de mama humana.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e determinar a melhor razão de sinergismo entre GEVGP e DXR sob a forma livre, para ser co-encapsulada em lipossomas fusogênicos de circulação prolongada (LpHS);
- Desenvolver e caracterizar os LpHS-GEVGP+DXR, a partir da determinação do diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão (IP) das vesículas, bem como pelo teor de encapsulação (TE) de GEVGP e DXR;
- Avaliar a estabilidade química e físico-química dos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1);
- Avaliar o perfil de liberação do GEVGP e DXR, a partir dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1, em pH 5,0 e pH 7,4;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos individuais, combinação dos compostos livres nas razões molares de 1:1, 1:5 e 5:1, lipossomas contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), lipossomas contendo DXR (LpHS-DXR) e LpHS-GEVGP+DXR frente às células tumorais humanas das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e SKBR-3;
- Determinar a seletividade da combinação dos compostos livres na razão molar de 1:1 e LpHS-GEVGP+DXR 1:1 nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e SKBR-3 em comparação com culturas primárias de fibroblastos humanos saudáveis.
- Avaliar o efeito antiproliferativo a longo prazo dos compostos individuais, combinação dos compostos livres na razão molar de 1:1 (GEVGP+DXR 1:1), LpHS-GEVGP, LpHS-DXR e LpHS-GEVGP+DXR 1:1 frente às células MDA-MB-231, a partir do estudo de *Cumulative Population Doubling* (CPD);

- Avaliar a influência no ciclo celular, bem como a via de morte dos compostos individuais, combinação livre GEVGP+DXR 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR e LpHS-GEVEP+DXR 1:1 frente às células MDA-MB-231;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

A DOPE e o diestearoilfosfatidiletanolamina acoplado ao polietilenoglicol 200 (DSPE-mPEG<sub>2000</sub>) foram comprados da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). O CHEMS, hidróxido de sódio, o ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico (HEPES), bicarbonato de sódio, tripsina, sulforrodamina B (SRB), tris(hidroximetil)aminometan (tris base), DXR, sulfato de amônio foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, EUA). O TO-PRO-3 e o kit de detecção de Anexina-V-FITC foram adquiridos da Life Technologies (Eugene, Oregon, EUA). A solução de RNase foi adquirida da Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). O GEVGP foi cedido gentilmente pelo Professor Dr. Rodrigo Maia de Pádua, do Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG (Belo Horizonte, Brasil). O meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB), penicilina, estreptomicina e anfotericina foram adquiridos da Gibco® (Grand Island, NE, EUA). A acetonitrila (ACN) de grau analítico para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o cloreto de sódio e o fosfato de sódio dibásico heptahidratado foram obtidos da Merck (Frankfurter, Alemanha). Clorofórmio P.A., tween 80 e dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil). O álcool isopropílico de grau analítico para CLAE, fosfato de potássio monobásico anidro P.A e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Células das linhagens tumorais MCF-7 (ATCC® HTB22™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™) e SKBR-3 (ATCC® HTB30™) foram adquiridas da ATCC (Manassas, EUA). Fibroblastos humanos não-tumorais oriundos de cultura primária de tecido gengival humano foram isolados pela Dra. Ariadne Cruz e cedidos gentilmente pela professora Dr<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, número 021/2009).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Avaliação do efeito citotóxico de diferentes razões de GEVGP+DXR

#### 4.2.1.1 Culturas Celulares

A atividade citotóxica foi avaliada na linhagem celular de tumor de mama humana MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™). As células foram cultivadas em meio DMEM, com adição de bicarbonato de sódio, penicilina, estreptomicina e anfotericina (PSA) e suplementado com 10% (v/v) de SFB (meio completo). As células foram mantidas em garrafas T-75, armazenadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. As subculturas para as linhagens celulares eram realizadas quando as garrafas de cultura atingiam uma confluência aproximada de 80%.

#### 4.2.1.2 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio de Sulforrodamina B

Para o ensaio, as células foram coletadas nas garrafas de cultura por meio da adição de tripsina, que posteriormente foi inativada com meio completo. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e a suspensão celular foi semeada em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após esse período, soluções de GEVGP livre, DXR livre, combinação de GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1, 1:5 e 5:1 foram adicionadas (Tabela 1), sem retirada do meio, aos respectivos poços e novamente mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante por 48 horas.

**Tabela 1 – Intervalos de concentração dos tratamentos para a determinação da citotoxicidade em células de câncer de mama**

Tratamento	Intervalo de concentração dos compostos/ $\mu$ M	
	GEVGP	DXR
GEVGP	0,0078 – 2,0	-
DXR	-	0,0312 – 32,0
Combinação GEVGP+DXR razão molar 1:1	0,005 – 1,28	0,005 – 1,28
Combinação GEVGP+DXR razão molar 1:5	0,002 – 0,128	0,01 – 0,640
Combinação GEVGP+DXR razão molar 5:1	0,008 – 0,640	0,002 – 0,128

**Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP).**

Após o período de tratamento, adicionou-se 100 µL de ácido tricloroacético 10 % (p/v) em cada poço para fixação das células. Em seguida, as placas foram mantidas a 4 °C por 1 hora. Após a fixação, lavou-se os poços com água destilada e secou-se as placas em temperatura ambiente. Após as placas estarem totalmente secas, adicionou-se 100 µL da solução de sulforrodamina B (SRB) 0,057 % (p/v) em cada poço e manteve-se a placa em temperatura ambiente por 30 minutos para coloração das células. Em seguida, lavou-se as células com solução de ácido acético 1 % (v/v) para remover o corante não ligado às proteínas. Novamente, as placas foram mantidas a temperatura ambiente para secagem. Após totalmente secas adicionou-se 100 µL da solução de Tris-base 10 mM (pH 10,5) em cada poço para solubilizar o corante ligado as proteínas celulares. Posteriormente, realizou-se a leitura no comprimento de onda de 510 nm em espectrofotômetro de placas modelo Spectra Max Flux 384, da marca Molecular Devices®, utilizando o *software* Softmax Pro 6.51®. Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens celulares diferentes. Para o cálculo de determinação de citotoxicidade subtraiu-se todos os valores de absorbância do controle de Tris-base dos demais valores da placa. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela porcentagem de absorbância de cada grupo tratado em relação ao controle de células (isento de tratamento), que foi considerado como 100% de viabilidade celular. Os percentuais de viabilidade celular foram transferidos para o *software* de estatística GraphPad Prism 6 e, por meio de análise de regressão não linear, foram determinadas as curvas de viabilidade celular.

#### 4.2.1.3 Determinação do índice de combinação para as diferentes razões de GEVGP+DXR

Para a determinação do efeito da combinação de dois compostos é necessário determinar previamente a potência, bem como a forma da curva dose-efeito de cada composto. Sendo assim, torna-se necessário conhecer parâmetros para os compostos livres, bem como para a combinação tais como:  $m$ , que determina o formato da curva (por exemplo  $m > 1$ , indica uma curva sigmoideal),  $D_m$ , que representa a dose que corresponde ao efeito médio obtido pelo composto (exemplo  $Cl_{50}$ ) e  $r$ , que corresponde ao coeficiente de correlação linear. Portanto, os experimentos de citotoxicidade com os compostos livres, assim como com a

combinação devem ser realizados. Em seguida, determina-se o índice de combinação (IC) de acordo com a equação abaixo:

$$IC = [(D)1/(Dx)1] + [(D)2/(Dx)2]$$

onde, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> representam as doses dos compostos 1 e 2, respectivamente, utilizados na combinação para induzir o efeito definido (por exemplo 90 % de morte celular). Dx<sub>1</sub> e Dx<sub>2</sub> correspondem as doses dos compostos 1 e 2, respectivamente, necessária para obter o mesmo efeito quando os fármacos são utilizados livremente. Os valores de IC podem ser obtidos inserindo os resultados de viabilidade celular nos *softwares* CompuSyn<sup>®</sup> ou CalcuSyn<sup>®</sup>. Os valores de IC > 1 indicam antagonismo (o efeito da combinação é menor que a soma dos efeitos dos compostos individuais), valores de IC < 1 correspondem a uma combinação sinérgica (o efeito da combinação é maior que a soma dos efeitos dos compostos individuais), já os valores de IC próximos a 1 indicam um efeito aditivo, em que o efeito da combinação é igual a soma dos efeitos para os compostos individuais (CHOU, 2006).

Dessa forma, os dados de viabilidade celular obtidos a partir do ensaio de SRB para os tratamentos GEVGP livre, DXR livre e combinação de GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1, 1:5 e 5:1, foram submetidos a análise de efeitos médios e IC utilizando o *software* CompuSyn<sup>®</sup> (versão 1, Paramus, NJ, EUA).

#### **4.2.2 Preparo dos lipossomas fusogênicos de circulação prolongada**

##### 4.2.2.1 Preparo dos lipossomas contendo GEVGP

Os lipossomas foram preparados pela técnica de hidratação do filme lipídico (Bangham, 1965), seguido da calibração de tamanho por sonicação. Inicialmente, foram preparadas soluções clorofórmicas de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG<sub>2000</sub> e, em seguida, alíquotas dessas soluções (razão molar igual a 5,7: 3,8: 0,5, respectivamente, e concentração lipídica total igual a 10 mM) foram transferidas para um balão de fundo redondo e submetidas à evaporação do solvente em rotavapor da marca Buchi Labortechnik AG, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça), em banho maria a 30 °C e rotação de 150 rpm. Em seguida, adicionou-se ao filme lipídico uma solução de NaOH (0,228 M) em quantidade equimolar ao CHEMS para promover ionização

completa dos grupamentos carboxilatos. Solubilizou-se então o filme, após a ionização das moléculas de CHEMS, em clorofórmio e adicionou-se uma solução clorofórmica contendo GEVGP (concentração final de 0,5 mg/mL). O composto foi adicionado após a ionização das moléculas de CHEMS, pois o contato com o NaOH poderia promover a hidrólise do GEVGP. A solução foi novamente submetida à evaporação sob as mesmas condições descritas anteriormente. O filme lipídico final foi hidratado à temperatura ambiente com solução de sulfato de amônio (300 mM, pH 7,4), com auxílio de um mini-shaker Ika, modelo MS1 (Staufen, Alemanha). A redução do tamanho das vesículas multilamelares foi realizada por sonicação durante 5 minutos em amplitude de 21%, utilizando o sonicador da marca Cole Parmer® modelo CPX500. O material não encapsulado foi removido por centrifugação em centrífuga baby Thermo Scientific® modelo 11210801, a 5000 rpm por 1 minuto. Em seguida, os lipossomas foram mantidos em diálise *overnight*, utilizando membrana de celulose com cut-off de 10 KDa da marca Sigma (EUA), em tampão HEPES pH 7,4 como fase receptora para retirada do sulfato de amônio externo. Os lipossomas brancos foram preparados seguindo as mesmas etapas descritas acima sem adição de GEVGP e a hidratação com a solução de sulfato de amônio foi realizada logo após a adição da solução de NaOH, ou seja, o filme lipídico formado não foi novamente solubilizado em clorofórmio.

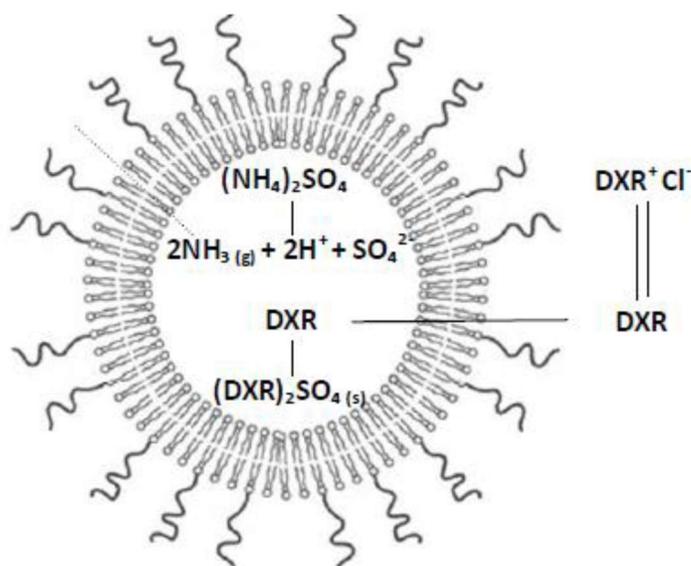
#### 4.2.2.2 Preparo dos lipossomas contendo DXR

A obtenção do filme lipídico foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.1. Em seguida, adicionou-se ao filme lipídico uma solução de NaOH (0,228M) e hidratou-se à temperatura ambiente com solução de sulfato de amônio (300 mM, pH 7,4), com auxílio de um mini-shaker Ika, modelo MS1 (Staufen, Alemanha). A redução do tamanho das vesículas multilamelares foi realizada por sonicação e, em seguida, os lipossomas foram mantidos em diálise *overnight*, conforme descrito no item 4.2.2.1.

Para a incorporação da DXR na formulação foi utilizado o método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio (Figura 13). A cada mL de dispersão coloidal adicionou-se 2 mg de cloridrato de DXR, a partir de uma solução aquosa na concentração de 30 mg/mL. Em seguida, manteve-se a formulação em contato com a DXR por 2 horas em temperatura ambiente e então, os lipossomas foram novamente dialisados *overnight*, utilizando membrana de celulose com cut-off de 10

KDa da marca Sigma (EUA) em tampão HEPES pH 7,4 para remoção da DXR não encapsulada.

**Figura 13 – Incorporação do cloridrato de DXR na formulação utilizando o método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio**



Fonte: adaptado de FERREIRA, 2015.

#### 4.2.2.3 Preparo dos lipossomas contendo GEVGP+DXR

Inicialmente, os lipossomas contendo GEVGP foram preparados conforme o item 4.2.2.1. Após a determinação do teor de GEVGP por CLAE, foi determinada a quantidade de cloridrato de DXR a ser adicionada para preparar lipossomas contendo as seguintes razões molares de GEVGP:DXR: 1:1 e 5:1. A encapsulação da DXR foi realizada pelo método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio conforme o método descrito no item 4.2.2.2. Posteriormente, determinou-se novamente o TE de GEVGP e DXR nos lipossomas.

#### 4.2.3 Caracterização química e físico-química dos lipossomas

Os lipossomas foram caracterizados quanto ao diâmetro médio, IP, potencial zeta e TE, conforme os métodos descritos a seguir.

##### 4.2.3.1 Determinação do diâmetro médio, IP e do potencial zeta

As análises de diâmetro médio e do IP das vesículas foram realizadas pela técnica

de espalhamento dinâmico da luz à 25 °C e ângulo de 90° utilizando o equipamento Malvern Zeta Sizer nano series ZS90 (Malvern, Inglaterra). O potencial zeta foi avaliado por espalhamento dinâmico da luz associado à mobilidade eletroforética, em ângulo de 90° utilizando o mesmo equipamento descrito acima. Para a medida dos parâmetros descritos, 50 µL de lipossomas foram diluídos em 1 mL de tampão HEPES pH 7,4 filtrado em membrana 0,45 µm. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como a média ± desvio padrão.

#### 4.2.3.2 Determinação do teor de encapsulação de GEVGP nos lipossomas

Para a determinação do TE de GEVGP nos lipossomas foi utilizado um equipamento Agilent 1260 Infinity, composto por uma bomba modelo G1311B, auto-injetor G1329B, forno de coluna G1316A e detector G4212B (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), monitorado por um computador utilizando um *software* Agilent OpenLab CDS EZChrom®. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2 – Condições cromatográficas utilizadas no doseamento de GEVGP por CLAE**

Parâmetros	Especificação
Concentração de trabalho	6 µg/mL de GEVGP
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	16,0 minutos
Comprimento de onda de detecção	220 nm
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/min
Coluna cromatográfica	C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)
Temperatura da coluna cromatográfica	40 °C
Diluyente	Acetonitrila
Fase móvel	Solução Acetonitrila:água 30:70 (v/v) até 6 minutos, 95:5 até 12,5 minutos, 30:70 até 16 minutos.

Inicialmente, a membrana lipídica dos lipossomas foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:5, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída em ACN e injetada no cromatógrafo. O teor de GEVGP foi determinado nos lipossomas antes (GEVGP total) e após centrifugação (GEVGP encapsulado) e calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TE(GEVGP) (\%) = \frac{[GEVGP] \text{ lipossoma purificado}}{[GEVGP] \text{ lipossoma total}} \times 100$$

#### 4.2.3.3 Determinação do teor de encapsulação de DXR nos lipossomas

Para o doseamento de DXR o aparato cromatográfico foi constituído de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus. Os dados foram monitorados por um computador utilizando o *software* Empower Pro® versão 6.00.00.00. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 3. O material eluído foi analisado com o uso de um detector de fluorescência modelo 2475 (Waters Instruments, Milford, EUA).

