

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

GABRIEL SILVA MARQUES BORGES

**ENCAPSULAÇÃO DO DITERPENO ESCLAREOL EM CARREADORES
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS E SEU EFEITO SINÉRGICO COM A
DOXORRUBICINA**

**Belo Horizonte - MG
2017**

GABRIEL SILVA MARQUES BORGES

**ENCAPSULAÇÃO DO DITERPENO ESCLAREOL EM CARREADORES LIPÍDICOS
NANOESTRUTURADOS E SEU EFEITO SINÉRGICO COM A DOXORRUBICINA**

Dissertação apresentada por Gabriel Silva Marques Borges 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.

Área de concentração:
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Professor Lucas Antônio Miranda Ferreira

Belo Horizonte - MG
2017

COLABORADORES

Pedro Henrique Dias Moura Prazeres- Departamento de Fisiologia e Biofísica- Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. José Mario Carneiro Vilela- Centro de Tecnologia Senai (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial)/Cetec (Centro Tecnológico de Minas Gerais)

Dra. Margareth Spangler Andrade- Centro de Tecnologia Senai (Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial)/Cetec (Centro Tecnológico de Minas Gerais)

Dra. Mariana Silva Oliveira- Departamento de Produtos Farmacêuticos- Faculdade de Farmácia- Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Dawidson Assis Gomes- Departamento de Bioquímica e Imunologia- Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Minas Gerais

Professora Elaine Maria de Souza Fagundes- Departamento de Fisiologia e Biofísica- Instituto de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, pela vida, pela saúde e pela oportunidade de ter algo em um país onde tantos têm tão pouco.

Ao Professor Lucas por ter me recebido tão bem no seu grupo de pesquisa. Muito obrigado por todos os ensinamentos, por ser tão presente na condução desse trabalho e pelo grande exemplo de conhecimento científico e humildade.

Aos meus pais Irene Izabel e Luiz Tadeu pela doação incondicional, pelo amor, por todo o apoio e por permitirem que eu realizasse meus desejos. Minha mais profunda gratidão e amor.

À minha irmã Carolina por ser minha primeira amiga e por ser sempre meu exemplo de competência e capacidade.

Aos meus avós João e Lilia que, do outro plano, me veem e sempre iluminam meus passos.

À toda minha família, tios e primos, por todo o convívio e apoio desses anos. À Luciene por ser minha primeira educadora por tanto contribuir na minha formação.

À Professora Elaine Fagundes por ter aceitado a colaboração que tanto acrescentou ao trabalho. Muito obrigado por todo o suporte prestado e pela ótima recepção em seu laboratório.

Ao Pedro por toda ajuda nos experimentos no ICB. Muito obrigado por todo o cuidado e auxílio nos experimentos e por toda a presteza em sua discussão.

Aos professores do LTF: André, Elaine, Gilson, Gisele e Mônica, pelo convívio sempre sadio, por toda ajuda e por serem grandes exemplos.

A todos os colegas do LTF: Aina, Aline, Ana Luiza, Carol, Dalila, Daniele, Délia, Eliza, Fernanda, Heloísa, Izabela, Jaqueline, Juliana, Liziane, Livia, Lucas, Marcela, Marcus, Mariana, Marina, Marjorie, Mayara, Nayara, Renata e Sália. Pela imensurável ajuda, pelos valiosos ensinamentos, por todas as horas do convívio mais agradável. É um prazer conviver com pessoas tão brilhantes como vocês.

Aos técnicos da Faculdade por toda a ajuda prestada: Batista, Eduardo, Ernane e Vinícius.

A todos meus amigos, em especial aos do CSA e da UFOP, por tornarem a vida mais leve.

Aos professores Leonardo Cardoso e José Mário da UFOP e à professora Sheng Qi da UEA pelos valiosos ensinamentos da iniciação científica, que tanto contribuíram para o meu crescimento.

Àqueles que contribuíram na minha formação profissional fora da academia: aos colegas da FURP e Procarta que tanto me ensinaram.

A todos que contribuíram na caminhada até aqui.

“Fazei de mim, um instrumento de Vossa paz”.

Oração de São Francisco

RESUMO

A forma mais usada para o tratamento de cânceres já difundidos pelo organismo é a quimioterapia. Devido à sua alta toxicidade e problemas de resistência, fazem-se necessárias novas opções para o tratamento quimioterápico das neoplasias. Uma importante fonte de novos compostos com atividade terapêutica é o Reino Vegetal. O diterpeno esclareol, isolado primeiramente da *Salvia sclarea*, é uma molécula que vem despertando interesse devido às suas atividades citostáticas e citotóxicas em diversas linhagens de câncer. Sua hidrofobicidade, contudo, é um limitante para sua administração *in vivo*. Dessa maneira, encapsulou-se o esclareol em Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN), o que permite que doses maiores dele possam ser veiculadas *in vivo*. Comparou-se a citotoxicidade *in vitro* do esclareol na sua forma livre e encapsulada em CLN em duas linhagens tumorais humanas: MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama) e HCT-116 (carcinoma de cólon). Viu-se que a citotoxicidade do esclareol é reduzida quando ele se encontra em CLN para ambas as linhagens. Ademais, viu-se que para a linhagem HCT-116, enquanto o esclareol na forma livre levava a geração de DNA subdiploide, o esclareol em CLN gerava parada em G2/M. Isso pode ser um indicativo de um diferente mecanismo de morte celular, o que pode ser uma explicação para a menor morte celular gerada pelos CLN contendo esclareol. Assim, os CLN são uma alternativa para a veiculação do esclareol, mas parecem diminuir seus efeitos. Dessa maneira, tentou-se produzir CLN carregando esclareol e um conhecido fármaco antineoplásico, a doxorubicina. Produziu-se CLN contendo doxorubicina (0,05% p/v) e duas diferentes concentrações de esclareol (0,05 e 0,20% p/v). Os CLN produzidos tiveram tamanho adequado e controlaram a liberação da doxorubicina em meio PBS pH 7,4. Viu-se que para os CLN contendo 0,05% p/v de esclareol, há um efeito sinérgico entre as duas moléculas na linhagem MDA-MB-231. Dessa maneira, os CLN são também uma opção para veicular conjuntamente o esclareol e a doxorubicina, mantendo o efeito sinérgico entre elas, indicando uma alternativa promissora para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Câncer, produtos naturais, esclareol, carreadores lipídicos nanoestruturados, doxorubicina, sinergismo.