**Tabela 3 – Condições cromatográficas utilizadas no doseamento de DXR por CLAE**

Parâmetros	Especificação
Concentração de trabalho	0,4 µg/mL de DXR
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	7,0 minutos
Comprimento de onda de excitação	470 nm
Comprimento de onda de emissão	555 nm
Fluxo da fase móvel	1,0 mL/min
Coluna cromatográfica	C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)
Temperatura da coluna cromatográfica	25 °C
Diluyente	Solução metanol:tampão fosfato 0,01 M pH 3,0; 65:35 (v/v), respectivamente
Fase móvel	Solução metanol:tampão fosfato 0,01 M pH 3,0;65:35 (v/v), respectivamente

Inicialmente, a membrana lipídica dos lipossomas foi aberta com álcool isopropílico na proporção 1:5, respectivamente, e em seguida, a preparação foi diluída em fase móvel e injetada no cromatógrafo. O TE da DXR foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$TE(DXR) (\%) = \frac{[DXR] \text{ lipossoma purificado}}{[DXR] \text{ lipossoma total}} \times 100$$

#### **4.2.4 Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP+DXR**

Para a determinação da estabilidade de armazenamento dos LpHS-GEVGP+DXR, as amostras foram mantidas em geladeira, entre 4 °C a 8 °C, em frascos de penicilina âmbar e atmosfera de nitrogênio. A estabilidade da formulação foi avaliada nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 90 dias. Em cada tempo do estudo, as amostras foram caracterizadas quanto à concentração de GEVGP e DXR retido nas vesículas, diâmetro médio, IP e potencial zeta. Para o doseamento do GEVGP e DXR, as amostras foram submetidas a centrifugação a 25 °C, 5000 rpm durante 1 minuto para a retirada do GEVGP não encapsulado (sob forma precipitada) e dialisadas *overnight*, utilizando membrana de celulose com cut-off de 10 KDa da marca Sigma (EUA), em tampão HEPES pH 7,4, para retiradas do GEVGP e DXR não encapsulados solúveis na fase externa, antes da análise por CLAE.

#### **4.2.5 Estudo do perfil de liberação de GEVGP e DXR a partir dos LpHS-GEVGP+DXR**

A determinação do perfil de liberação foi realizada em soluções de pH 5,0 e pH 7,4 com o objetivo de avaliar a pH sensibilidade dos LpHS-GEVGP+DXR. O estudo foi realizado de maneira semelhante para as duas condições avaliadas, conforme descrito a seguir. Foram adicionados 370 µL de formulação em membrana de celulose com cut-off de 10 KDa da marca Sigma (EUA), a qual teve as duas extremidades vedadas. A membrana foi inserida em um frasco âmbar contendo 100 mL de tampão HEPES acrescido de Tween 80 1 % (p/v) para garantir a condição *sink* para o GEVGP (185 µg de GEVGP em 100 mL do tampão descrito acima). O pH do tampão HEPES foi ajustado para os valores descritos utilizando as soluções de NaOH (1 M) ou HCl (1 M). Foram preparados frascos para cada tempo investigado (1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas). Os frascos foram mantidos em agitador orbital na incubadora IKA KS 4000 i control (Xangai, China) a 37 °C, sob agitação de 156 rpm. Posteriormente, a cada tempo de investigação, uma amostra foi retirada do interior da membrana de diálise para a sua caracterização. Foram avaliados o diâmetro médio, IP, potencial zeta e teor de GEVGP e DXR. Foram realizados três experimentos independentes para cada tempo avaliado.

#### 4.2.6 Avaliação da viabilidade celular dos lipossomas pelo ensaio de SRB

A atividade citotóxica foi avaliada em três linhagens celulares de tumores de mama humana MCF-7 (ATCC® HTB22™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB26™), SKBR-3 (ATCC® HTB30™). As células foram cultivadas em meio DMEM (MDA-MB-231), McCoy (SKBR-3) e MEM (MCF-7), conforme descrito no item 4.2.1.1. O ensaio de SRB foi realizado conforme item 4.2.1.2 para as seguintes amostras: GEVGP livre, DXR livre, combinação de GEVGP+DXR nas razões de 1:1 e 5:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 e LpHS-branco. A combinação de GEVGP+DXR livre e encapsuladas na razão molar de 5:1 foi avaliada somente na linhagem celular MDA-MB-231. Os intervalos de concentrações de GEVGP e DXR nos tratamentos livres e lipossomas, estão apresentados nas Tabela 1 (item 4.2.1.2) e na Tabela 4. Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens diferentes para cada linhagem celular.

**Tabela 4 – Intervalos de concentração dos tratamentos para a determinação da citotoxicidade utilizando células de câncer de mama**

Tratamento	Intervalo de concentração dos compostos(µM)	
	GEVGP	DXR
LpHS-GEVGP	0,0078 – 2,0	-
LpHS-DXR	-	0,0312 – 32,0
LpHS-GEVGP:DXR 1:1	0,005 – 1,28	0,005 – 1,28
LpHS-GEVGP:DXR 5:1	0,008 – 0,640	0,002 – 0,128

Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorubicina (LpHS-DXR), contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (LpHS-GEVGP) contendo GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1) e na razão molar de 5:1 (LpHS-GEVGP+DXR 5:1).

#### 4.2.7 Determinação do índice de combinação para GEVGP+DXR e LpHS-GEVGP+DXR

Os dados de viabilidade celular obtidos a partir do ensaio de SRB para as amostras GEVGP livre, DXR livre, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, combinação GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1, LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 foram submetidos a análise de efeitos médios e IC utilizando o *software* Compusyn® (versão 1, Paramus, NJ, EUA), conforme descrito no item 4.2.1.3. Foram realizados três experimentos independentes em dias e passagens celulares diferentes para

cada linhagem celular. Os valores de IC foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.2.8 Seletividade**

A seletividade da combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 e LpHS-GEVGP+DXR1:1 para as células tumorais em relação aos fibroblastos não-tumorais de gengiva humana obtidos por cultura primária, foi determinada utilizando o ensaio de SRB, conforme descrito no item 4.2.1.2. O uso de culturas de fibroblastos se dá pela fácil obtenção dessas células por biopsia e do fato de, após isolamento e estabelecimento das culturas, os fibroblastos apresentarem uma proliferação rápida e contínua na presença de soro, comparativamente a outros tipos de células que necessitam de fatores de crescimento adicionais (TAKASHIMA, 1998).

Depois de calculados os valores de  $CI_{50}$  das amostras nas diferentes linhagens tumorais e nos fibroblastos não-tumorais, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), dado pela fórmula:

$$IS = \frac{CI_{50} \text{ FIB}}{CI_{50} \text{ TUM}}$$

onde  $CI_{50} \text{ FIB}$  equivale ao valor de  $CI_{50}$  em fibroblastos não-tumorais, e  $CI_{50} \text{ TUM}$  equivale ao valor de  $CI_{50}$  em linhagem tumoral (SILVA, 2013). Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens celulares diferentes.

#### **4.2.9 Cumulative population doubling**

O estudo de CPD foi realizado na linhagem celular de tumor de mama humana MDA-MB-231. As células foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.1.1. A suspensão celular foi semeada em placas de 12 poços ( $1 \times 10^5$  células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Após esse período, foram adicionados os seguintes tratamentos nas respectivas concentrações de  $CI_{50}$ : GEVGP livre, DXR livre, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR 1:1 e LpHS-Branco, e novamente as placas foram mantidas em estufa de atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas. O grupo controle celular foi utilizado para comparação com os demais tratamentos. Após o tratamento, as células viáveis foram tripsinizadas, contadas e novamente semeadas em placas de 12 poços ( $2,5 \times 10^4$  células/poço). A avaliação da proliferação celular

foi realizada por 21 dias. A cada três a cinco dias, respeitando a confluência máxima de 80%, as células foram tripsinizadas, contadas e replaqueadas e a cinética de crescimento das células foi determinada a partir de planilhas específicas utilizando o *software* Excel® 2016 (SILVA *et al.*, 2016). Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens celulares diferentes.

#### **4.2.10 Avaliação do ciclo celular**

A avaliação do ciclo celular foi realizada na linhagem celular de tumor de mama humana MDA-MB-231. As células foram cultivadas conforme item 4.2.1.1. A suspensão celular foi semeada em placas de 6 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após esse período, soluções de GEVGP livre, DXR livre, combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, em concentrações correspondentes aos respectivos valores de CI<sub>50</sub> foram adicionadas aos poços e novamente mantidas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Após o tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 1600 rpm, em centrífuga (HeraeusMultifuge X1R, Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Em seguida, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensionado em álcool 70 % (p/p) (77 ° GL) gelado. As células foram novamente centrifugadas utilizando a mesma condição descrita anteriormente e ressuspensionadas em tampão de extração *cell cycle* (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Triton-X 100). Em seguida, as células foram marcadas com o corante TO-PRO-3 após a adição da solução de RNase de acordo com protocolo do fabricante. As leituras foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte 6-2L (Millipore, MA, EUA). A fluorescência para o TO-PRO-3 foi coletada utilizando o filtro de emissão de 680/30. Para detecção da população de interesse, o gráfico tamanho *versus* granulosidade foi utilizado, sendo adquiridos 5000 eventos, e em seguida, foi gerado um gráfico do tipo histograma expressando número de eventos *versus* fluorescência. Os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens celulares diferentes.

#### **4.2.11 Avaliação da via de morte por citometria de fluxo**

A avaliação das vias de morte celular foi realizada na linhagem celular de tumor de mama humana MDA-MB-231. As células foram cultivadas conforme item 4.2.1.1. A suspensão celular foi semeada em placas de 6 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço) e mantidas em estufa de atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Após esse período, soluções de GEVGP livre, DXR livre, combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, em concentrações correspondentes aos respectivos valores de  $\text{CI}_{50}$  e  $\text{CI}_{90}$  foram adicionadas aos poços e as células foram novamente mantidas em estufa de atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  e 5% (v/v) de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas. Após o tratamento as células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 1600 rpm. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS. As células foram novamente centrifugadas, utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, para a retirada do sobrenadante e ressuspenso em tampão de ligação a Anexina-V (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4). Posteriormente, as células foram marcadas com o Kit de detecção de Anexina-V-FITC e TO-PRO-3 de acordo com os respectivos protocolos do fabricante. As leituras foram realizadas no citômetro Guava EasyCyte 6-2L (Millipore, MA, EUA). A fluorescência para Anexina-V-FITC foi coletada utilizando o filtro de emissão de 525/30 e a fluorescência para o TO-PRO-3 foi coletada utilizando o filtro de emissão de 680/30. Os sinais de fluorescência foram devidamente compensados antes da coleta dos dados utilizando células marcadas separadamente. A população de interesse foi obtida por meio do gráfico tamanho *versus* granulosidade sendo 5000 eventos capturados para tal, os quais foram então utilizados para a formação de um gráfico do tipo *dot-plot* expressando fluorescência TO-PRO-3 *versus* fluorescência Anexina-V-FITC. Os dados foram analisados utilizando o *software* FlowJo (Tree Star, San Carlos, CA, EUA). Foram realizados três experimentos independentes, em dias e passagens celulares diferentes.

#### **4.3 Análise estatística**

Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados obtidos foram analisados com o *software* GraphPad Prism versão 6 para Windows (GraphPad, San Diego,

CA, EUA). Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste KS e D'Agostino e Pearson e homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Os dados que seguiram distribuição normal foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de Tuckey. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

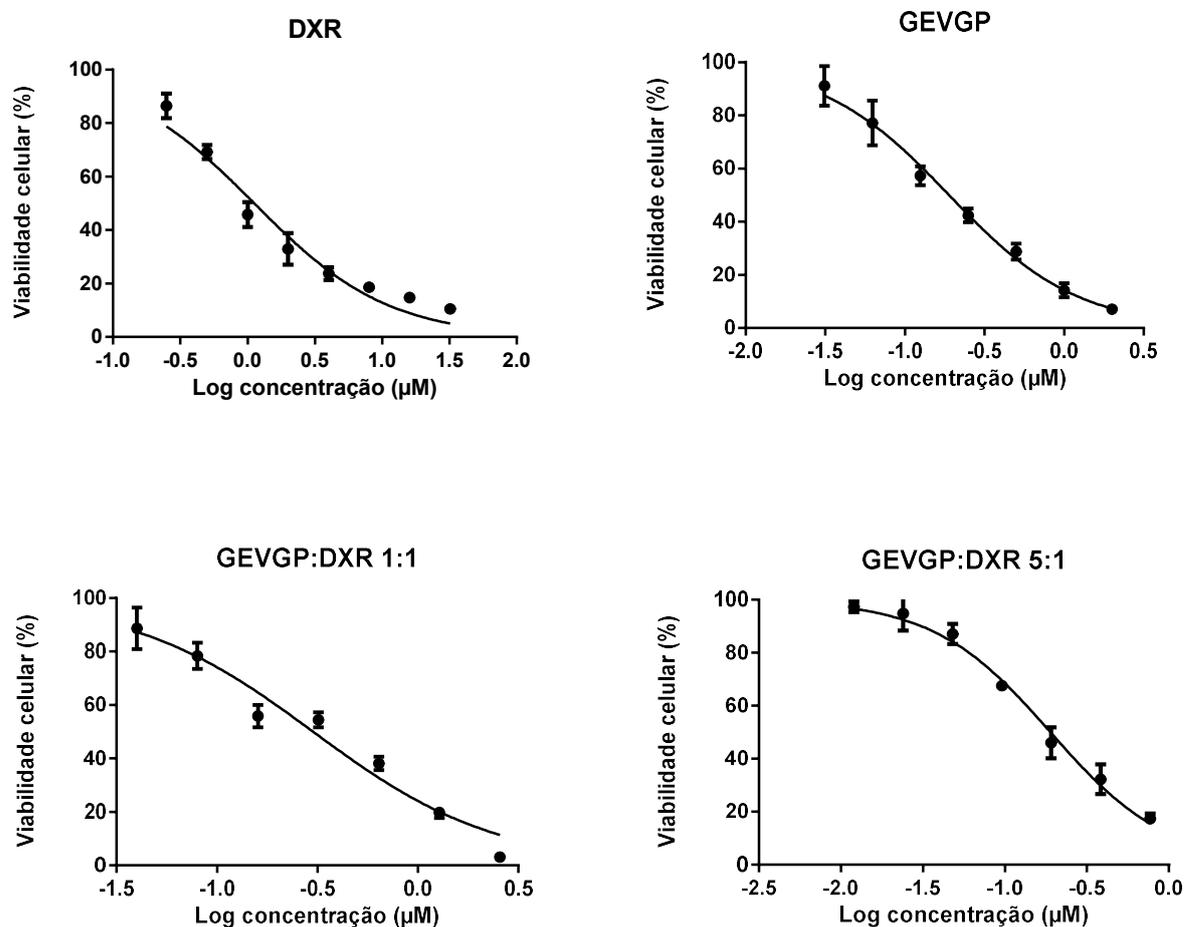
### **5.1 Avaliação no efeito citotóxico de diferentes razões de GEVGP+DXR**

#### **5.1.1 Avaliação da atividade citotóxica pelo ensaio de SRB**

O ensaio de SRB, desenvolvido em 1990, continua sendo um dos métodos mais utilizados para a determinação de citotoxicidade. O ensaio parte do princípio da ligação da SRB aos componentes proteicos das células. A SRB é um corante aminoxantana rosa brilhante contendo dois grupamentos sulfônicos, que se liga aos resíduos básicos dos aminoácidos em condições ácidas e se dissocia em condições de pH básico. A ligação da SRB é estequiométrica e a intensidade da coloração é diretamente proporcional à massa celular (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Para a avaliação do efeito citotóxico das combinações propostas (Tabela 1), foi utilizada a linhagem tumoral de mama humana MDA-MB-231. Essa linhagem foi selecionada, uma vez que as células não expressam ER, PR ou HER-2 e, portanto, são caracterizadas como triplo negativo. Sabe-se que os tumores que são constituídos por células do tipo triplo negativo apresentam grande heterogeneidade e as terapias disponíveis não são eficientes (PARK *et al.*, 2011).

A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de SRB e as curvas de viabilidade celular (dose-resposta) são mostradas na Figura 14.

**Figura 14 – Curva dose-resposta em células de câncer de mama MDA-MB-231 para os diferentes tratamentos**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP+DXR 1:1) e combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 5:1 (GEVGP+DXR 5:1). Foram realizados três experimentos independentes em dias e passagens celulares diferentes. Os valores são expressos como a média  $\pm$  DP.