ABSTRACT

Cancer is a big public health issue all over the world. The most common way to treat cancers already spread throughout the body is through chemotherapy. Due its high toxicity and resistance issues, new options for the chemotherapeutic treatment of neoplasias are required. An importante source of new compounds with therapeutic activity is the Vegetal Kingdom. The diterpene sclareol, first isolated from *Salvia sclarea*, is a molecule that is arousing interest due its cytosatatic and cytotoxic activities in several cancer cell lines. Its hydrophobicity, however, is a limiting factor for its *in vivo* administration. Trying to solve this issue, sclareol was loaded in Nanostrucured Lipid Carriers (NLC), what would allow its *in vivo* administration in higher doses. The *in vitro* cytotoxicity of the sclareol and the sclareol loaded NLC was evaluated in two human tumour cell lines: MDA-MB-231 (breast adenocarcinoma) and HCT-116 (colon carcinoma). It was observed that, when loaded in NLC, the cytotoxicity of sclareol is diminished in both cell lines. Moreover, for the HCT-116 cell line, the sclareol produced subdiploid content when not enpasulated, but when in NLC, it produced cell cycle arrest in the G2/M checkpoint. This can be an indicative of a different cell death mechanism induced by the sclareol loaded NLC, what could explain the smaller cytotoxicity of them. In that way, the NLC are an alternative for the veiculation of sclareol, but seem to reduce its activity. Hence, new NLC were produced, loading sclareol and also a well-known anticancer drug, doxorubicin. NLC containing doxorubicin (0,05% w/v) and two different concentrations of sclareol (0,05 and 0,2% w/v) were produced. The doxorubicin and sclareol loaded NLC had appropriate size, narrow size distribution and could control the release of doxorubicin in PBS medium pH 7,4. Moreover, the sclareol was loaded more efficiently in the concentration of 0,05% w/v and there was seen a synergism between the molecules in the NLC that were loading 0,05% w/v of sclareol, in the cancer cell line MDA-MB-231. Therefore, the NLC are an option to deliver, simultaneously, sclareol and doxorubicin and, moreover, the loading of doxorubicin and sclareol leads to a synergism between the molecules, being a promising alternative for the treatment of cancer.

Key-words: Cancer, natural products, sclareol, nanostructured lipid carriers, doxorubicin, synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais características das células cancerosas.	18
Figura 2 -	Os caminhos para a metástase.	19
Figura 3 -	Distribuição mundial do câncer em 2012.	21
Figura 4 -	Estrutura química da doxorubicina.	26
Figura 5 -	Ligações entre a molécula de doxorubicina e o DNA e intercalação da doxorubicina na molécula de DNA com torção da estrutura desta.	27
Figura 6 -	Interação entre a doxorubicina com vários caminhos de apoptose no cardiomiócito.	31
Figura 7 -	Direcionamento de nanopartículas (NPs) para o tecido tumoral, evidenciando as diferenças entre o tecido saudável e o tecido tumoral.	33
Figura 8 -	Estrutura das NLS, CLN e NE.	37
Figura 9 -	Ilustração esquemática da estrutura das NLS <i>versus</i> a estrutura dos CLN.	38
Figura 10 -	Estrutura química do esclareol.	40
Figura 11 -	Esquema mostrando a preparação das NLS e dos CLN.	48
Figura 12 -	Metabolização da rezasurina em rezofurina.	50
Figura 13 -	Microscopia de Força Atômica de CLN e NLS carreando esclareol.	55
Figura 14 -	Microscopia de luz polarizada de NLS e CLN carreando esclareol.	56
Figura 15 -	Redução de viabilidade celular de células MDA-MB-231 após o tratamento com esclareol livre (ESC), CLN brancos e CLN contendo esclareol (CLN ESC).	57
Figura 16 -	Redução de viabilidade celular de células HCT-116 após o tratamento com esclareol livre (ESC), CLN brancos e CLN contendo esclareol (CLN ESC).	58
Figura 17 -	Distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com uma concentração de 60 μM de esclareol.	61
Figura 18 -	Distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com uma concentração de 120 μM de esclareol.	61
Figura 19 -	Distribuição do ciclo celular de células da linhagem HCT-116 após tratamento com uma concentração de 60 μM de esclareol.	62
Figura 20 -	Distribuição do ciclo celular de células da linhagem HCT-116 após tratamento com uma concentração de 120 μM de esclareol.	62
Figura 21 -	Formação do par iônico entre a doxorubicina e o ácido oleico.	70
Figura 22 -	Curva de linearidade para a doxorubicina por CLAE	77

Figura 23 -	Microscopia de luz polarizada dos CLN-DOX-ESC 0,05 e CLN-DOX-ESC 0,20.	79
Figura 24 -	Liberação da doxorubicina na sua forma livre (DOX.HCl) e em CLN em PBS pH 7,40.	80
Figura 25 -	Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol nas suas formas livres isolados ou em combinação na razão molar 1:1,9 em linhagem MDA-MB-231.	82
Figura 26 -	Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol nas suas formas livres isolados ou em combinação na razão molar 1:7,5 em linhagem MDA-MB-231.	83
Figura 27 -	Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol encapsulados em CLN (CLN-ESC 0,05; CLN-DOX; CLN-DOX-ESC 0,05) em linhagem MDA-MB-231	85
Figura 28 -	Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol encapsulados em CLN (CLN-ESC 0,20; CLN-DOX; CLN-DOX-ESC 0,20) em linhagem MDA-MB-231	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das NLS e CLN carreando esclareol	47
Tabela 2 -	Características físico-químicas de NLS e CLN carreando esclareol	53
Tabela 3 -	Valores de IC₅₀ para o esclareol livre e carreado em CLN para células MDA-MB-231 e HCT-116	58
Tabela 4 -	Composição dos CLN carreando doxorubicina e esclareol	71
Tabela 5 -	Valores de CI e efeito combinado correspondente	76
Tabela 6 -	Características físico-químicas de CLN carreando esclareol e doxorubicina	78
Tabela 7 -	IC₅₀ do esclareol e da doxorubicina nas suas formas livres e o CI entre elas nas duas razões avaliadas em linhagem MDA-MB-231	84
Tabela 8 -	IC₅₀ dos CLN carreando o esclareol e a doxorubicina e os respectivos CI nas duas razões avaliadas em linhagem MDA-MB-231	87
Tabela 9 -	Índice de Redução de Dose necessária para 50% de morte celular em células MDA-MB-231 para a doxorubicina quando encapsulada em CLN-DOX-ESC 0,05 e CLN-DOX-ESC 0,20.	88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Marca registrada
™	Marca comercial
°C	Graus Celsius
μ	Micro
ACS	American Cancer Society
AFM	Microscopia de força atômica
AMPK	Proteína Cinase Ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
CASP 3	Caspase 3
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CTB	Cell Titer Blue
CYTC	Citocromo C
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DP	Desvio padrão
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DOXOL	Doxorrubicinol
ENOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPR	Efeito de permeação e retenção aumentadas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESC	Esclareol
eV	Elétrons-volt
Fa	Fração afetada
FDA	Food and Drug Administration
GCS	Glucosilceramida Sintase
H33JA-AJ13	Linfoblastos T de leucemia humana
HBV	Hepatites B Virus
HCT-116	Carcinoma de cólon humano (ATCC®CCL-247™)
HCV	Hepatites C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPV	Human Papillomavirus
HSF-1	Família do choque térmico-1
HSP-25	Proteína do choque térmico-25
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IP	Índice de polidispersão
IRD	Índice de redução de dose
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano (ATCC®HTB-22™)
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama humano (ATCC®HTB-26™)
MeOH	Metanol
MOLT-3	Linfoblastos T de leucemia linfoblástica aguda humana (ATCC®CRL-1552™)

NE	Nanoemulsão
NLS	Nanopartículas lipídicas sólidas
NPs	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Probabilidade de significância
PBS	Tampão fosfato salina
PEG	Poli(etileno)glicol
r	Coefficiente de determinação
RES	Sistema retículo endotelial
SMANCS	Poli (estireno-co-anidrido maleico)-neocarzinostatina
TE	Teor de encapsulação
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Câncer.....	17
2.1.1	<u>Definição, bioquímica e fisiologia</u>	17
2.1.2	<u>Epidemiologia</u>	21
2.1.3	<u>Quimioterapia no câncer</u>	23
2.2	Doxorrubicina.....	25
2.2.1	<u>Farmacologia</u>	25
2.2.2	<u>Toxicologia</u>	29
2.3	Nanotecnologia e câncer.....	32
2.4	Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados.....	35
2.5	Esclareol.....	39
3	OBJETIVO GERAL.....	43

CAPÍTULO 1. ENCAPSULAÇÃO DO DITERPENO DO TIPO LABDANO “ESCLAREOL” EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE EM LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS

1	INTRODUÇÃO.....	45
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	Material.....	46
3.2	Métodos.....	47
3.2.1	<u>Preparo das formulações</u>	47
3.2.2	<u>Caracterização das formulações</u>	48
3.2.3	<u>Avaliação biológica dos CLN carreando esclareol</u>	49
3.2.4	<u>Análise estatística</u>	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Caracterização físico-química e comparação entre NLS e CLN carreando esclareol.....	52

4.2	Avaliação da atividade biológica dos CLN carreando esclareol.....	56
5	CONCLUSÕES.....	65

CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE CARREADORES LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS CARREANDO ESCLAREOL E DOXORRUBICINA

1	INTRODUÇÃO.....	68
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	69
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
3.1	Material.....	69
3.2	Métodos.....	69
3.2.1	<u>Preparo das formulações</u>	69
3.2.2	<u>Caracterização das formulações</u>	71
3.2.3	<u>Avaliação biológica dos CLN-Doxorrubicina-Esclareol</u>	74
3.2.4	<u>Análise estatística</u>	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1	Caracterização físico-química e comparação entre CLN carreando doxorrubicina e diferentes quantidades de esclareol.....	76
4.2	Avaliação da atividade biológica dos CLN carreando esclareol e doxorrubicina.....	81
5	CONCLUSÕES.....	89
	CONCLUSÕES GERAIS.....	90
	REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

Os diferentes tipos de cânceres figuram entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo com cerca de 8,2 milhões de mortes relacionadas, apenas em 2012. É esperado um aumento de 70% de casos de câncer nas próximas duas décadas, passando dos 14 milhões de casos anuais, relatados em 2012, para 22 milhões de casos, ao final desse período (OMS, 2015; STEWARD; WILD, 2014).

Apesar de importantes avanços no tratamento do câncer, como a descoberta de novos fármacos antineoplásicos, a abordagem pouco específica desses agentes provoca a destruição indiscriminada de células saudáveis, gerando expressivas reações adversas (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015).

Uma forma de realizar uma terapia mais específica é através dos nanocarreadores. Nanocarreadores são sistemas coloidais nanoestruturados capazes de transportar fármacos ou macromoléculas para um determinado tecido-alvo, fazendo com que estes se acumulem em maiores quantidades em tumores do que se estivessem na sua forma livre (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011; MISHRA; PATEL; TIWARI, 2010).

Dentre os diferentes tipos de nanocarreadores, encontram-se os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (CLN). Os CLN são nanocarreadores de fármacos relativamente novos e se apresentam como a segunda geração das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS). Elas apresentam em sua constituição lipídios que se mantêm sólidos a temperatura ambiente e corporal, conjuntamente com lipídios líquidos. Devido às numerosas vantagens que podem oferecer como a não necessidade do uso de solventes orgânicos na sua produção, fácil preparação e baixa toxicidade, os CLN são terapias emergentes no campo da pesquisa anticâncer (BELOQUI *et al.*, 2016; KANG *et al.*, 2010; WONG *et al.*, 2007).

Outra vantagem de uso da nanotecnologia é permitir a veiculação de moléculas que têm baixa solubilidade aquosa. Um exemplo é o esclareol. O esclareol é um diterpeno

que mostrou potencial para induzir a interrupção do ciclo celular e a apoptose em células de câncer de mama, de cólon e leucêmicas. Contudo, sua hidrofobicidade prejudica sua administração *in vivo* por vias como a endovenosa (DIMAS *et al.*, 1998; DIMAS *et al.*, 2006; HATZIANTONIOU *et al.*, 2006; MAHAIRA *et al.*, 2011). Assim, sua veiculação em nanocarreadores pode ser uma alternativa para permitir sua administração.

Ademais, a encapsulação do esclareol em combinação com um fármaco já utilizado na clínica oncológica pode potencializar os efeitos de ambas as moléculas. Uma opção que surge nesse ínterim é a doxorubicina, um fármaco correntemente usado na prática clínica para o tratamento do câncer. O sucesso terapêutico da doxorubicina é prejudicado pela sua toxicidade que leva a diversas reações adversas, em especial a uma elevada cardiotoxicidade (OCTAVIA *et al.*, 2012). Contudo, a encapsulação da doxorubicina em sistemas nanoestruturados, vide lipossomas (Doxil[®], Caelyx[®]), reduziu sua cardiotoxicidade (STYLIANOPULOS; JAIN, 2015).