A partir da análise da Figura 14, pode-se observar que foi possível obter uma curva dose-resposta para as amostras de GEVGP livre, DXR livre e para as combinações GEVGP:DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1. A determinação dessa curva, tanto dos compostos livres, quanto das combinações é necessária para que os dados sejam inseridos no *software* CompuSyn<sup>®</sup> para o cálculo do IC. É importante ressaltar que não foi possível obter uma curva dose-resposta para a combinação de GEVGP:DXR na razão molar de 1:5. Para esse tratamento, mesmo na maior concentração da combinação não houve uma citotoxicidade significativa. Dessa maneira, optou-se por não dar continuidade com essa razão devido ao potencial antagonismo a ser apresentado.

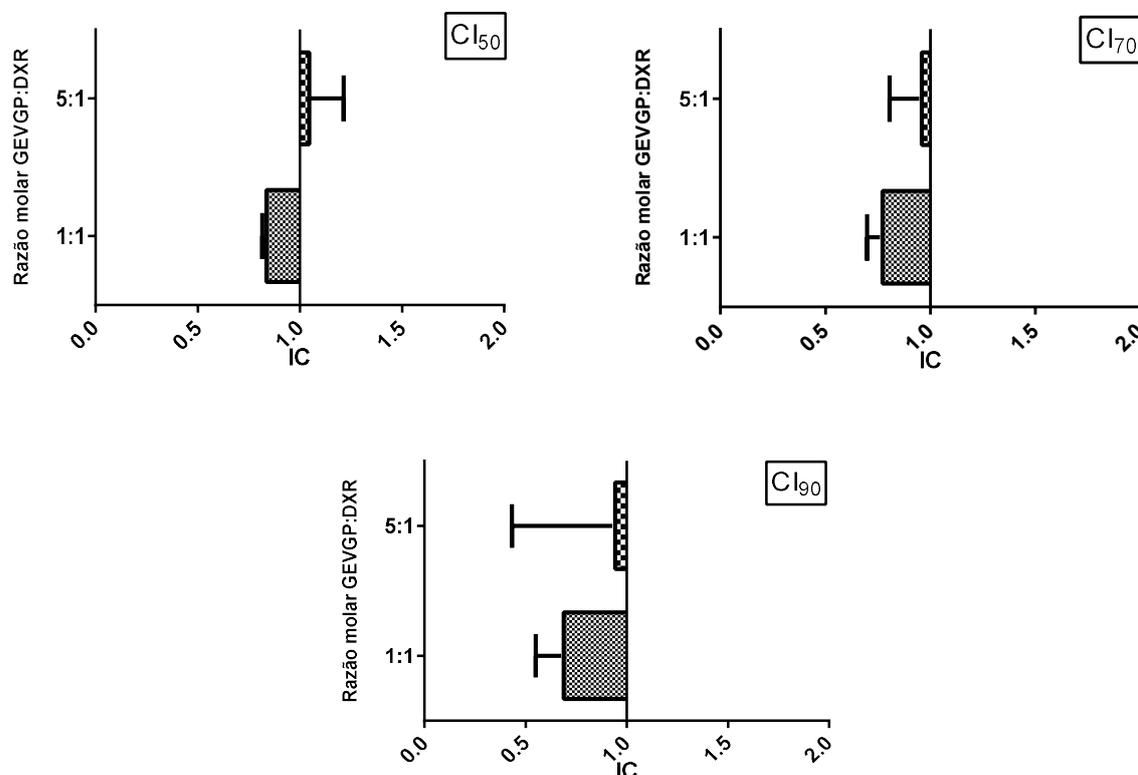
### **5.1.2 Determinação do IC para as diferentes razões de GEVGP+DXR**

Para a co-encapsulação de GEVGP e DXR nos lipossomas, torna-se importante avaliar previamente o efeito da combinação dessas substâncias bioativas na citotoxicidade, uma vez que a razão molar de fármacos em uma combinação pode afetar o efeito desejado (MAYER; JANOFF, 2007).

A equação do IC pode ser utilizada para determinar esse parâmetro em diferentes níveis de efeito, ou seja, em diferentes concentrações de inibição do crescimento celular (por exemplo  $CI_{50}$ ,  $CI_{70}$  e  $CI_{90}$ ). Sendo assim, o efeito sinérgico ( $IC < 1$ ), aditivo ( $IC \sim 1$ ) ou antagônico ( $IC > 1$ ) pode ser determinado para cada fração afetada (CHOU, 2006).

Para a avaliação do IC, os valores da curva dose-resposta obtidos no ensaio de citotoxicidade foram inseridos no *software* CompuSyn<sup>®</sup>. Os resultados de IC, nas concentrações de inibição de 50 % ( $CI_{50}$ ), 70 % ( $CI_{70}$ ) e 90 % ( $CI_{90}$ ) para as combinações GEVGP:DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 são apresentados na Figura 15.

**Figura 15 – Índice de combinação em diferentes frações afetadas para as combinações de GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 em células de câncer de mama MDA-MB-231**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP:DXR 1:1), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 5:1 (GEVGP:DXR 5:1), concentração de inibição de 50 %, 70 % e 90 % de crescimento ( $CI_{50}$ ,  $CI_{70}$ ,  $CI_{90}$ , respectivamente), índice de combinação (IC). Foram realizados três experimentos independentes em dias e passagens celulares diferentes. Não houve diferença significativa entre as razões testadas ( $p < 0.05$ ).

A partir dos resultados mostrados na Figura 15, é possível verificar que tanto a combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, quanto na razão molar de 5:1, apresentaram valores de IC menores que 1 nas  $CI_{70}$  e  $CI_{90}$ , o que corresponde a um efeito sinérgico para essas combinações. O sinergismo ocorre quando o efeito de citotoxicidade observado para a combinação é maior em comparação a soma dos efeitos dos compostos individuais. De acordo com o valor de IC, a resposta observada pode ser subdividida em diferentes graus, conforme a Tabela 5 (CHOU, 2006).

**Tabela 5 – Descrição do efeito observado para diferentes faixas de índice de combinação**

<b>Faixa de IC</b>	<b>Descrição</b>
< 0,1	Sinérgico muito forte
0,1 – 0,3	Sinérgico forte
0,3 – 0,7	Sinérgico
0,7 – 0,85	Sinérgico moderado
0,85 – 0,90	Sinérgico leve
0,90 – 1,10	Quase aditivo
1,10 – 1,20	Aditivo leve
1,20 – 1,45	Aditivo moderado
1,45 – 3,3	Antagônico
3,3 – 10,0	Antagônico forte
> 10,0	Antagônico muito forte

Fonte: adaptado de CHOU, 2006.

Conclui-se então que, a razão molar 1:1 da combinação GEVGP+DXR nas  $CI_{50}$ ,  $CI_{70}$  e  $CI_{90}$  ( $IC = 0,84 \pm 0,02$ ;  $0,77 \pm 0,08$  e  $0,69 \pm 0,14$ , respectivamente) apresentou um efeito sinérgico moderado. Já a razão molar de 5:1 nas mesmas frações afetadas apresentou efeito quase aditivo ( $IC = 1,05 \pm 0,17$ ;  $0,96 \pm 0,15$  e  $0,94 \pm 0,51$ , respectivamente). Uma vez que não houve diferença significativa entre o IC das duas razões, optou-se por desenvolver duas formulações lipossomais co-encapsulando GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1.

## **5.2 Preparo dos lipossomas fusogênicos de circulação prolongada**

Tendo em vista que as duas razões molares para a combinação de GEVGP+DXR apresentaram valores de IC próximos, foram desenvolvidos lipossomas contendo as razões molares de 1:1 e 5:1. As características químicas e físico-químicas das formulações desenvolvidas são mostradas na Tabela 6.

**Tabela 6 – Propriedades químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1**

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	TE (%)		Concentração (mM)	
				GEVGP	DXR	GEVGP	DXR
LpHS-GEVGP+DXR 1:1*	193,9 ± 9,3	0,3 ± 0,1	- 2,4 ± 0,5	67,5 ± 11,1	104,2 ± 12,0	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
LpHS-GEVGP+DXR 5:1 **	200,4	0,3	- 2,2	65,0	90,4	0,44	0,07

**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorrubicina e glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1) e na razão molar de 5:1 (LpHS-GEVGP+DXR 5:1), índice de polidispersão (IP), teor de encapsulação (TE). \*Foram realizados três experimentos independentes. Os valores são expressos como a média ± DP. \*\* Foi realizado um experimento.**

Conforme já descrito, o aumento da permeabilidade vascular permite o extravasamento de sistemas nanoestruturados para a região tumoral. Experimentos utilizando lipossomas de diferentes tamanhos médios, sugerem que partículas com o tamanho próximo a 400 nm são capazes de penetrarem nos tecidos tumorais. Entretanto, alguns estudos demonstram que a eficiência de extravasamento é maior em partículas de diâmetro menor que 200 nm (YUAN, F. *et al.*, 1995; HOBBS, S. *et al.*, 1998; COUVREUR, P, 2006). Dessa maneira, de acordo com os resultados mostrados na Tabela 6, os lipossomas desenvolvidos, uma vez que apresentaram diâmetro médio próximos a 200 nm, podem ser capazes de extravasarem para a região tumoral promovendo maior entrega dos compostos em função do efeito EPR.

O IP está relacionado à distribuição granulométrica de uma população. Populações com tamanho de partícula heterogêneo (polidispersas) apresentam maiores valores de IP. Já as populações em que as partículas possuem tamanhos semelhantes, ou seja, são monodispersas, apresentam menores IP. O IP próximo a 0,3 observado para as formulações, indica uma distribuição homogênea do tamanho das vesículas. Além disso, uma vez que o diâmetro médio das vesículas foi próximo a 200 nm, essas formulações apresentam-se adequadas para a administração endovenosa.

A partir dos resultados da Tabela 6, pode-se observar ainda que o potencial zeta para as duas formulações foi próximo a neutralidade. Apesar das moléculas de CHEMS apresentarem os grupamentos ionizados, a presença das cadeias de PEG mascara a carga superficial das vesículas conferindo neutralidade. Sabe-se que

valores de potencial zeta mais elevados, tanto positivos quanto negativos, contribuem para uma maior estabilidade das vesículas, uma vez que promovem repulsão eletrostática impedindo a agregação (VEMURI; RHODES, 1995). Entretanto, a presença de polímeros hidrofílicos como o PEG na superfície dos lipossomas, promove um impedimento estérico evitando a agregação das vesículas e contribuindo para a estabilidade da formulação (IMMORDINO, 2006). Além disso, o PEG dificulta o reconhecimento das vesículas e associação com as opsoninas. Com isso, os lipossomas são capturados mais lentamente pelos órgãos do SFM, permanecendo por mais tempo em circulação na corrente sanguínea (TORCHILIN, 2007).

Ainda de acordo com a Tabela 6, ambas as formulações apresentaram elevado TE para a DXR, o que pode ser justificado pela utilização do método de encapsulação remota por gradiente de sulfato de amônio. Nesse método, os lipossomas são hidratados com uma solução de sulfato de amônio e, após a diálise, o sulfato de amônio do meio externo é substituído por tampão HEPES permitindo a formação de um gradiente, onde a concentração de sulfato de amônio é maior na cavidade interna dos lipossomas em relação a fase externa. Dessa maneira, as moléculas de DXR na forma de base livre atravessa a membrana dos lipossomas e ocorre a protonação do grupamento amino na cavidade aquosa, formando o sal de sulfato de DXR que precipita no interior das vesículas, impedindo a sua saída (HARAN, 1993).

Uma vez que os lipossomas são sistemas versáteis para o carreamento de substâncias, a encapsuação de GEVGP é possível devido a afinidade da porção hidrofóbica desse composto pela bicamada lipídica. As características estruturais da porção aglicona do GEVGP pode permitir ainda uma acomodação do composto na bicamada lipídica devido a semelhança estrutural com os moduladores de temperaturas de transição de fase ( $T_c$ ), como o colesterol. Os moduladores de  $T_c$ , têm a capacidade de se intercalarem na bicamada lipídica modulando a rigidez da membrana (ULRICH, 2002). Dessa maneira, o TE de GEVGP próximo a 70 %, pode ser justificado pela sua alta afinidade desse composto pela bicamada dos lipossomas.

Conforme pode-se observar na Tabela 6, foi possível alcançar as razões molares pretendidas de GEVGP:DXR (1:1 e 5:1). A obtenção dessas razões foi possível, pois

a DXR é quase totalmente encapsulada e foi adicionada à formulação após o doseamento do GEVGP.

Os lipossomas contendo apenas GEVGP, bem como os lipossomas contendo apenas DXR foram preparados para a obtenção da curva dose-resposta, uma vez que, conforme descrito, o IC é calculado a partir dos experimentos realizados com os compostos individualmente e com a combinação. Como pode ser observado na Tabela 7, essas formulações apresentaram características químicas e físico-químicas semelhantes aos lipossomas contendo os compostos co-encapsulados. Além disso, ao comparar as formulações contendo DXR ou GEVGP com os lipossomas brancos é possível verificar que a encapsulação dessas substâncias bioativas não interferiu no tamanho, IP e potencial zeta, uma vez que a formulação isenta dos compostos também apresentou características semelhantes à essas formulações. Entretanto, em relação ao diâmetro das vesículas, pôde-se observar um aumento no caso dos LpHS-GEVGP. Esse aumento pode ser resultante da inserção das moléculas de GEVGP na bicamada lipídica, levando à modificação da curvatura, o que dificulta a redução do diâmetro por sonicação.

**Tabela 7 – Propriedades químicas e físico-químicas dos LpHS-GEVGP, LpHS-DXR e LpHS-branco**

Formulação	Diâmetro médio (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	TE (%)	
				GEVGP	DXR
LpHS-GEVGP	179,1	0,3	- 2,74	77,0	-
LpHS-DXR	131,9	0,2	- 3,17	-	95,2
LpHS-branco	135,0	0,1	- 3,40	-	-

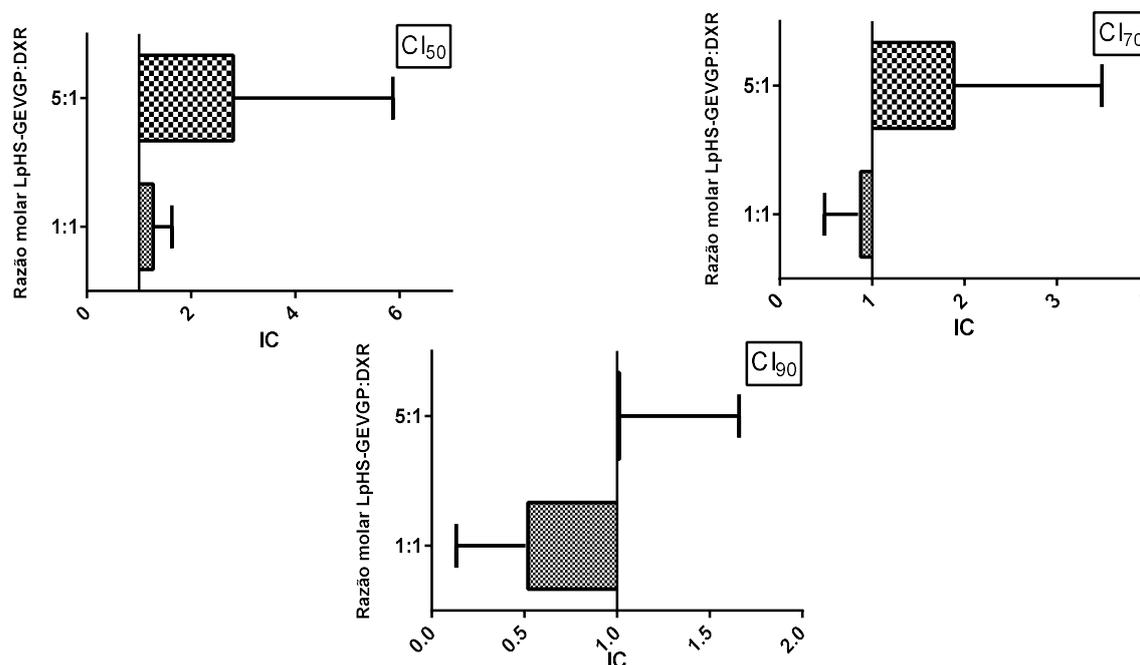
**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (LpHS-GEVGP), contendo doxorubicina (LpHS-DXR) e isento de substância bioativa (LpHS-branco), índice de polidispersão (IP), teor de encapsulação (TE). Foi realizado um experimento.**

### **5.3 Determinação do IC para os LpHS-GEVGP+DXR razões molares de 1:1 e 5:1**

As curvas de viabilidade celular dos LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1, bem como dos LpHS-GEVGP e LpHS-DXR foram obtidas a partir do ensaio de SRB utilizando células de câncer de mama MDA-MB-231. Conforme mencionado anteriormente, a determinação da curva dose-resposta dos lipossomas contendo os compostos individualmente é importante para a determinação do IC pelo *software* CompuSyn®.