Dessa maneira, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de CLN que permitissem a veiculação do esclareol. Em uma segunda etapa, foi buscada a inserção da doxorubicina nos nanocarreadores, com o objetivo de se desenvolver uma formulação que permitisse um ganho sinérgico da atividade anticâncer de ambas as moléculas e também permitisse diminuir a toxicidade da doxorubicina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer

2.1.1 Definição, bioquímica e fisiologia

Câncer é um termo genérico para um vasto grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do organismo. Ele pode ser definido como uma situação de multiplicação rápida de células anormais que crescem para além dos seus limites usuais. Essa multiplicação leva a diversas complicações para a saúde do indivíduo, incluindo sua morte (OMS, 2015).

Em suma, as células do câncer são células “senhoras de seus próprios destinos” que se reproduzem indefinidamente. As características comuns a essas células estão representadas na **Figura 1**. Elas podem ser sintetizadas como a capacidade de se manter uma proliferação constante e uma resistência aos mecanismos de controle de crescimento do organismo. Dois fatores comuns às células tumorais foram evidenciados mais recentemente: um metabolismo de energia reprogramado dessas células e uma capacidade de evasão da destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Tecidos normais conseguem controlar a produção e a liberação de sinais ligados ao crescimento e divisão celular, garantindo a homeostase do número celular e a manutenção da arquitetura e funções normais dos tecidos. As células cancerosas, ao desregular esses sinais, passam a controlar sua replicação e desenvolvimento. Células cancerosas podem adquirir a capacidade de manter a sinalização constante da proliferação celular por diversos modos como a produção de fatores de crescimento, envio de sinais para estimular células normais, dentre outros (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 1 - Principais características das células cancerosas.

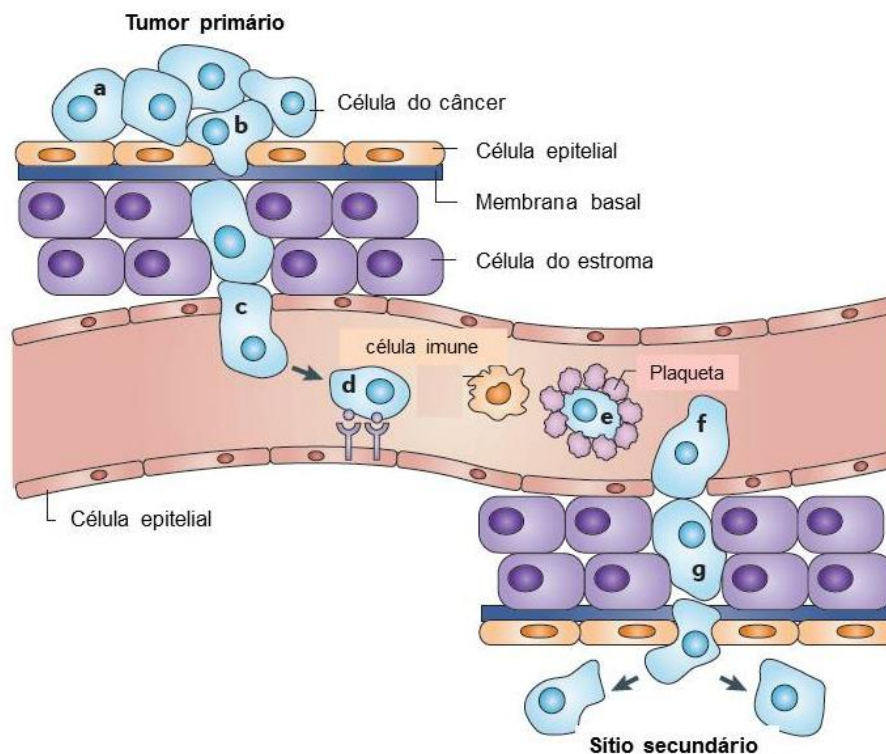


Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Essa proliferação contínua faz com que haja a metástase. Nela, células do tumor, localizadas inicialmente em um sítio primário se despreendem e invadem outros órgãos. Essa invasão de outros sítios e espalhamento dos tumores é a principal causa das mortes pelo câncer (SCHROEDER *et al.*, 2012) (**Figura 2**).

A origem do câncer é multifatorial. Alterações em dois grupos de genes levam a situações de câncer: os oncogenes (ligados ao crescimento celular) e os genes supressores de tumores (ligados à supressão do crescimento). Através de mutações, amplificações e translocações desses genes, a expressão deles passa a ser alterada, levando às características vistas anteriormente (**Figura 1**). Contudo, a taxa de mutação das células é muito baixa, sendo que muitas vezes, todo o conjunto de mutações não leva a um estado neoplásico para o indivíduo (HAHN; WEINBERG, 2002). Como ilustração, 78% dos cânceres desenvolvem-se em pessoas com mais de 55 anos de idade, sendo um retrato da acumulação de diversos eventos ao longo da vida do indivíduo (ACS, 2015).

Figura 2 - Os caminhos para a metástase: (a) redução da aderência às células vizinhas, (b) permeabilidade através do epitélio e estroma, (c) passagem pelas fenestrações para adentrar na corrente sanguínea, (d) aderência aos receptores de metástase no vaso ou (e) às plaquetas, (f) saída da corrente sanguínea e (g) chegada ao sítio secundário.



Adaptado de SCHROEDER *et al.*, 2012.

Contudo, raramente, apenas alterações genéticas levam às situações neoplásicas. Há influência preponderante de situações epigenéticas, dos hábitos de vida e do meio ambiente. Assim, a grande maioria dos cânceres é resultado da interação entre todos esses fatores apesar da existência de eventos extremamente significativos para a predisposição ao câncer. Um exemplo é a hereditariedade para alguns tipos (a probabilidade de ocorrência do câncer de mama é duas vezes maior em mulheres com histórico familiar do que naquelas sem esta característica) (ACS, 2015; CROCE, 2008).

Entre os principais fatores externos, encontram-se o uso de tabaco, organismos infecciosos e uma dieta inadequada. Entre os principais fatores intrínsecos ao

indivíduo, encontram-se mutações genéticas, condições hormonais e imunológicas (ACS, 2015; IARC, 2013).

Mesmo se sabendo de vários fatores que levam ao aparecimento do câncer ou o predispõem, há escassez de evidências sobre os eventos moleculares que ocorrem nos estágios iniciais do desenvolvimento do câncer assim como os fatores e sinalizações que desencadeiam essas mudanças (IARC, 2013).

Para citar alguns dos mais importantes eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento do câncer, pode-se citar a mutação no gene p53 e a expressão alterada da enzima telomerase.

Em relação ao gene p53, sua expressão está alterada na maioria, senão em todos os cânceres humanos. Em células normais, o gene p53 é responsável por parar temporariamente o crescimento celular em resposta aos danos moleculares e bioquímicos, até que esses danos sejam reparados. As células pré-neoplásicas diminuem a ação do p53, inativando a maquinaria apoptótica em diversos tipos de células cancerosas (HAHN; WEINBERG, 2002).

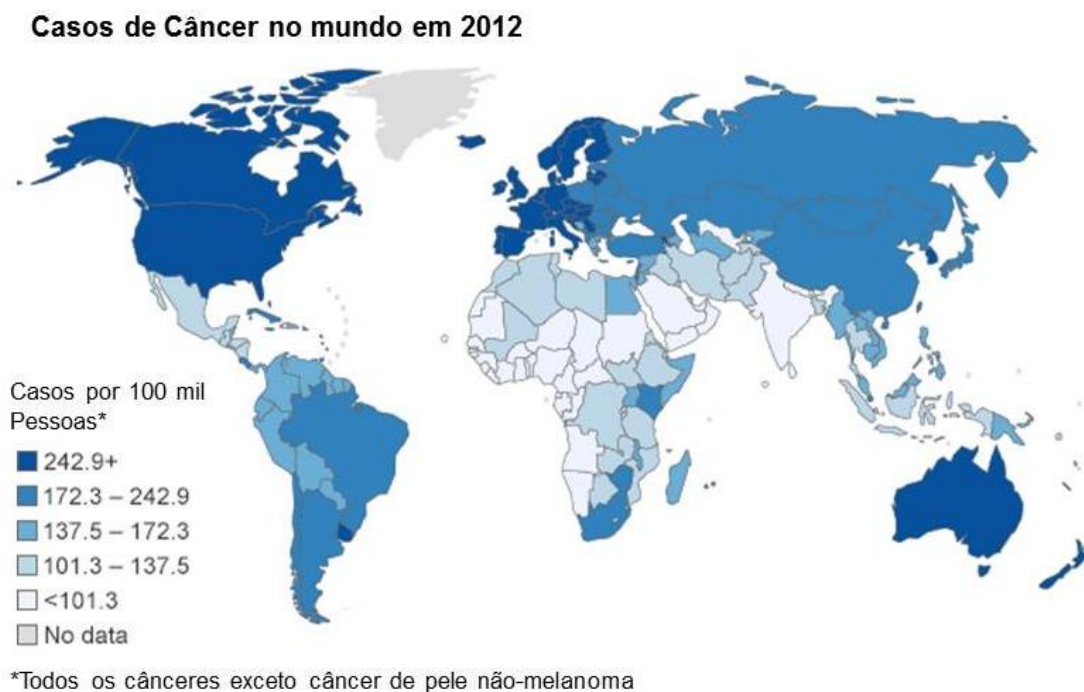
Destaca-se também a ação dos telômeros, sequências protetoras que constituem o final dos cromossomos. A enzima telomerase (inibida em células normais em situações de não replicação) é extremamente ativa em células cancerosas, levando a uma clivagem dos telômeros e a replicação contínua das células (HAHN; WEINBERG, 2002).

A crescente escalada da incidência do câncer, em todo o mundo, torna-o objeto de estudo, em diversas perspectivas, por centros de pesquisa pelo planeta. A compreensão mais extensa do que ocorre na geração e manutenção dos cânceres pode levar a possibilidades de melhor controle e tratamento dos diversos tipos de neoplasias.

2.1.2 Epidemiologia

Os diversos tipos de cânceres são responsáveis por altos índices de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Antes identificados como patologias de países mais desenvolvidos, hoje afetam todas as regiões do mundo, sendo, em muitas, a principal *causa mortis*, conjuntamente com as patologias cardiovasculares. Em 2012, houve 14 milhões de novos casos de câncer, com 8,2 milhões de mortes (**Figura 3**). Estima-se que em 20 anos, esses números aumentem por volta de 70% (OMS, 2015).

Figura 3 - Distribuição mundial do câncer em 2012.



Adaptado de OMS, 2015.

Dentre os diversos cânceres, os mais diagnosticados são o de pulmão (13% do total de casos), mama (12% do total de casos) e intestino (10% do total de casos). Essa distribuição difere entre homens e mulheres. Para os homens, os mais diagnosticados são, nessa ordem, os cânceres de pulmão, próstata e intestino e para as mulheres, os cânceres de mama, intestino e pulmão. A maior causa de morte pelos cânceres é o

câncer de pulmão (20%), fígado (10%) e estômago (9%) (KHAZEI; SALEHINIYA; MOHAMMADIAN-HAFSHE-JANI, 2015).

Esses dados são extremamente úteis para que se tenha ideia da evitabilidade dos diversos cânceres. O câncer mais diagnosticado e o que mais causa mais mortes— o de pulmão— está ligado em 80% dos casos ao tabagismo. O câncer mais comum em mulheres— o de mama— e o segundo mais comum em homens— o de próstata— podem ser diagnosticados em estágios iniciais através de acompanhamento médico e, se tratados nesses estágios, têm altas chances de cura. O câncer de intestino, o terceiro mais diagnosticado, e o câncer de estômago, o terceiro que mais causa mortes, podem ter sua incidência altamente reduzida por uma alimentação mais saudável. Estima-se, assim, que metade dos casos de câncer pode ser evitada por mudanças de hábitos de vida (ARMAROLI *et al.*, 2015; SCHÜZ *et al.*, 2015).

Ademais, estima-se que a grande maioria dos cânceres causados por álcool e tabaco podem ser prevenidos totalmente. A OMS calcula que mais de um terço dos cânceres nos países desenvolvidos estão relacionados a fatores como sobrepeso ou obesidade, falta de atividades físicas e má nutrição. Cânceres relacionados às infecções podem ser evitados prevenindo o contágio por vírus como o HBV, HCV, HIV e HPV e pelo *Helicobacter Pylori*. Por fim, mais de três milhões de cânceres do tipo melanoma, diagnosticados anualmente, podem ser evitados protegendo-se a pele da exposição solar (ACS, 2015).