Os intervalos de concentração testados para cada formulação são mostrados na Tabela 4 (item 4.2.6) e os resultados de IC, nas  $CI_{50}$ ,  $CI_{70}$  e  $CI_{90}$  para os LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 são apresentados na Figura 16.

**Figura 16 – Índice de combinação em diferentes frações afetadas para as combinações LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1 em células de câncer de mama MDA-MB-231**



**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorubicina e glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), na razão molar de 5:1 (LpHS-GEVGP+DXR 5:1), concentração de inibição de 50 %, 70 % e 90 % de crescimento celular ( $CI_{50}$ ,  $CI_{70}$ ,  $CI_{90}$ , respectivamente), índice de combinação (IC). Foram realizados três experimentos independentes em dias e passagens celulares diferentes. Os valores são expressos como a média  $\pm$  DP. Não houve diferença significativa entre as razões testadas ( $p < 0.05$ ).**

A partir dos resultados mostrados na Figura 16, é possível verificar que os LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 5:1 apresentaram uma tendência ao antagonismo nas três frações afetadas avaliadas, o que sugere que independente da concentração, a fração molar 5:1 após encapsulação tem seu efeito citotóxico prejudicado. Já os LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 apresentaram efeito aditivo moderado na  $CI_{50}$  ( $1,27 \pm 0,38$ ), sinérgico moderado na  $CI_{70}$  ( $0,87 \pm 0,37$ ) e sinérgico na  $CI_{90}$  ( $0,52 \pm 0,39$ ), indicando que a formulação foi capaz de manter o efeito observado para a razão livre e que há uma relação diretamente proporcional entre o aumento da concentração da formulação e o sinergismo observado. Dessa

maneira, pode-se concluir que a formulação tende a ser mais sinérgica quando a fração afetada é maior. Esse resultado é extremamente positivo, tendo em vista que para o tratamento do câncer a obtenção do sinergismo em níveis altos de efeito ( $CI_{90}$  e  $CI_{95}$ ) é muito mais relevante do ponto de vista terapêutico que em baixos níveis de efeito ( $CI_{30}$  e  $CI_{50}$ ) (CHOU, 2006).

Shaik e colaboradores, demonstraram que uma combinação de DXR+irinotecano na razão molar de 1:1 foi mais promissora em relação as razões molares de 10:1 e 1:10, quando avaliadas em três linhagens celulares de câncer de ovário. A razão 1:1 apresentou os respectivos valores de IC nas linhagens SKOV-3, OVCAR-3 e IGROV-1 na  $CI_{90}$  (0,586; 0,429 e 0,639, respectivamente). Posteriormente, a razão molar de 1:1 foi encapsulada em lipossomas e avaliada em modelo xenográfico de tumor de ovário humano e demonstrou-se mais efetiva em relação a combinação livre, devido principalmente a alteração nos parâmetros farmacocinéticos, uma vez que a razão molar de 1:1 foi observada por mais tempo na circulação sanguínea (SHAIK, 2013).

Apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os LpHS-GEVGP+DXR nas razões molares de 1:1 e 5:1, foi possível notar que o efeito biológico promovido pela formulação contendo a razão molar de 1:1, promoveu maior sinergismo nas células de câncer de mama MDA-MB-231. Dessa maneira os LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 foram selecionados para a avaliação do IC nas linhagens de tumor de mama humana MCF-7 e SKBR-3. A escolha dessas linhagens teve como objetivo avaliar o efeito da formulação em células que superexpressam ER (MCF-7) e HER-2 (SKBR-3).

Os resultados de IC na  $CI_{90}$  da combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, bem como dos LpHS-GEV+DXR 1:1 nas linhagens MCF-7 e SKBR-3 são mostrados na Tabela 8.

**Tabela 1 – Índice de combinação na  $CI_{90}$  de GEVGP+DXR e dos LpHS-GEV+DXR na razão molar de 1:1 utilizando as linhagens celulares de câncer de mama MCF-7 e SKBR-3**

Tratamento	MCF-7		SKBR-3	
	Valor de IC	Efeito observado	Valor de IC	Efeito observado
GEVGP+DXR 1:1	0,19 ± 0,13	Sinérgico forte	0,99 ± 0,09	Quase aditivo
LpHS-GEVGP+DXR 1:1	0,36 ± 0,19	Sinérgico	0,73 ± 0,40	Sinérgico moderado

**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorubicina e glicoevatromonossídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1, concentração de inibição de 90 % de crescimento celular ( $CI_{90}$ ), índice de combinação (IC). Foram realizados três experimentos independentes em dias e passagens celulares diferentes. Os valores são expressos como a média ± DP.**

A partir da observação da Tabela 8, pode-se observar que a encapsulação de GEVGP e DXR na razão molar de 1:1 nos lipossomas não comprometeu o efeito observado para a combinação livre. Nas células MCF-7 houve uma ligeira redução do sinergismo após a encapsulação, entretanto a formulação se manteve sinérgica. Já na linhagem SKBR-3 o efeito foi quase aditivo para a combinação livre e, após a encapsulação nos lipossomas a formulação apresentou um efeito sinérgico moderado. O menor valor de IC encontrado utilizando as células de câncer de mama MCF-7 em relação as demais linhagens avaliadas, sugere uma maior sensibilidade dessas células à formulação testada. Apesar das diferenças nos valores de IC serem baixas em relação a combinação livre, a encapsulação das substâncias bioativas conjuntamente em um nanossistema carreador apresenta vantagens, como manutenção da razão na circulação sanguínea, entrega da razão pretendida na região tumoral e redução da toxicidade, conforme já discutido.

É importante ressaltar ainda que o sinergismo pode ser útil tanto no aumento da eficácia terapêutica, quanto na redução dos efeitos adversos observados, uma vez que é possível manter o mesmo efeito do composto individual reduzindo a dose de um dos compostos ao se utilizar uma combinação sinérgica (CHOU, 2006).

Com base nos resultados obtidos, a formulação LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 foi selecionada para os estudos de estabilidade de armazenamento e perfil de liberação, bem como para a avaliação da seletividade para as diferentes linhagens celulares tumorais em relação à linhagem de fibroblastos não-tumorais, estudo de

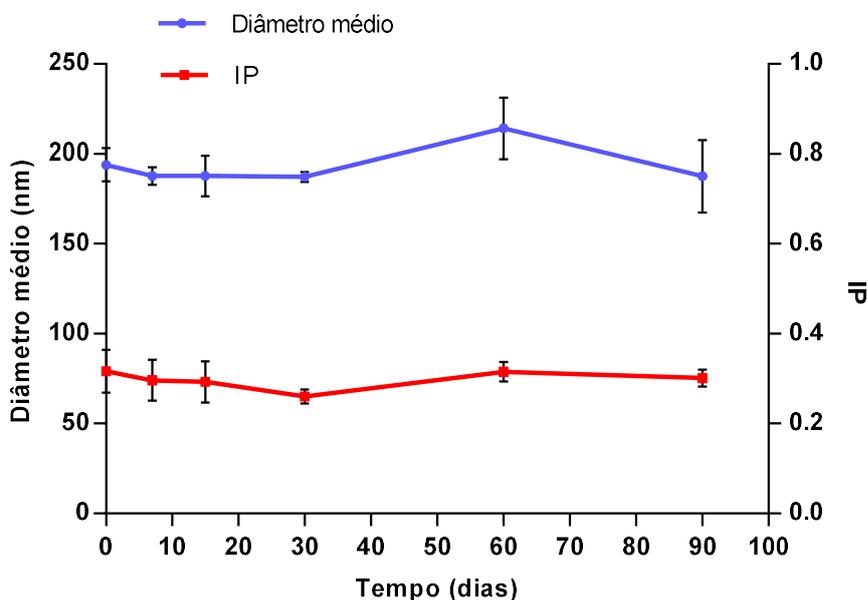
CPD, avaliação do ciclo celular e dos processos de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231.

#### **5.4 Estudo de estabilidade dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1**

A estabilidade de armazenamento a 4 °C dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 foi avaliada durante 90 dias. A formulação foi avaliada química e físico-quimicamente em relação ao tamanho, IP, potencial zeta, concentração de GEVGP e DXR nos lipossomas e manutenção da razão molar encapsulada a cada tempo do estudo.

A avaliação do diâmetro médio é extremamente importante durante o estudo de estabilidade, uma vez que um dos principais fenômenos que pode ocorrer durante o armazenamento de sistemas coloidais é o aumento do tamanho das vesículas devido a fusão ou agregação. Esses fatores podem acarretar não só no aumento do diâmetro das partículas, como também podem promover alterações na concentração da substância bioativa encapsulada (YANG, *et al.*, 2007). Os resultados de diâmetro médio e IP são mostrados na Figura 17. Durante 90 dias de armazenamento não houve alteração significativa no diâmetro médio das vesículas, onde os valores inicial e após 90 dias foram  $193,9 \pm 9,3$  e  $187,6 \pm 20,1$  nm, respectivamente. Além disso, os valores de IP se mantiveram próximos a 0,3, não havendo aumento significativo durante o período avaliado, o que sugere que não houve agregação ou fusão de vesículas, bem como o sistema manteve-se monodisperso durante o período de armazenamento. Os valores de IP para os tempos inicial e 90 dias foram  $0,3 \pm 0,05$  e  $0,3 \pm 0,02$ , respectivamente.

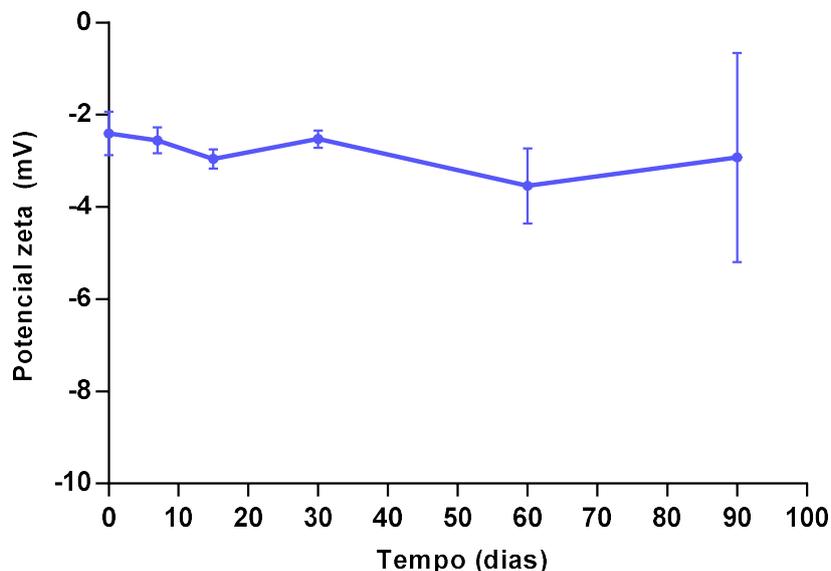
**Figura 17 – Variações do diâmetro médio e IP dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 durante 90 dias de armazenamento a 4 °C**



**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorrubicina e glicoevatromonossídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), índice de polidispersão (IP). Foram realizados três experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre os tempos avaliados ( $p < 0.05$ ).**

É importante ressaltar também que, durante o período avaliado não houve alteração significativa no potencial zeta dos lipossomas, que se manteve próximo a neutralidade apresentando valores de  $-2,4 \pm 0,5$  mV para o tempo inicial e  $-2,9 \pm 2,3$  mV após 90 dias (Figura 18). A manutenção do potencial zeta pode ser justificada pela presença do PEG na superfície lipossomal. Em geral, valores de potencial zeta próximos a 30 mV (em módulo) contribuem para aumentar a estabilidade da formulação, devido a repulsão eletrostática (NEW, 1990). Entretanto, as cadeias poliméricas do PEG são responsáveis por uma repulsão estérica, o que também evita a agregação das partículas, como foi observado na avaliação do tamanho da formulação.

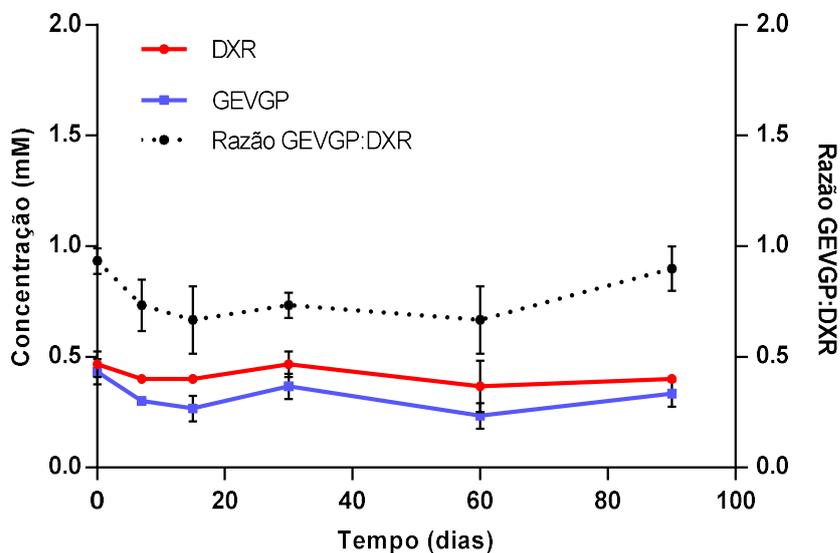
**Figura 18 – Variações do potencial zeta dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 durante 90 dias de armazenamento a 4°C**



**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo doxorrubicina e glicoevatromonossídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1). Foram realizados três experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre os os tempos avaliados ( $p < 0.05$ ).**

Em relação ao teor de GEVGP e DXR encapsulados nos lipossomas, não houve uma redução significativa da concentração (expressa em mM) dos dois compostos (Figura 19). A manutenção da concentração encapsulada de DXR ( $0,47 \pm 0,04$  mM no tempo inicial e  $0,37 \pm 0,01$  mM após 90 dias), pode ser atribuída ao método de gradiente de sulfato de amônio utilizado. A formação do sal sulfato de DXR sob a forma precipitada no interior do núcleo aquoso dos lipossomas, contribui para que o fármaco permaneça encapsulado durante o armazenamento. Já para o GEVGP, sua afinidade pela bicamada lipídica pode ter contribuído para a manutenção desse composto nos lipossomas durante o período de armazenamento. As concentrações de GEVGP nos lipossomas para os tempos inicial e 90 dias foram  $0,45 \pm 0,08$  mM e  $0,32 \pm 0,04$  mM, respectivamente. É importante ressaltar que, como não houve uma liberação significativa dos compostos co-encapsulados a razão molar se manteve próxima a 1:1 durante 90 dias ( $0,96 \pm 0,07$  mM no tempo inicial e  $0,88 \pm 0,08$  mM após 90 dias). A manutenção da razão molar é extremamente importante, uma vez que a variação da razão molar de fármacos em uma combinação pode afetar o efeito pretendido (MAYER; JANOFF, 2007).

**Figura 19 – Variações da concentração em mM de GEVGP e DXR nos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 durante 90 dias de armazenamento a 4°C**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonossídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP e DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1). Foram realizados três experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre as concentrações e as razões de GEVGP e DXR ao longo do tempo ( $p < 0.05$ ).

### 5.5 Estudo do perfil de liberação de GEVGP e DXR a partir dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1

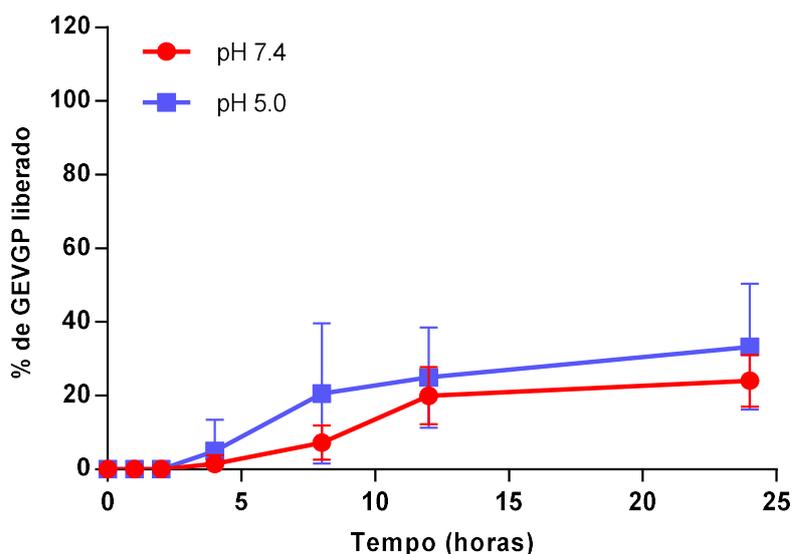
Um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento de sistemas direcionados é o perfil de liberação dos fármacos a partir da formulação. Para os sistemas lipossomais, essa liberação pode acontecer a partir da difusão da substância bioativa através da bicamada lipídica, pela desestruturação dos lipossomas em diferentes condições ou ainda pela fusão das vesículas com as membranas celulares ou endossomais (LEE, 1998). Além disso, a cinética de liberação de lipossomas é dependente da composição lipídica, natureza do material encapsulado e método de encapsulação. Portanto, a avaliação do perfil de liberação tem grande importância na segurança e eficácia terapêutica dos nanossistemas (MONTEIRO *et al.*, 2014).