Dessa maneira, a prevenção do câncer pode ser obtida com um conjunto de ações individuais e coletivas. No âmbito individual, recomenda-se um peso corporal adequado; o consumo de uma dieta rica em frutas, vegetais, grãos e legumes; o menor consumo possível de álcool e carne vermelha e não se consumir refrigerantes e carne processada. Ademais, uma vida saudável e atividades físicas diárias contribuem enormemente para a redução do risco de se desenvolver um câncer. Incentivo a uma vida mais saudável passa também por iniciativas públicas, através de campanhas

educativas relativas à alimentação, alcoolismo, tabagismo e sexo seguro, além de garantir a vacinação da população (ARMAROLI *et al.*, 2015; NORAT *et al.*, 2015).

Avaliando o caso brasileiro, a expectativa de vida cresce ano após ano, levando a participação cada vez maior de idosos (grupo mais acometido pelo câncer) na estrutura demográfica do país. Além disso, houve uma rápida industrialização e urbanização em todo o Brasil, trazendo com ela, hábitos não saudáveis de vida, advindos de um padrão alimentar globalizado e de hábitos ocupacionais mais repetitivos (ACS, 2015; BARBOSA *et al.*, 2015).

Atualmente, o câncer é a segunda causa de mortes no Brasil, atrás apenas das doenças cardiovasculares. Assim, as doenças crônico-degenerativas encontram-se no centro das preocupações da saúde pública brasileira, frente às doenças infecto-parasitárias, principal preocupação de outrora. Para o biênio 2016/2017, são esperados 600 mil novos casos de câncer. A distribuição da incidência no Brasil é semelhante àquela observada em âmbito mundial, contudo apresenta algumas diferenças. Para os homens, os cânceres mais diagnosticados são, nessa ordem, o de próstata, o de pulmão e o de intestino e, para as mulheres, o de mama, o de intestino e o cervical (BARBOSA *et al.*, 2015; INCA, 2016).

A estimativa da evolução da mortalidade do câncer no Brasil é díspare nas diversas regiões do país. Estima-se uma estabilização das mortes por câncer nas regiões Sul e Sudeste, enquanto espera-se um aumento das mortes nas regiões Norte e Nordeste. Isso se deve em grande parte, as piores condições de diagnóstico e tratamento presentes nas regiões menos desenvolvidas (BARBOSA *et al.*, 2015).

2.1.3 Quimioterapia no câncer

As cirurgias de retiradas de tumor são as formas mais efetivas de tratamento de tumores primários localizados e, até os anos 1950, essas modalidades eram praticamente a única forma de terapia contra o câncer. As cirurgias, contudo, não

conseguem tratar cânceres metastáticos. Para tratá-los, são necessários tratamentos que atinjam praticamente todos os órgãos do corpo. Assim, fármacos, terapias imunomediadas e a radioterapia se tornaram o foco das pesquisas destinadas ao câncer (CHABNER; ROBERTS, 2005; URRUTICOECHEA *et al.*, 2010).

A quimioterapia constitui-se como a principal terapia de combate aos cânceres já difundidos pelo organismo. Os quimioterápicos agem levando à parada do ciclo celular das células em algum momento, causando assim a morte das células tumorais. Um dos principais problemas da quimioterapia é que os alvos atingidos para causar a morte celular são comuns tanto às células do câncer quanto às saudáveis. Assim, a morte dessas células saudáveis gera graves efeitos colaterais, fator comum a todos os tipos de quimioterápicos (JONES, 2015; SILVA, 2010).

A quimioterapia teve início na década de 1940, com a descoberta de que o gás mostarda, usado nos combates da 2ª Guerra Mundial, tinha ação contra linfomas. Desde então, vários fármacos foram obtidos através de extração de organismos naturais ou síntese química. Esses fármacos mostraram-se muito úteis para aumentar a sobrevida dos pacientes. Um exemplo é a quimioterapia para os casos de câncer colorretal, onde a sobrevida era de apenas seis meses na década de 90 e hoje, encontra-se em três anos, através de um esquema combinado de fármacos. Contudo, esse aumento de sobrevida não significa sempre uma diminuição da mortalidade, sendo ainda necessários o descobrimento e o desenvolvimento de novos fármacos e terapias para o câncer (JONES, 2015; MAEDA, 2012).

Existem diversas classes de quimioterápicos, com diversos representantes cada. Em suma, essas classes são: agentes alquilantes, antimetabólicos, antibióticos, inibidores das topoisomerasas, inibidores dos microtúbulos, derivados da platina e inibidores de Tirosina Cinase (LIND, 2015; SILVA, 2010).

Esses agentes atuam levando à interrupção ou conturbação de importantes etapas do ciclo celular. Isso se dá por mecanismos como, intercalação de moléculas de DNA,

inibição da despolimerização dos microtúbulos, entre outros. Em suma, os alvos dos fármacos antineoplásicos são eventos vitais para a sobrevivência e replicação das células como a síntese de proteínas, DNA e RNA. A inibição de importantes enzimas, como as topoisomerasas, é também um desses mecanismos, sendo, a doxorubicina, um dos fármacos mais conhecidos que atua dessa maneira (LIND, 2015; SILVA, 2010).

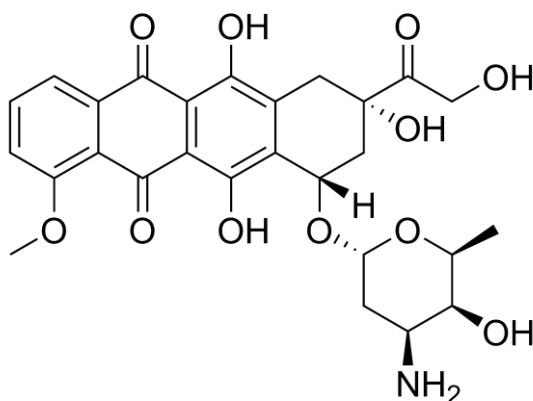
2.2 Doxorubicina

2.2.1 Farmacologia

A doxorubicina é um fármaco quimioterápico, considerado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como um dos mais potentes a disposição, sendo largamente utilizado na clínica. Ela é comercializada na forma de cloridrato e administrada pela via endovenosa. A doxorubicina pertence à classe das antraciclinas, sendo uma antraciclina do tipo I não seletiva (**Figura 4**). Como a daunomicina— a primeira antraciclina descrita— a doxorubicina foi isolada da *Streptomyces peucetius*, uma bactéria do solo. A doxorubicina tem mostrado grande eficácia na morte de células de tumores hematológicos e sólidos, sendo usada para tratamento de diversos cânceres: mama, próstata, útero, de dutos biliares, ovário, esôfago, estômago, fígado, osteossarcomas, sarcoma de Kaposi, leucemia mieloblástica aguda, leucemia linfoblástica, tumor de Wilms, neuroblastomas, sarcomas, pulmão, tireóide e bexiga (CARVALHO *et al.*, 2009; DATTA *et al.*, 2015; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Vários modelos foram propostos para explicar sua ação citotóxica: ação na Topoisomerase II, formação de adutos de DNA, estresse oxidativo e produção exacerbada de ceramidas (HANDE, 2008; TEWEY *et al.*, 1984; THORN *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Figura 4 - Estrutura química da doxorubicina



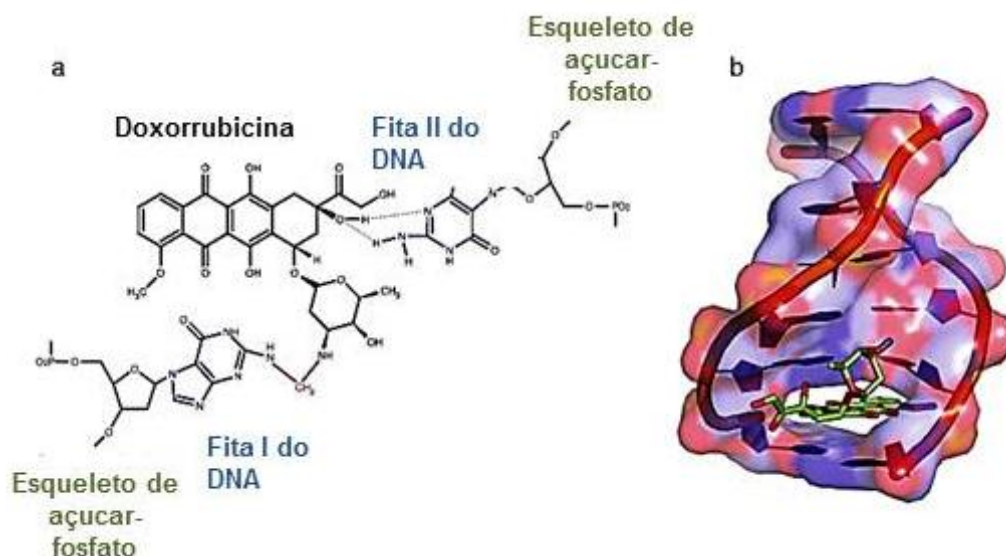
A doxorubicina entra nas células através de difusão passiva e, no citoplasma, liga-se a subunidade 20S do proteossoma. Esse complexo migra para o núcleo e, pela maior afinidade da doxorubicina pelo DNA, ela se mantém lá. A concentração de doxorubicina mantém-se, então, cinquenta vezes maior no núcleo do que no citoplasma (CARVALHO *et al.*, 2009; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012). No núcleo, a doxorubicina inibirá a ação da Topoisomerase II, mecanismo aceito como o mais relevante de sua ação citotóxica.

Esse mecanismo se dá da seguinte forma: o DNA está naturalmente na forma tensionada, sendo necessário que haja um relaxamento na sua estrutura para que ele se duplique. Esse relaxamento se dá por cortes na dupla fita de DNA e posterior junção desses fragmentos em uma posição onde o DNA permaneça menos tensionado. Esses cortes e junções são mediados pela Topoisomerase II. A doxorubicina se liga ao DNA e forma um complexo estável com ele e a Topoisomerase II (Doxorubicina-DNA-Topoisomerase II). Com a formação desse complexo, as junções da dupla fita não ocorrem, levando a parada do ciclo celular (CHAMPOUX, 2001; HANDE, 2008).

A doxorubicina liga-se à molécula de DNA (**Figura 5**) da seguinte forma: o formaldeído, originado em reações mediadas por radicais livres, leva à formação de ligações covalentes entre a porção glicosídica da doxorubicina e a base nitrogenada guanina na Fita I do DNA. Além disso, a molécula de doxorubicina também forma ligações de

hidrogênio com uma guanina presente na Fita II do DNA. Fora a inibição da Topoisomerase II, a simples formação de complexos DNA-doxorrubicina leva à torções no DNA que podem levar ao tensionamento do nucleossoma. Esse tensionamento leva a morte celular, sendo que já foi mostrado que isso acontece mesmo em doses baixas da doxorrubicina (YANG *et al.*, 2014).

Figura 5 - (a) Ligações entre a molécula de doxorrubicina e o DNA e (b) intercalação da doxorrubicina na molécula de DNA, com torção da estrutura desta.



Adaptado de YANG *et al.*, 2014.

A morte celular pela doxorrubicina também pode ser mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem se formar de algumas maneiras: (1) a doxorrubicina pode ser oxidada por oxirredutases como a NADH-desidrogenase, NADPH-citocromo P450 redutase, xantina oxidase e a óxido nítrico sintase, gerando semiquinonas. Essas semiquinonas reagem com o oxigênio, formando EROs, como os radicais superóxido e peróxido; (2) a doxorrubicina também pode quelar o ferro intracelular, levando a formação de radicais hidroxil por Reação de Fenton; (3) pode-se também formar radicais superóxido pela ação da flavoproteína redutase, quando há oxigênio molecular presente. As EROs produzidas geram danos ao DNA, como a separação das fitas e a

sua alquilação, e inibem a produção de macromoléculas, levando a morte celular (CARVALHO *et al.*, 2009; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Sob a ação da doxorubicina, as células experimentam uma parada do ciclo celular nas posições G1 e G2. É noticiado aumento de marcadores de apoptose celular durante o processo. Foi visto que em células MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), a razão entre as proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica) diminui em virtude do tratamento com a doxorubicina (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Outro marcador de apoptose que se encontra em níveis alterados nas células pelo tratamento com a doxorubicina é a proteína pró-apoptótica p53. As EROs geradas pela doxorubicina ativam a AMPK (proteína cinase ativada por AMP). A AMPK fosforila a serina 15 da p53, ativando-a, e levando à interrupção do ciclo celular. A proteína p53, então, ativará a cascata das caspases (proteases fundamentais no processo de morte celular), levando a célula a apoptose (CARVALHO *et al.*, 2009; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Apesar do grande potencial terapêutico da doxorubicina, a resistência celular que emerge com seu tratamento é um grande limitante de seu uso. A resistência à doxorubicina se dá como resultado da superexpressão de proteínas de efluxo, como a glicoproteína P (HANDE, 2008). Ademais, há outros mecanismos que podem levar a essa resistência.