O perfil de liberação de GEVGP e DXR a partir dos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 foi avaliado por meio de diálise em tampão HEPES em pH 5,0 e pH 7,4,

por 24 horas, e a quantificação dos dois compostos foi realizada por CLAE conforme descrito nos respectivos métodos.

A partir da avaliação da Figura 20, pode-se observar que houve uma pequena liberação do GEVGP a partir da formulação. Após 8 horas o GEVGP é liberado lentamente, sendo que ao final de 24 horas ocorreu a liberação de  $24,1 \pm 7,0$  % em pH 7,4 e  $33,3 \pm 17,1$  em pH 5. O baixo teor de GEVGP liberado após 24 horas pode estar associado ao fato desse composto interagir fortemente com a bicamada lipídica devido a sua alta lipofilia (HODGINS, 2004).

**Figura 20 – Perfil de liberação de GEVGP a partir dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 em pH 5 (linha azul) e pH 7,4 (linha vermelha)**



**Glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP e doxorrubicina na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1). Foram realizados três experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre o teor de GEVGP liberado ao longo do tempo nos pH 7,4 e 5,0 ( $p < 0.05$ ).**

Não foi possível determinar um perfil de liberação da DXR a partir da formulação lipossomal, uma vez que mesmo após 24 horas não houve liberação do fármaco em pH 7,4. Em pH 5,0 foi possível somente detectar um percentual de liberação de DXR igual a  $43,5 \pm 17,0$  % após 24 horas.

A liberação de GEVGP e DXR a partir de LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 não foi acompanhada da desestruturação das vesículas, conforme pode ser avaliado na Tabela 9. Sendo assim, a hipótese de liberação das substâncias bioativas devido

a desestruturação total dos lipossomas a partir da redução do pH parece não se aplicar. A ausência da pH sensibilidade pode ser justificada pela presença do PEG na superfície dos lipossomas, o que pode dificultar a protonação dos grupos carboxilatos das moléculas de CHEMS, impedindo a desestruturação dos lipossomas.

**Tabela 2 – Avaliação do diâmetro médio e IP dos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar 1:1 submetida ao estudo de perfil de liberação por diálise**

Formulação	Tempo 0		Tempo 24 horas			
	Diâmetro médio (nm)	IP	Diâmetro médio (nm)		IP	
			pH 7,4	pH 5,0	pH 7,4	pH 5,0
LpHS-GEVGP+DXR 1:1	175, 2 ± 12,7	0,3 ± 0,0	163,3 ± 10,8	158,6 ± 2,2	0,02 ± 0,0	0,2 ± 0,0

**Lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas e doxorubicina na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), índice de polidispersão (IP). Foram realizados três experimentos independentes. Os valores são expressos como a média ± DP.**

Apesar da pH sensibilidade não ter sido observada pela avaliação *in vitro*, diversos estudos têm demonstrado que os lipossomas constituídos de DOPE:CHEMS:DSPE-PEG são internalizados de maneira mais eficiente nas células em relação aos lipossomas convencionais, uma vez que a menor hidratação da porção polar da molécula de DOPE aumenta a hidrofobicidade da bicamada dos lipossomas, favorecendo a internalização. Além disso, é conhecido que o baixo pH endossomal, aumenta a capacidade fusogênica da molécula de DOPE (LEE, 1998; FEEREIRA, 2013).

Sendo assim, a manutenção dos compostos nos lipossomas, além de contribuir para permitir a entrega da razão encapsulada na região tumoral pode permitir o aumento da eficácia terapêutica, uma vez que a presença da molécula de DOPE promove a liberação dos compostos por outros mecanismos, conforme descrito. Além disso, a baixa liberação pode contribuir para que os compostos permaneçam no sistema carreador durante a circulação sanguínea minimizando assim os efeitos tóxicos.

## 5.6 Seletividade

A determinação da seletividade a partir do estudo comparativo entre a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais e linhagens celulares saudias é de grande relevância durante o desenvolvimento de novos fármacos e formulações para tratamento do câncer, uma vez que um dos principais desafios dessa terapia é evitar os efeitos tóxicos causados as células não-tumorais. Conforme mencionado, os nanossistemas permitem um direcionamento dos agentes citotóxicos para a região tumoral, minimizando os efeitos adversos. Entretanto, é importante avaliar a seletividade *in vitro*, uma vez que pode ocorrer a indução de vias de morte em células tumorais que não estejam presentes em células saudáveis (SILVA, 2013).

A seletividade da combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 e dos LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 foi avaliada a partir dos resultados de  $CI_{50}$  obtidos pelo ensaio de SRB nas três linhagens de tumor de mama em comparação com a  $CI_{50}$  obtida em fibroblastos humanos não-tumorais. Os valores referentes aos IS são mostrados na Tabela 10.

**Tabela 3 – Valores de índice de seletividade nas linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3 em comparação com fibroblastos humanos saudáveis**

Formulação	IS		
	MDA-MB-231	MCF-7	SKBR-3
GEVGP+DXR 1:1	7,3 ± 2,2	4,4, ± 1,0	6,8 ± 3,2
LpHS-GEVGP+DXR 1:1	9,8 ± 3,9	10,9 ± 7,4	14,8 ± 8,3

**Combinação de doxorrubicina (DXR) e glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP) na razão molar de 1:1 (GEVGP:DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), índice de seletividade (IS). Foram realizados três experimentos independentes. Os valores são expressos como a média ± DP.**

A partir dos resultados mostrados na Tabela 10, pode-se observar que tanto a mistura das substâncias bioativas não encapsuladas quanto a formulação lipossomal contendo ambas as substâncias foram mais seletivas às três linhagens tumorais em relação aos fibroblastos humanos saudios. Esses resultados sugerem que a combinação pode interferir ou desencadear mecanismos de morte que não estão presentes nos fibroblastos. Sabe-se que os fibroblastos saudios apresentam taxas de proliferação menores que células tumorais. Portanto, uma possibilidade é a conhecida ação tanto dos glicosídeos cardíacos, quanto de DXR nos processos de

duplicação do DNA, o que afeta de forma mais efetiva células com maiores taxas de proliferação. Os maiores valores de IS em relação a formulação lipossomal podem ser justificados pela maior internalização dos lipossomas o que pode aumentar o efeito de morte nas células tumorais.

Dessa maneira, pode-se concluir que a formulação lipossomal apresenta seletividade *in vitro* para as três linhagens de células tumorais testadas e, somado ao fato de se tratar de um nanossistema carreador, também apresenta um grande potencial para ser mais seletiva *in vivo*.

### **5.7 Cumulative population doubling**

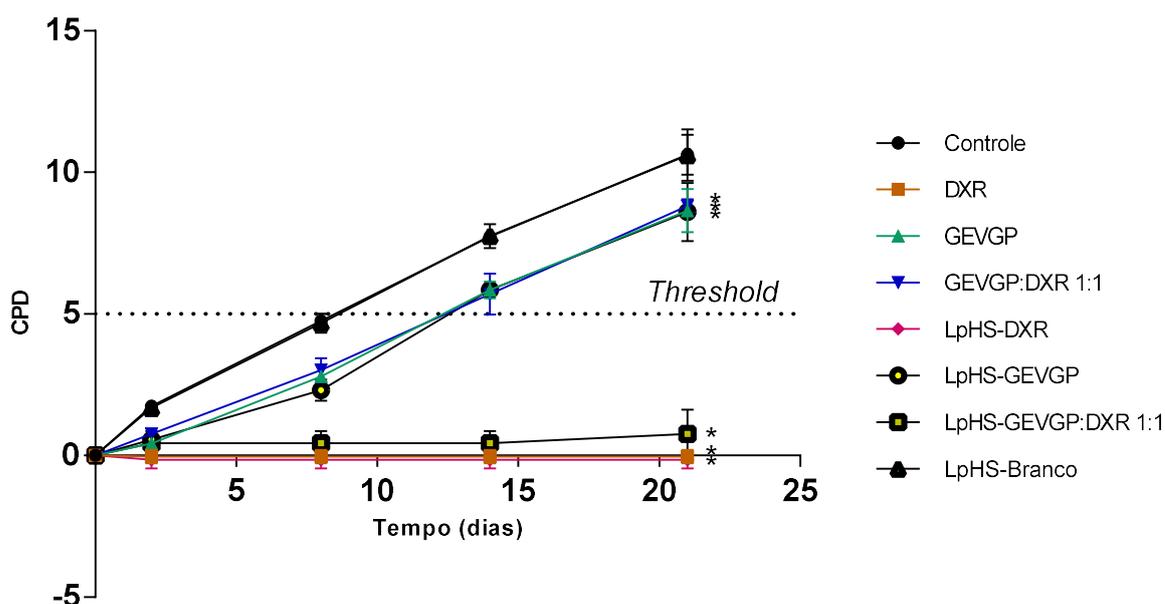
O câncer é uma doença crônica em que o tratamento pode levar meses ou anos para ser concluído. Os estudos *in vitro* geralmente são realizados em um curto período de tempo (horas ou dias) sendo necessários métodos alternativos que permitam uma análise a longo prazo. O CPD é um ensaio que avalia o comportamento *in vitro*, a longo prazo, das células sobreviventes após um tratamento, e logo, pode ser melhor correlacionado com os experimentos *in vivo* comparado aos experimentos de curto prazo (SILVA *et al.*, 2016).

O estudo de CPD foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento *in vitro*, a longo prazo, das células sobreviventes após os seguintes tratamentos nas respectivas concentrações de  $CI_{50}$ : GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR 1:1 na razão molar de 1:1 e LpHS-branco, em células da linhagem MDA-MB-231. Apesar de ter sido observado o maior sinergismo na  $CI_{90}$ , para a realização do estudo de CPD é necessário tratar as células de maneira que permaneçam células viáveis para serem replaqueadas, o que inviabiliza a utilização de uma dose que promova a morte de 90 % das células.

Sendo assim, o estudo determinou a cinética de crescimento dos diferentes grupos em comparação ao grupo controle celular por 21 dias. Foram avaliados também os seguintes parâmetros, calculados a partir do gráfico mostrado na Figura 21: CPD final relativo (RendCPD), que compara o valor de CPD obtido ao final de 21 dias para os grupos tratados em relação ao valor obtido para o grupo controle; área sob a curva relativa (rAUC), que determina o efeito global do tratamento a partir da área

sob a curva de cada grupo tratado em relação ao controle celular; taxa de proliferação relativa (RPR), que determina a taxa de crescimento relativo das células sobreviventes em cada grupo tratado em relação ao grupo controle. Esses parâmetros são calculados dividindo-se os respectivos valores de cada grupo tratado pelo valor do grupo controle e são expressos como porcentagem. Foi determinado também o tempo relativo para atingir o *threshold* (RTCT), que avalia o atraso na taxa de proliferação de cada grupo tratado em relação ao grupo controle. Esse parâmetro é calculado dividindo-se o valor do grupo controle pelos valores de cada grupo tratado e é expresso como porcentagem.

**Figura 21 – Avaliação *in vitro* a longo prazo das células sobreviventes após os seguintes tratamentos nas respectivas concentrações de  $CI_{50}$ : GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão molar 1:1 e LpHS-branco em células de câncer de mama MDA-MB-231**



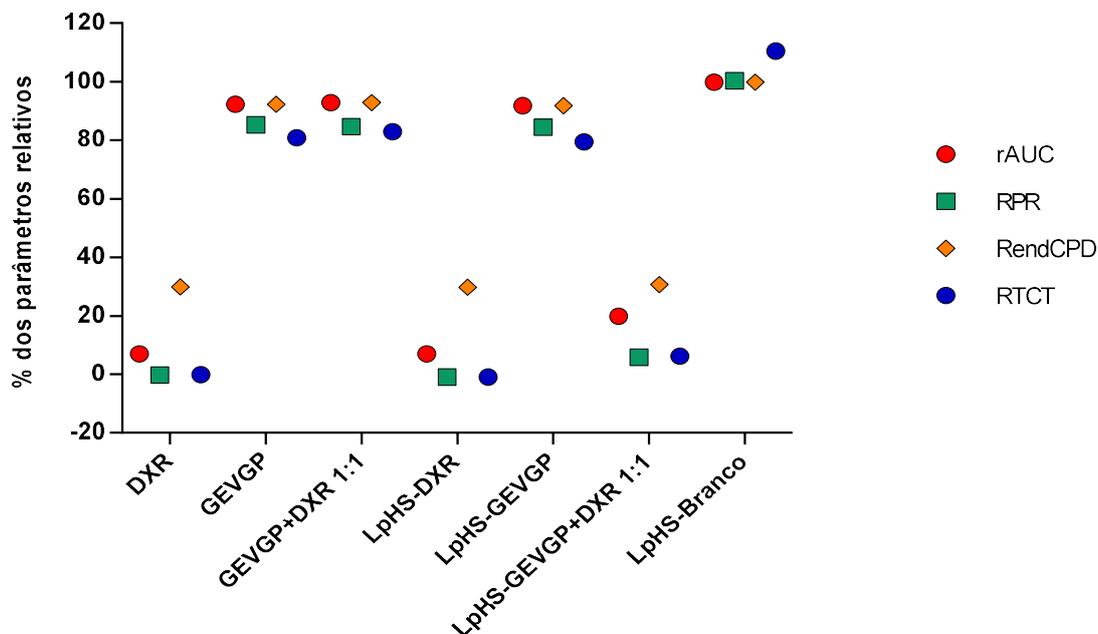
Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP:DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), isento de substâncias bioativas (LpHS-branco), *cumulative population doubling* (CPD). Foram realizados três experimentos independentes. \*representa diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A partir da avaliação do gráfico de CPD em função do tempo, pode-se concluir que as células tratadas com DXR livre, LpHS-DXR e LpHS-GEVGP+DXR na razão molar 1:1, não readquiriram a capacidade de proliferação ao longo de 21 dias. Conforme já

mencionado no trabalho, um dos mecanismos de ação da DXR e dos GC é a inibição da replicação do DNA. Dessa maneira as células que permaneceram viáveis após esses tratamentos poderiam estar com o ciclo celular parado em alguma fase e, posteriormente, esse dano causado ao DNA levou as células a morte. Entretanto, para os grupos tratados com GEVGP livre, LpHS-GEVGP ou com a combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, as células readquiriram a capacidade de proliferação ao longo do estudo, apesar do valor de CPD após 21 dias ter sido significativamente diferente em relação ao grupo controle. A menor capacidade de proliferação desses grupos também pode estar associada ao bloqueio da replicação do DNA pelo GEVGP e/ou DXR. É importante ressaltar que a diferença observada entre esses grupos em relação os grupos tratados com DXR livre, LpHS-DXR ou LpHSGEVGP+DXR na razão molar de 1:1, os quais não apresentaram crescimento celular, sugere que o a indução de morte ao longo do tempo por DXR nas células sobreviventes pode ser maior em relação a indução pelo GEVGP. Já a diferença observada da combinação das substâncias bioativas livres em relação a combinação das substâncias bioativas encapsulada, pode estar relacionada a maior internalização de DXR e GEVGP promovida pelos lipossomas.

A partir do gráfico de CPD em função do tempo foram obtidos os valores de parâmetros relativos (Figura 22), calculados em planilhas de Excel elaboradas a partir das fórmulas descritas por Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2016).

**Figura 22 – Parâmetros relativos calculados a partir do estudo de CPD após os tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão 1:1 e LpHS-Branco, em células de câncer de mama MDA-MB-231**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP+DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), isento de substâncias bioativas (LpHS-branco), área sob a curva relativa (rAUC), *cumulative population doubling* final relativo (RendCPD), taxa de proliferação relativa (RPR), tempo relativo para atingir o *threshold* (RTCT). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média.

É possível observar a partir da Figura 22 que os valores de todos os parâmetros relativos para os grupos tratados com DXR livre, LpHS-DXR e LpHS-GEVGP:DXR na razão molar de 1:1 foram muito baixos, ou seja, esses grupos apresentaram menores valores de CPD após 21 dias, menores taxas de proliferação, maiores atrasos de crescimento das células, bem como menores áreas sob a curva em relação ao grupo controle, o que indica que as células após receberem esses tratamentos reduziram acentuadamente sua capacidade de proliferação. Já para os grupos tratados com GEVGP livre, LpHS-GEVGP ou combinação GEVGP:DXR na razão molar de 1:1 a redução desses valores foi menor, indicando que o efeito sobre a capacidade proliferativa das células é menos significativo. O tratamento com

LpHS-branco não apresentou nenhum efeito na cinética de crescimento celular, como pode ser verificado pelos valores próximos a 100 % dos parâmetros relativos.

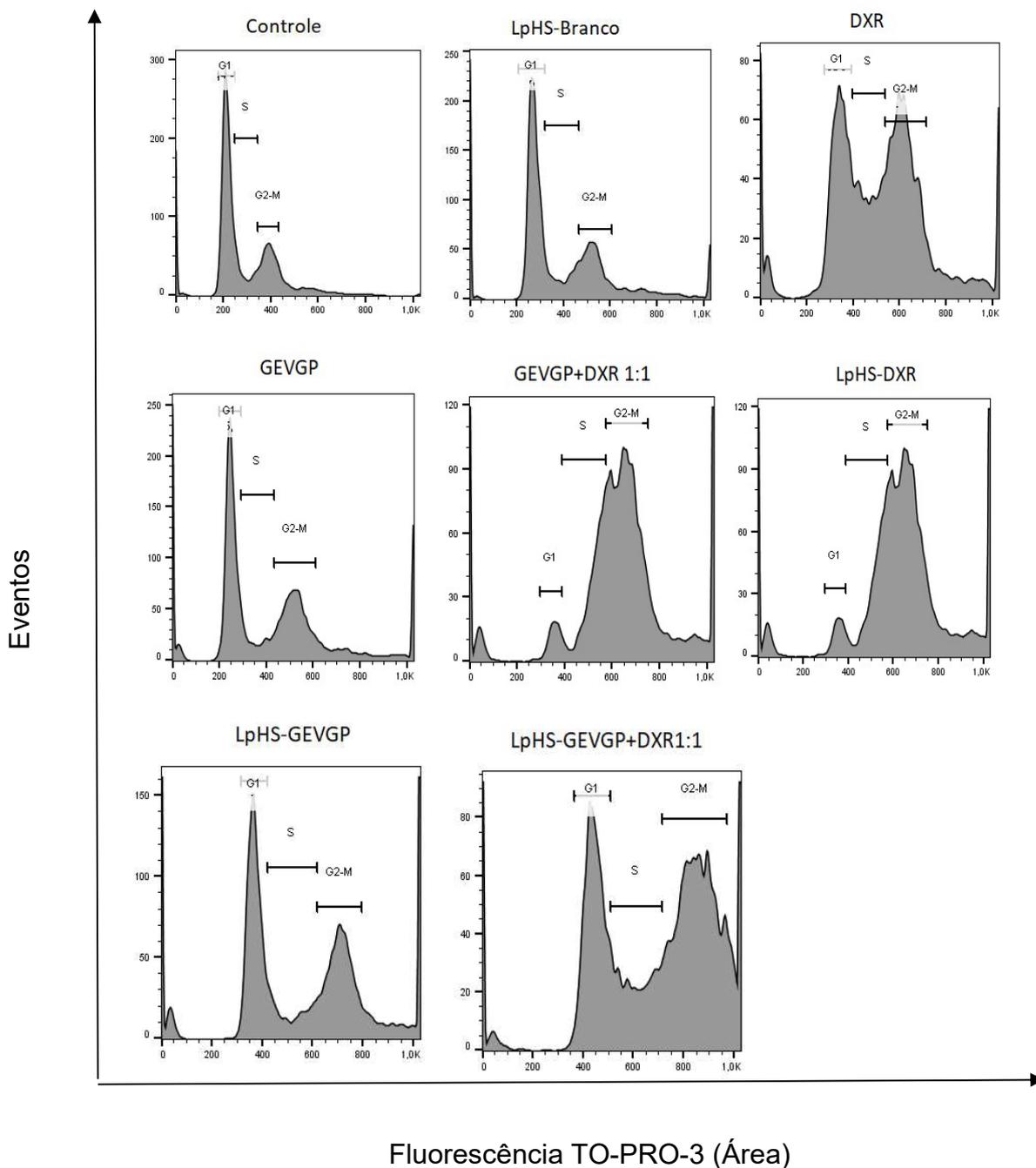
Sendo assim, de acordo com os resultados do estudo de CPD é possível verificar um grande potencial da formulação LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 para ser avaliada em estudos *in vivo*, uma vez que além de promover aumento da eficácia citotóxica a partir do sinergismo observado, pode minimizar os riscos de recidiva de tumores, pois as células tratadas com essa formulação não readquiriram a capacidade proliferativa.

### **5.8 Avaliação do ciclo celular**

O ciclo celular representa o conjunto de modificações pelo qual a célula passa para promover sua duplicação. Didaticamente, o ciclo celular pode ser dividido nas seguintes fases: G1 (fase na qual a célula está aumentando de tamanho e se preparando para a cópia do material genético em resposta a fatores de crescimento e sinais internos), S (etapa de replicação do DNA), G2 (preparação da célula para a mitose) e M (mitose celular). As fases G1, S e G2 compõem a intérfase, etapa na qual não há divisão celular, enquanto a fase M representa a etapa de divisão propriamente dita. A fase G0 é considerada como um estado de repouso e certas células nessa fase podem entrar no ciclo após indução por diversos fatores (KENNY *et al.*, 2004).

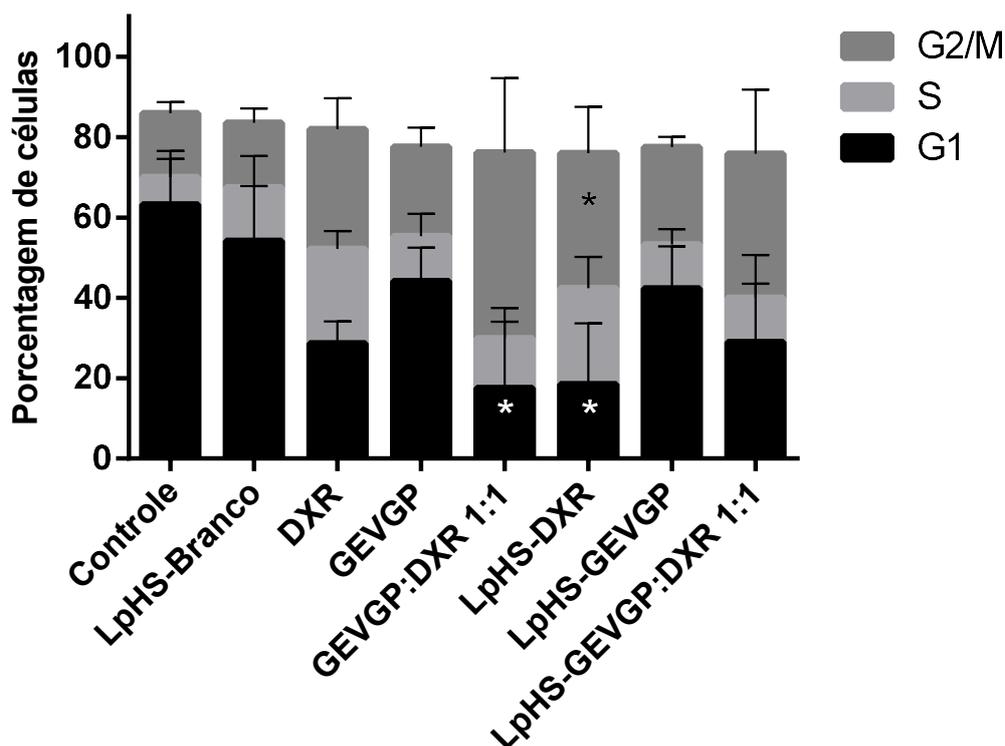
A avaliação da interferência no ciclo celular foi realizada em células de câncer de mama MDA-MB-231 para os seguintes tratamentos nas respectivas concentrações de  $CI_{50}$ : GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão molar de 1:1 e LpHS-branco. Apesar de ter sido observado o maior sinergismo na  $CI_{90}$ , para a avaliação do ciclo celular é necessário tratar as células de maneira que permaneçam células viáveis para alcançar o número de eventos necessários conforme o método descrito no item 4.2.10, o que inviabiliza a utilização de uma concentração que promova a morte de 90 % das células. Os resultados da avaliação do ciclo celular são mostrados nas Figuras 23 e 24.

**Figura 23 – Ciclo celular da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão molar de 1:1 e LpHS-Branco. Histograma obtido por citometria de fluxo**



**Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP+DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), isento de substâncias bioativas (LpHS-branco).**

**Figura 24 – Porcentagem das diferentes fases do ciclo em linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR razão 1:1 e LpHS-branco**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP+DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), isento de substâncias bioativas (LpHS-branco). Foram realizados três experimentos independentes. \* representa diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

A partir da análise das Figuras 23 e 24 é possível observar que para os grupos controle e LpHS-branco a maioria das células encontram-se na fase G1 do ciclo de divisão celular, evidenciando que os LpHS-branco não interferem no processo de proliferação. Já para as células que receberam os tratamentos com DXR, GEVGP e LpHS-GEVGP ocorreu um pequeno aumento da porcentagem de células na fase G2/M ( $29,83 \pm 7,68$  %,  $22,33 \pm 4,70$  %,  $24,23 \pm 2,51$  %, respectivamente) em relação ao grupo controle ( $15,83 \pm 2,75$ ) indicando que esses tratamentos promovem a parada do ciclo celular após a duplicação do material genético e impedem as células de continuarem o processo de duplicação. Os grupos tratados

com LpHS-DXR, GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 e LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 ( $33,70 \pm 11,44 \%$ ,  $46,20 \pm 18,51 \%$ ,  $35,80 \pm 16,01 \%$ , respectivamente), promoveram um acúmulo ainda maior das células na fase G2/M, indicando que a combinação dos compostos também pode promover o aumento da parada das células na fase G2/M. Diferença significativa foi observada apenas na diminuição da fase G1 das células tratadas com LpHS-DXR ou com a combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 não encapsulada, bem como no aumento de G2/M promovido pelo tratamento com LpHS-DXR, em relação ao grupo controle.

Schneider e colaboradores avaliaram o efeito do glicosídeo cardíaco digitoxigenina monodigitoxosídeo no ciclo celular da linhagem tumoral de pulmão humano A549 e verificaram que esse composto promoveu a parada de ciclo celular nas fases S e G2/M após 72 horas de tratamento (SCHNEIDER, 2018).

Conforme descrito, a DXR também promoveu a parada das células na fase G2/M. Estudos de Bar-On e colaboradores também demonstraram que a DXR levou a parada de células de tumor de mama humana MDA-MB-231 nessa fase do ciclo celular (BAR-ON, 2007).

O ciclo celular apresenta controles internos denominados pontos de verificação que impedem a célula de continuar o processo de divisão em casos específicos, como dano ao DNA. Os dois principais pontos de bloqueio estão na transição G1/S e G2/M. Durante essas pausas no ciclo são ativados mecanismos de reparo ao DNA, mediados, por exemplo, pela proteína p53. Caso o reparo não seja possível, a p53 ativa genes indutores de apoptose (MALUMBRES; CARNERO, 2003).

Nesse contexto é possível comparar os dados obtidos na avaliação do ciclo celular e o estudo de CPD, que avalia a capacidade de proliferação das células a longo prazo. A partir dos resultados de ciclo celular pode-se verificar um acúmulo de células na fase G2/M para os grupos tratados com DXR, LpHS-DXR, GEVGP, LpHS-GEVGP, combinação GEVGP+DXR 1:1 e LpHS-GEVGP+DXR 1:1. No estudo de CPD foi possível verificar que as células tratadas com GEVGP, LpHS-GEVGP, combinação GEVGP+DXR 1:1, readquiriram a capacidade de proliferação, o que sugere que a parada do ciclo não foi capaz de induzir os mecanismos de morte, ou seja, houve o reparo do material genético e as células sobreviventes, mesmo após uma parada no

ciclo, readquiriram a capacidade de se dividirem. Já para os grupos tratados com DXR, LpHS-DXR e LpHS-GEVGP+DXR 1:1, as células sobreviventes não readquiriram a capacidade de proliferação e morreram ao longo do tempo, o que sugere que o dano causado ao DNA, faz com que as células parem o ciclo celular na fase G2/M e a partir daí induzam mecanismos de morte. Novamente, a diferença observada entre os grupos tratados com a combinação GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 ou LpHS-GEVGP+DXR 1:1, pode estar relacionada à maior internalização da DXR e GEVGP mediada pelos lipossomas.

A partir dos resultados de ciclo celular e CPD, pode-se concluir que a formulação LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 apresenta um grande potencial de parada do ciclo celular na fase G2/M e não permite que as células sobreviventes readquiram a capacidade de proliferação, bem como induz a morte nessas células ao longo do tempo.

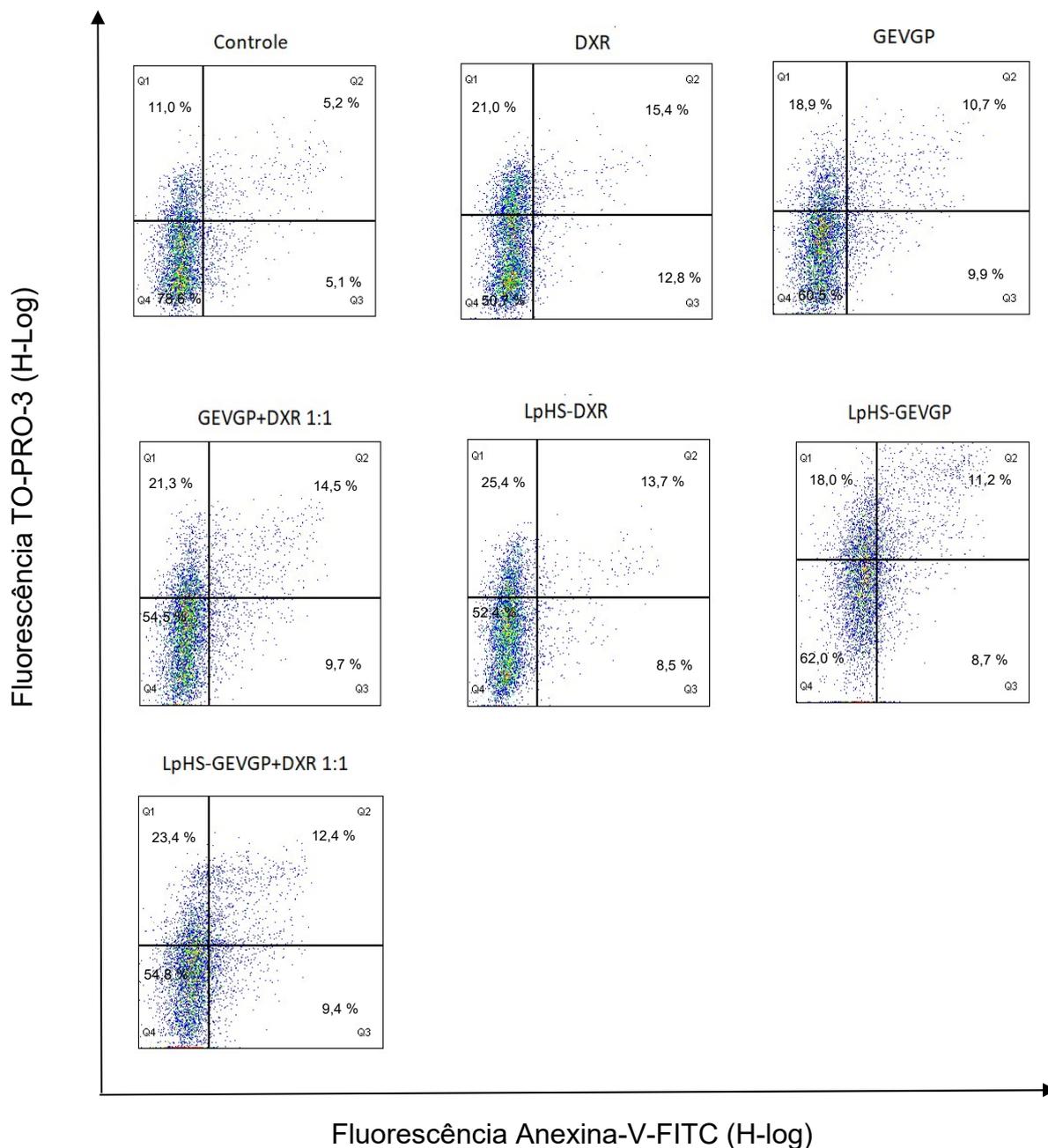
### **5.9 Avaliação da via de morte celular**

A homeostase dos tecidos é garantida a partir de um controle rigoroso entre a proliferação e morte celular. Dentre as formas de morte celular descritas, a apoptose é um tipo de morte programada que apresenta como características a inversão da fosfatidilserina do folheto interno da bicamada lipídica da membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e formação de vesículas denominadas corpos apoptóticos (STRASSER *et al.*, 2000). Outra forma de morte é a necrose, que apresenta como características morfológicas o aumento do volume celular, ruptura da membrana celular, com consequente liberação do conteúdo para o meio externo (PROSKURYAKOV *et al.*, 2003).

A avaliação do processo de morte celular foi realizada por citometria de fluxo, utilizando anexina-V-FITC e TO-PRO-3. A anexina-V é uma proteína que se liga à fosfatidilserina (lípidio presente na fase interna da bicamada lipídica celular) que se externaliza durante os estágios iniciais do processo apoptótico. Essa exposição ao meio extracelular da fosfatidilserina é um indicador para células em estágios iniciais de apoptose. O TO-PRO-3, por sua vez, penetra apenas em células com membrana celular comprometida, ou seja, é um indicador de processos necróticos.

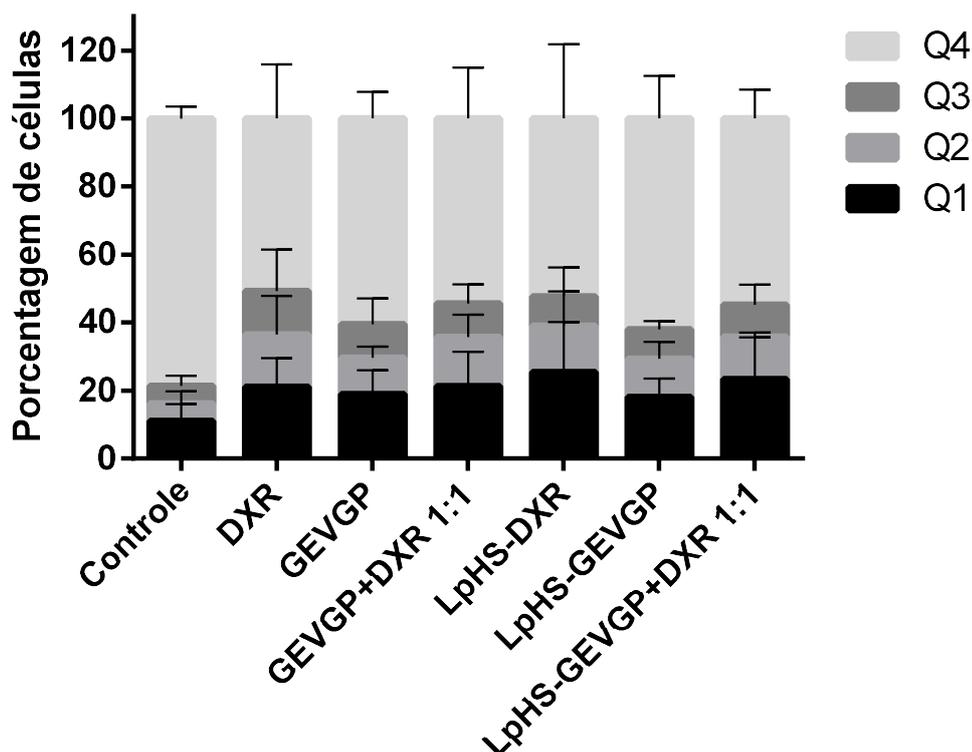
A elucidação do processo de morte envolvido para os tratamentos GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 e LpHS-Branco nas respectivas  $CI_{50}$  e  $CI_{90}$  foi realizada em células de câncer de mama MDA-MB-231. Os resultados são mostrados nas Figuras 25 e 26.

**Figura 25 – Perfil do processo de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 nas respectivas  $CI_{50}$**



**Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP+DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), concentração de inibição de 50 % do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média.**

**Figura 26 – Avaliação do processo de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 nas respectivas  $CI_{50}$**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP:DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), concentração de inibição de 50 % do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). Foram realizados três experimentos independentes. Não houve diferença significativa entre as razões testadas ( $p < 0.05$ ).

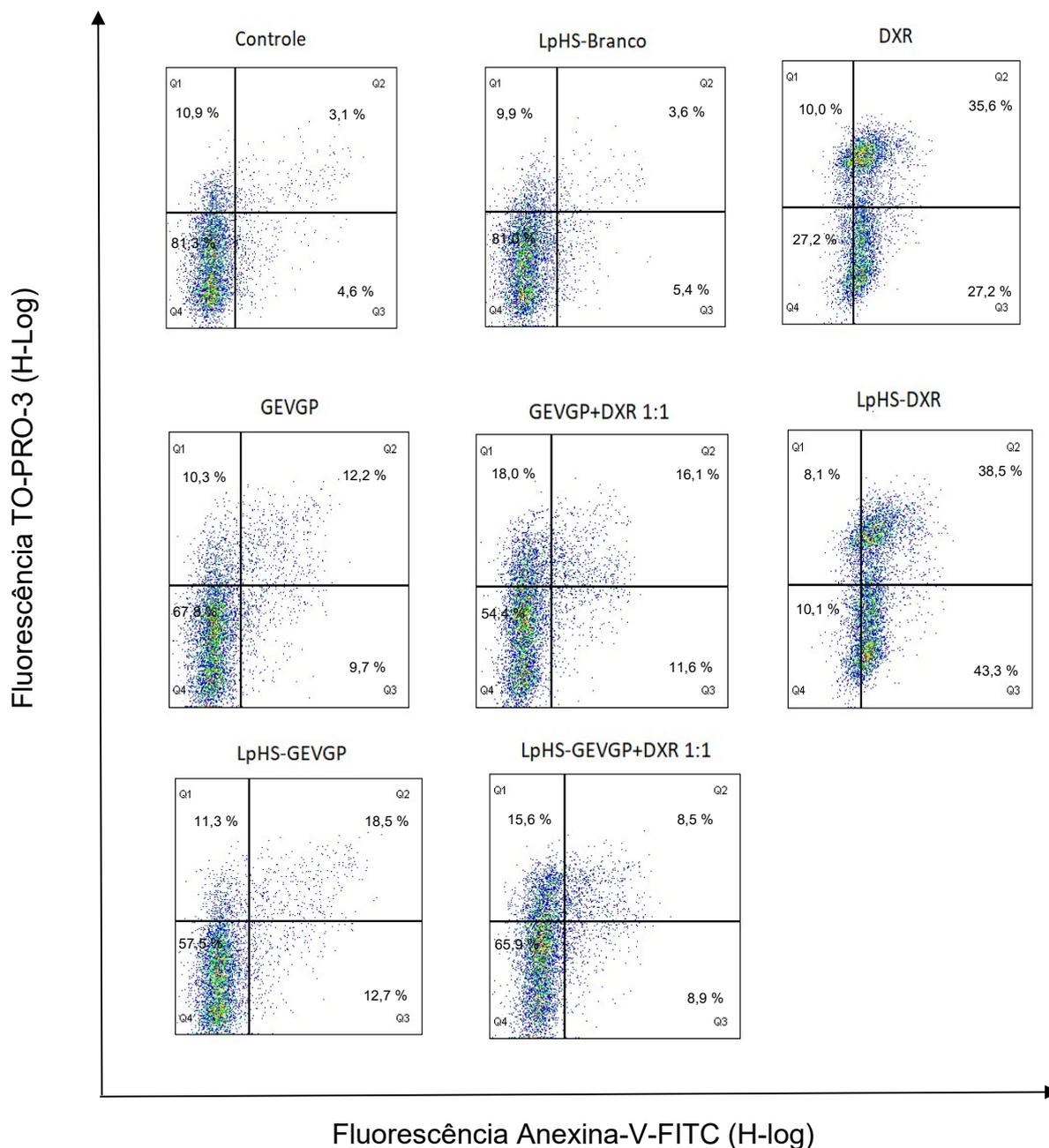
A partir da análise das Figuras 25 e 26, pode-se concluir que comparado ao grupo controle, todos os tratamentos promoveram um aumento das células em processo necrótico (Q1 – simples marcada para TO-PRO-3) e apoptóticos (Q2 – duplo marcada e Q3 – simples marcada para Anexina-V-FITC). É importante ressaltar que células em apoptose tardia permitem a permeação do TO-PRO-3 pela membrana, o que justifica a dupla marcação.

Em relação aos tratamentos realizados com as respectivas  $CI_{90}$ , Figuras 27 e 28, pode-se concluir que os grupos tratados com DXR e LpHS-DXR promoveram um aumento da porcentagem das células em processos apoptóticos (Q2 e Q3) o que

indica que a encapsulação não altera o processo de morte. Os grupos tratados com GEVGP, LpHS-GEVGP, GEVGP+DXR na razão molar 1:1 e LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1, apresentaram baixa indução de morte por processos apoptóticos ou necróticos. De acordo com esses resultados, pode-se sugerir que o processo de morte induzido nas células que receberam esses tratamentos não esteja envolvido com a necrose ou apoptose. Schneider avaliou o processo de morte do glicosídeo cardíaco digitoxigenina monodigitoxosídeo e percebeu uma baixa indução de morte por apoptose e aumento de células em processo de morte autofágica (SCHNEIDER, 2015). Dessa maneira, a baixa indução de morte por apoptose e/ou necrose nos grupos tratados com a combinação GEVGP e DXR livre e encapsulada em lipossomas, pode estar relacionada ao possível diferente mecanismo de morte induzido pelo GEVGP. O LpHS-branco não desencadeou nenhum dos processos de morte avaliados no estudo.

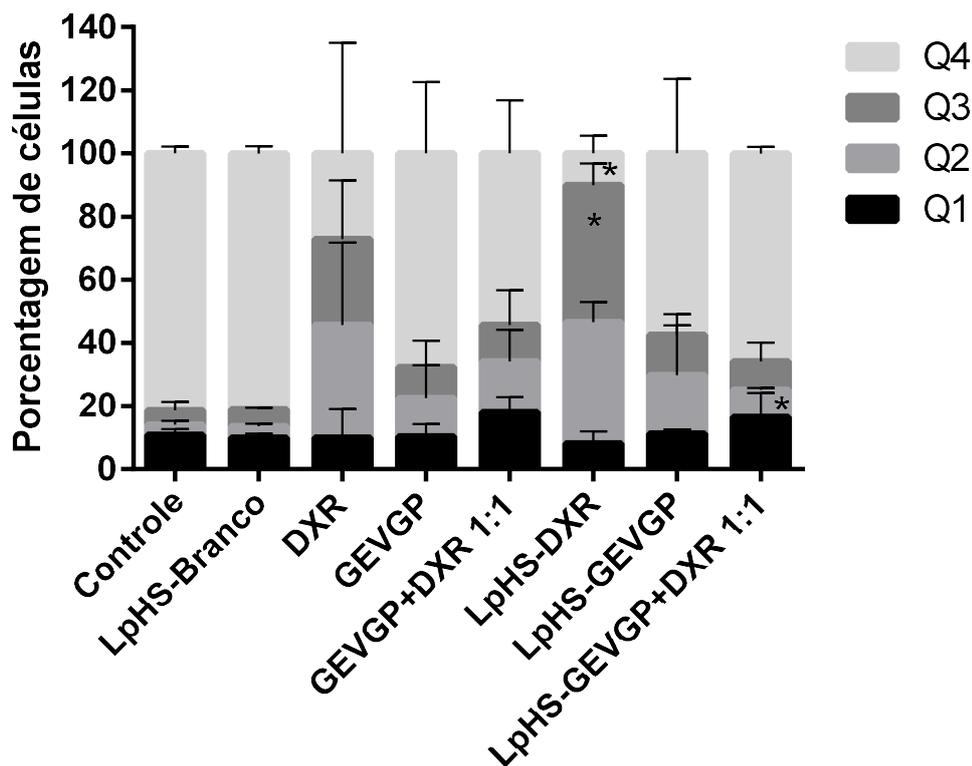
A elucidação dos processos de morte geralmente é realizada por experimentos complementares para maior compreensão das vias envolvidas. Sendo assim, torna-se importante a realização de outros ensaios para se confirmar o processo de morte.

**Figura 27 – Perfil do processo de morte em células MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR 1:1 e LpHS-Branco nas respectivas  $CI_{90}$**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP e DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP:DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP e DXR na razão molar de 1:1 (LpHS-GEVGP+DXR 1:1), isento de substâncias bioativas (LpHS-branco), concentração de inibição de 90 % do crescimento celular ( $IC_{90}$ ). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados são apresentados como média.

**Figura 28 – Avaliação do processo de morte em células de câncer de mama MDA-MB-231 após tratamentos com GEVGP livre, DXR livre, combinação GEVGP+DXR na razão molar 1:1, LpHS-GEVGP, LpHS-DXR, LpHS-GEVGP+DXR na razão molar de 1:1 e LpHS-Branco nas respectivas  $CI_{90}$**



Doxorrubicina (DXR), glicoevatromonosídeo com as hidroxilas da glicose peracetiladas (GEVGP), combinação de GEVGP e DXR na razão molar de 1:1 (GEVGP:DXR 1:1), lipossomas fusogênicos de circulação prolongada contendo GEVGP (LpHS-GEVGP), DXR (LpHS-DXR), combinação de GEVGP e DXR na razão molar de 1:1 (LpHD-GEVGP+DXR 1:1), isento de substâncias bioativas (LpHS-Branco), concentração de inibição de 90 % do crescimento celular ( $IC_{50}$ ). Foram realizados três experimentos independentes. \*representa diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que a combinação de DXR e GEVGP na razão molar de 1:1 apresentou maior sinergismo frente a linhagem de tumor de mama humana MDA-MB-231. A partir da obtenção da melhor razão sinérgica, foi possível desenvolver LpHS-GEVGP+DXR 1:1 que apresentaram características químicas e físico-químicas adequadas para a administração endovenosa, bem como estabilidade por 90 dias em termos de diâmetro médio, IP, potencial zeta, TE de GEVGP e DXR e manutenção da razão molar encapsulada. Os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 apresentaram ainda uma liberação lenta tanto de GEVGP, quanto de DXR permitindo ainda a manutenção da razão molar na formulação. Apesar de não ter apresentado pH-sensibilidade, o caráter fusogênico da DOPE pode permitir maior liberação das substâncias bioativas encapsuladas no interior das células em comparação com os lipossomas convencionais.

Os resultados dos estudos de citotoxicidade e a utilização do *software* CompuSyn®, permitiram verificar que os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 apresentam efeito sinérgico na  $Cl_{90}$  nas três linhagens de tumor de mama humana avaliadas (MDA-MB-231, MCF-7 e SKBR-3), bem como mostrou-se seletiva para essas linhagens em comparação com fibroblastos humanos não-tumorais.

A avaliação do efeito a longo prazo (estudo de CPD) permitiu concluir que as células da linhagem MDA-MB-231 sobreviventes após o tratamento com os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 não readquiriram a capacidade de proliferação, sendo posteriormente induzidas a morte.

O estudo do ciclo celular após tratamento das células MDA-MB-231 com LpHS-GEVGP+DXR 1:1 mostrou a indução da parada do ciclo na fase G2/M, o que está relacionado com os mecanismos de inibição de topoisomerase II dos dois compostos encapsulados na formulação. Além disso, foi possível observar uma baixa indução de morte por apoptose e necrose, sugerindo que o mecanismo de morte promovido pelos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 pode estar relacionado a outros processos.

Dessa maneira, os resultados obtidos demonstraram que os LpHS-GEVGP+DXR 1:1 podem se apresentar como uma alternativa promissora para o tratamento do câncer de mama.

## 7 PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, algumas perspectivas são propostas:

- Estudo de possíveis interações entre GEVGP e DXR com a bicamada lipídica, utilizando técnicas de análise térmica e difração de raios X a fim de compreender a perda da pH-sensibilidade da formulação de LpHS-GEVGP+DXR 1:1.
- Avaliação da eficácia antitumoral dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1 em modelos xenográficos de tumor de mama.
- Avaliação *in vitro* e *in vivo* da cardiotoxicidade dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1.
- Estudo da internalização celular dos LpHS-GEVGP+DXR 1:1, utilizando técnica de microscopia de fluorescência confocal.
- Elucidação das vias de morte induzidas pelos LpHS-GEVGP+DXR 1:1.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACS, AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-breast-cancer>. Acesso em 04 de janeiro de 2018.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, p. 118 - 129, 2005.
- BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions the lamellae os swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238 - 252, 1965.
- BAR-ON, O.; SHAPIRA, M.; HERSHKO, D. D. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and Skp2 expression in breast cancer cells. *Anti-Cancer Drugs* v. 18, p. 1113 – 1121, 2007.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, p. 167-179, 2007.
- BELKACÉMI, Y.; TSOUTSOU, P.; MAGNÉ, N.; CASTADOT, P.; AZRIA, D. Metabolic functional imaging for tumor radiosensitivity monitoring. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 62, p. 227 - 239, 2007.
- BOX, V. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. v. 26, p. 14 - 19, 2007.
- CARVALHO, Annelise de. Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenólídeos em células tumorais. 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- CARVALHO, C.; SANTOS, R. X.; CARDOSO, S.; CORREIA, S.; OLIVEIRA, P.J.; SANTOS, M. S.; MOREIRA, P. I. Doxorubicin: The Good, the Bad and the UglyEffect. *Current Medicinal Chemistry*. v. 16, p. 3267 - 3285, 2009.
- CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 125, p. 139-146, 2003.
- CHOU, T. C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Farmacology Review*. v. 58, p. 621 - 681, 2006.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*. v. 23, p. 1417 – 1450, 2006.
- DAVIES, M.A.; SAMUELS, Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. v. 29, p. 5545 - 5555, 2010.

DOLMANS, D.E.J.G.J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R.K. Photodynamic therapy for câncer. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, p. 381 - 387, 2003.

ELDAR-BOOCKANAT, A.; POLYAK, D.; SCOMPARIN, A.; SATCHI-FAINARO, R.. Nano-sized polymers and liposomes designed to deliver combination therapy for cancer. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 24, p.682 - 689, 2013.

FAN, L.; LI, F.; ZHANG, H.; WANG, Y.; CHENG, C.; LI, X.; GU, C.H.; YANG, Q.; WU, H.; ZHANG, S. Co-delivery of PDTC and doxorubicin by multifunctional micellar nanoparticles to achieve active targeted drug delivery and overcome multidrug resistance. *Biomaterials*, v. 31, p.5634 - 5642, 2010.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Review Cancer*. v. 5, p. 161 - 171, 2005.

FERREIRA, D.D.S. Desenvolvimento de lipossomas pH-sensíveis de superfície modificada com alendronato contendo doxorubicina para a aplicação no tratamento de metástases ósseas em modelo animal experimental, 239 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

FERREIRA, D.S.; LOPES, S.C.A.; FRANCO, M.S.; OLIVEIRA, M.C. pH sensitive liposomes for drug delivery in cancer treatment. *Therapeutic Delivery*, v. 4, p. 1099 - 1123, 2013.

FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*. v.285, p.1182 - 1186, 1971.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Research*. v. 7, nº 5, p. 1016 - 1036, 2017.

FRÉZARD, F.; SILVA-BARCELOS, N. M.; SANTOS, R.A.S. A novel approach based on nanotechnology for investigating the chronic actions of short-lived peptides in specific sites of the brain. *Regulatory Peptides*, v. 138, p. 59 - 65, 2007.

GOORMAGHTIGH, E.; HUART, P.; PRAET, M.; BRASSEUR, R.; RUYSSCHAERT, J.M. Structure of the adriamycin-cardiolipin complex: role in mitochondrial toxicity. *Biophysical Chemistry*. v. 35, p. 247 - 257, 1990.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. v. 144, p. 646 - 674, 2011.

HARAN, G.; COHEN, R.; LILIANA, K.; BAR; BARENHOLZ, D. Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1151, p. 201 - 215, 1993.

HOBBS, S. K.; MONSKY, W. L.; YUAN, F.; ROBERTS, W. G.; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. v. 95, p. 4607-4612, 1998.

HODGINS, D.S. CHANDRA U SINGH (San Antonio, Texas). Novel formulations of digitalis glycosides for treating cell-proliferative and other diseases. US 2004/0082521 A1, 31 de março de 2003, 29 de abril de 2004.

HODGINS, D.S. CHANDRA U SINGH (San Antonio, Texas). *Novel formulations of digitalis glycosides for treating cell-proliferative and other diseases*. US 2004/0082521 A1, 31 de março de 2003, 29 de abril de 2004.

HOYE, A.; DAVOREN, J.; WIPF, P. Targeting Mitochondria. *Accounts of Chemical Research*. v. 41, p. 87 - 97, 2008.

IMMORDINO, M.M.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, v. 1, n° 3, p. 297-315, 2006.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatísticas, Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/index.asp>>. Acesso em 04 de janeiro de 2018.

JUNCKER, T.; CERELLA, C.; TEITEN, M.H.; MORCEAU, F.; SCHUMACHER, M.; GHELFI, J.; GAASCHT, F.; SCHNEKENBURGER, M. HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*. v. 81, n° 1, p.13 - 23, 2011.

JUNCKER, T.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. *Biochemical Pharmacology*. v. 78, p.1–10, 2009.

KATZ, H.; ALSHREDI, M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Medical Oncology*. v. 53, n° 13, p. 1 - 9, 2018.

KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. *Clinical Oncology*, v. 16, p. 176-185, 2004.

KIM, Y.J.; LIU, Y.; LI, S.; ROHRS, J.; ZHANG, R.; ZHANG, X.; WANG, P. Co-eradication of breast cancer cells and cancer stem cells by cross-linked multilamellar liposomes enhances tumor treatment. *Molecular Pharmaceutics*. v. 12, p. 2811 - 2822, 2015.

KIYOMIYA, K.; MATSUO, S.; KUREBE, M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Research*. v.61, p. 2467 - 2471, 2001.

LAGE, H. ABC-transporters: Implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v.22, p. 188 - 199, 2003.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p.307 - 321, 1998.

LEE, R. J.; WANG, S.; TURK, M. J.; LOW, P. S. The Effects of pH and Intraliposomal Buffer Strength on the Rate of Liposome Content Release and Intracellular Drug Delivery. *Bioscience Reports*. v.18, n° 2, p. 69 – 78, 1998.

- LEITE, E.A.; LANA, A.M., JUNIOR, A.D., COELHO, L.G., DE OLIVEIRA, M.C. Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 229 - 239, 2012.
- LIANG, M.; TIAN, J.; LIU, L.; PIERRE, S.; LIU, J.; SHAPIRO, J. XIE, Z.J. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 282, nº 14, p.10585 - 10593, 2007.
- LITZINGER, D.C.; BUITING, A.M.; VAN ROOIJEN, N.; HUANG, L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1190, n.1, p.99 - 107, 1994.
- LOPES, S.C.A.; GIUBERTI, C.S.; ROCHA, T.G.R.; FERREIRA, D.S.; LEITE, E.A.; OLIVEIRA, M.C. Liposomes as carriers of anticancer drugs. In: Letícia Rangel. (Org.). *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. 1ed. Rijeka, Croácia: InTech, v. 1, p. 85 - 124, 2013.
- LÓPEZ, L. M.; PASTOR, N.; AZRAK, S.S.; AYUSO, M.J.; AUSTIN, C.A.; CORTÉS, F. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients. *Journal of Natural Products*. v. 68. nº 11, p. 1642 - 1645, 2005.
- MACIAS, H.; HINCK, L.; Mammary gland development, Wiley Interdiscip. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.v. 1, p. 533 - 557, 2012.
- MACK, G.S.; MARSHALL A. Lost in Migration. *Nature Biotechnology*. v. 28, n. 3, p. 214 - 229, 2010.
- MALMBERG, K.J. Effective immunotherapy against cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy*. v. 53, p. 879 - 892, 2004.
- MALUMBRES, M.; CARNERO, A. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle Research*. v. 5, p. 5 - 18, 2003
- MARONI, L.C.; SILVEIRA, A.C.O.; LEITE, E.A.; MELO, M.M.; RIBEIRO, A.F.C.; CASSALI, G.D.; SOUZA, C.M.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CALDAS, I.R.; ARAUJO, M.S.S.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA- CARVALHO, A. Antitumor effectiveness and toxicity of cisplatin-loaded long- circulating and pH-sensitive liposomes against Ehrlich ascitic tumor. *Experimental Biology and Medicine*, n. 237, p. 973 - 984, 2012.
- MAYER, L.D.; HARASYM, T.O.; TARDI P.G.; HARASYM, N.L.; SHEW, C.R.; JOHNSTONE, S.A; Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. v. 5, p.1854 - 63, 2006.
- MAYER, L.D.; JANOFF, A.S. Optimizing combination chemotherapy by controlling drug ratio. *Molecular Interventions*. v. 7, p. 216 – 223, 2007.
- MCCONKEY, D.J.; LIN, Y.; NUTT, L.K.; OZEL, H.Z.; NEWMAN, R.A. (2000) Cardiac glycosides stimulate  $Ca^{2+}$  increases and apoptosis in androgen-independent,

metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Research*. v. 60, nº 14, p. 3807 - 3812, 2000.

MENGER, L.; VACCHELLI, E.; KEPP, O.; EGGERMONT, A.; TARTOUR, E.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. Trial watch: Cardiac glycosides and cancer therapy. *Oncoimmunology*, v. 2, nº 2, 2013.

MEREDITH, ANN-MARIE; CRISPIN R. DASS. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, p.1 - 13, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia. Brasília, 2014.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. v. 56, p. 185 - 229, 2004.

MONTEIRO, N., MARTINS, A., REIS, R. L., NEVES, N.M. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of the royal society Interface*, V. 11, 2014.

MUNKERT, J.; SANTIAGO, F. M.; NOLTE, E.; SILVA, T. I.; OLIVEIRA, C. R.; MELO, O. F.; SCHNEIDER, N. F. Z.; OLIVEIRA, M. C.; TAUBERT, H.; BAUER, W.; ANDRADE, S. F.; ALVES, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; BRAGA, F. C.; KREIS, W.; DE PÁDUA, R. M. Production of the Cytotoxic Cardenolide Glucoevatromonoside by Semisynthesis and Biotransformation of Evatromonoside by a *Digitalis lanata* Cell Culture. *Planta Medica*. v. 83, p. 1035 - 1043, 2017.

NEW, R.R.C. Liposomes- a practical approach. New York: *Oxford University Press*, p. 229, 1990.

NOHL, H.; GILLE, L.; STANIEK, K. The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines. *Zeitschrift Fur Naturforschung*. v. 53, p. 279 - 285, 1998.

NUÑEZ, C.; CAPELO, J.L.; IGREJAS, G.; ALFONSO, A.; BOTANA, L.M.; LODEIRO, C. An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. *Biomaterials*, v. 9, p. 34 - 50, 2016.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis. *Nature Review Molecular Cell Biology*. v.4, nº 7, p. 552 - 565, 2003.

PAPAHADJOPOULOS, D.; GABIZON, A.A. Sterically stabilized (Stealth®) liposomes: pharmacological properties and drug carrying potential in cancer. In: PHILIPPOT, J.R.; SCHUBER, F. *Liposomes as tools in basic research and industry*. CRC Press. Cap. 11, p. 177 - 188, 1995.

PARK, S.; KOO, J.S.; KIM, M.S.; PARK, H.S.; LEE J.S.; LEE, J.S. Androgen receptor expression is significantly associated with better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancers. *Annals Oncology*. v. 22, p.1755 - 1762, 2011.

PAVILLARD, V.; KHERFELLAH, D.; RICHARD, S.; ROBERT, J.; MONTAUDON, D.; Effects of the combination of camptothecin and doxorubicin or etoposide on rat glioma cells and camptothecin-resistant variants. *British Journal of Cancer*. v. 85, p.1077 - 1083, 2001.

PAVLOVA, N.N.; THOMPSON, C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism*. v. 23, p. 27 - 47, 2016.

PEER, D.; JEFFREY, M. K.; SEUNGPYO, H.; OMID C. F.; RIMONA, M.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. v. 2, p. 751 - 760, 2007.

PETRIOLI, R.; FIASCHI, A.; FRANCINI, E.; PASCUCCI, A.; FRANCINI, G. The role of doxorubicin and epirubicin in the treatment of patients with metastatic hormonerefractory prostate cancer. *Cancer Treat Reviews*. v. 34, p.710 - 718, 2008.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nature Reviews*, v.7, p. 926 - 935, 2008.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res*, v. 283, nº 1, p. 1 - 16, 2003

RAHIMTOOLA, S. H.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. *Current Problems in Cardiology*. v. 21, p.781 - 853, 1996.

SCHNEIDER, Naira Fernanada Zanchett. Avaliação da ação citotóxica de cardenólídeos em células tumorais. 2015. Tese (Doutorado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SCHEINER-BOBIS G. The sodium pump: its molecular properties and mechanics of ion transport. *European Journal of Biochemistry*. v.269, p. 2424 - 2433, 2002.

SCHNEIDER, N. F. Z.; PERSICH, L.; ROCHA, S. C.; RAMOS, A. C. P.; CORTES, V. F.; SILVA, I. T.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M.; KREIS, W.; TARANTO. A. G.; BARBOSA, L. A.; BRAGA, F. C.; SIMÕES, C. M. O. Cytotoxic and cytostatic effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) in human lung cancer cells and its link to Na,K-ATPase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 97, p. 684 – 696, 2018.

SHAIKH, I. M.; TAN, K. B.; CHAUDHURY, A.; LIU, Y.; TAN, B. J.; TAN, B. M.; CHIU, G. N. Liposome co-encapsulation of synergistic combination of irinotecan and doxorubicin for the treatment of intraperitoneally grown ovarian tumor xenograft, *Journal of. Controlled Release*, 2013.

SHI, J.; KANTOFF, P. W.; WOOSTER, R.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*. p. 1 - 18, 2016.

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, A.O. *et al.* A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumor Biology*, 2016.

SILVA, F.; CARVALHO, S.; MILANEZI, F.; SCHMITT, F.C. Carcinoma da mama de tipo basal. *Acta Med Port.*, V. 21. p. 373 - 378, 2008.

SILVA, Izabella Thaís da. Avaliação da ação citotóxica e antitumoral de cucurbitacinas naturais e derivados semissintéticos. 2013. 229 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M.C.P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 947 - 965, 2004.

SLINGERLAND, M.; CERELLA, C.; GUCHELAAR, H. J. DIEDERICH, M.; GELDERBLUM, H. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigation towards clinical trials. *Invest New Drugs*. v.31, p. 1087 - 1094, 2013.

STENKVIST, B.; BENGTSSON, E.; ERIKSSON, O.; HOLMQUIST, J.; NORDIN, B.; WESTMAN-NAESER, S. Cardiac glycosides and breast cancer. *Lancet*, v.1, p. 563, 1979.

STENKVIST, B.; BENGTSSON, E.; DAHLQVIST, B.; ERIKSSON, O.; JARKRANS, T.; NORDIN, B. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. *The New England Journal of Medicine*. v. 306, p. 484 ,1982.

STENKVIST, B.; BENGTSSON, E.; EKLUND, G.; ERIKSSON, O.; HOLMQUIST, J.; NORDIN, B.; WESTMAN-NAESER, S. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. *Analytical and Quantitative Cytology*. v.2. p. 49 - 54, 1980.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. v. 69, p. 217 - 245, 2000.

TAKASHIMA, A. Establishment of fibroblast cultures. In: BONIFACINO, J.S. *et al.*, editors. **Current Protocols in Cell Biology**. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 1998, p. 1-12

TORCHILIN, V. Targeted Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging. *The AAPS Journal*, v. 9 (2). p. 128 - 147, 2007.

TURASHVILI, G.; BROGI, E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Frontiers in Medicine*. v. 4, p. 1 - 11, 2017.

ULRICH, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*. v. 22, nº 2, p. 129-150, 2002.

UNNATI, S.; RIPAL, S.; SANJEEV, A.; NIYATI, A. Novel anticancer agents from plants sources. *Chinese Journal of Natural Medicines*. v. 11, p. 16 - 23, 2013.

VAHED, S. V.; SALEHI, R.; DAVARAN, S.; SHARIFI, S. Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells. *Materials Science and Engineering C*, Article in press, 2016

VANNEMAN, M.; DRANOFF, G. Combining Immunotherapy and Targeted Therapies in Cancer Treatment. *Nature Reviews Cancer*. v. 12, n° 4, p. 237 - 251, 2012.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, n. 70, p. 95 - 111, 1995.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. v. 1, n° 3, p. 1112 - 1116, 2006.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>>. Acesso em 10 de janeiro de 2018.

WONG, H.L.; BENDAYAN, R.; RAUTH, A.M.; LI, Y.; WU, X.Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 491 - 504, 2007.

YANG, M. M.; WILSON, W. R.; Wu, Z. pH-Sensitive PEGylated liposomes for delivery of an acidic dinitrobenzamide mustard prodrug: Pathways of internalization, cellular trafficking and cytotoxicity to cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 516, p. 323–333, 2017.

YANG, T.; CUI, F. D.; CHOI, M.K.; CHO, J.W.; CHUNG, S. J.; SHIM, C.K.; KIM, D.D. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 317 - 326, 2007.

YE, X.; WEINBERG, R.A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. *Trends in Cell Biology*. v. 25, p. 675 - 686, 2015.

YU, S. P. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Progress Neurobiology*. v.70, n° 4, p. 363 - 386, 2003.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D. A.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Vascular-permeability in a human tumor xenograft — Molecular-size dependence and cutoff size. *Cancer Research*. v. 55, p. 3752 – 3756, 1995.