A doxorubicina aumenta a expressão de ceramidas, lipídios presentes na membrana celular que apresentam função estrutural e de sinalização celular. Essa indução da produção de ceramidas pode ser um dos mecanismos que induzem apoptose às células, já que as ceramidas apresentam papel na morte celular. Esse aumento da quantidade de ceramidas leva, contudo, a um aumento no nível da glucosilceramida sintase (GCS). A GCS glicosila as ceramidas, transformando-as em glicosilceramidas. É mostrado que essas glicosilceramidas estão envolvidas no processo de resistência a doxorubicina, sendo encontrado um nível aumentado destas em células tumorais

resistentes. Também foi mostrado que a doxorubicina não aumenta o nível de ceramidas em células MCF-7/ADR (câncer de mama humano resistentes à doxorubicina). Contudo, quando a expressão da GCS era suprimida, as células voltavam a ser sensíveis a doxorubicina (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012; YANG *et al.*, 2014).

2.2.2 Toxicidade

Outro grave problema relacionado ao uso da doxorubicina é a sua toxicidade. O fármaco pode levar à mielossupressão, náuseas, vômitos, estomatite, alopecia, calvice, distúrbios neurológicos (alucinações, tonturas e vertigens), aplasia da medula óssea e mucosite, além de graves reações caso ocorra extravasamento durante sua administração (CARVALHO *et al.*, 2009; OCTAVIA *et al.*, 2012).

A mais grave toxicidade associada ao fármaco é sua cardiotoxicidade. Os efeitos agudos começam logo após sua administração e incluem arritmias, hipotensão e alterações eletrocardiográficas, podendo ocorrer pericardite. Esses efeitos agudos ocorrem em por volta de 11% dos pacientes e podem ser revertidos, desaparecendo geralmente após o fim do tratamento (CARVALHO *et al.*, 2009; OCTAVIA *et al.*, 2012).

Em relação aos efeitos crônicos, eles ocorrem em por volta de 1,7% dos pacientes tratados com doxorubicina, promovendo uma taxa de mortalidade de 50% nestes pacientes. Eles ocorrem por acumulação de doses sucessivas de doxorubicina (em especial quando atingem valores acumulados de 500 mg/m²) e levam à insuficiência cardíaca congestiva e cardiomiopatias que podem surgir até anos após o fim do tratamento. O mecanismo geralmente reconhecido para explicar a cardiotoxicidade da doxorubicina é através da geração de radicais livres, em especial nas mitocôndrias (CARVALHO *et al.*, 2009; OCTAVIA *et al.*, 2012).

O tecido cardíaco apresenta uma maior concentração de mitocôndrias quando comparado com outros tecidos. A doxorubicina tem grande afinidade com a

cardiolipina— fosfolípídeo presente na membrana mitocondrial— penetrando nas mitocôndrias por difusão. Dentro das mitocôndrias, a doxorubicina leva a formação de EROs, além de formar adutos com o DNA mitocondrial. As EROs formadas levam à abertura do poro de transição de permeabilidade, uma proteína de canal. Essa abertura aumenta os níveis de Ca^{2+} na mitocôndria, aumentando a liberação de citocromo c, diminuindo a razão Bcl-2/Bax e, assim, levando a apoptose às células do coração. A geração de radicais livres também se dá através da oxidação de íons ferro, ligação à enzima óxido nítrico sintase endotelial e da formação dos metabólitos doxorubicina sesquinona e doxorubicinol (**Figura 6**) (OCTAVIA *et al.*, 2012).

O coração é mais susceptível a ação desses radicais livres pela menor presença de enzimas redutoras no órgão, como a catalase e a glutatona. Deve-se, contudo, ater-se que a toxicidade no coração mediada pela doxorubicina provém de um mecanismo multifatorial e ainda não totalmente elucidado (CARVALHO *et al.*, 2009).

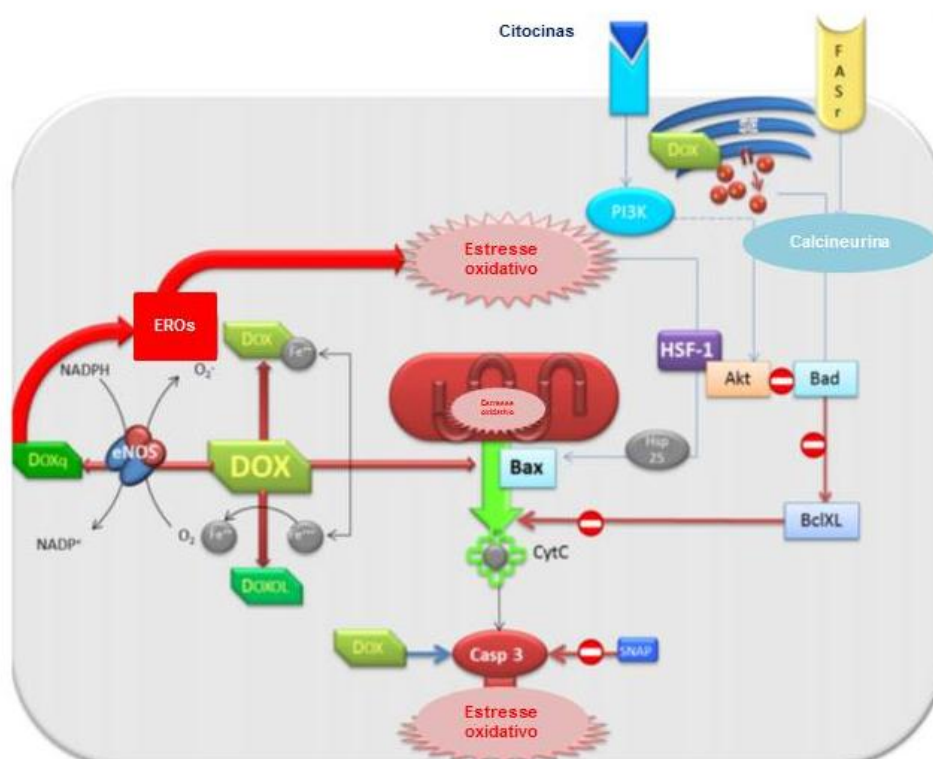
Contudo, os efeitos tóxicos da doxorubicina não se resumem apenas ao coração. Eles podem ser evidenciados também no sistema nervoso, no fígado, nos rins, dentre outros órgãos.

No que se refere ao sistema nervoso, a doxorubicina não consegue atravessar a barreira hematoencefálica. No entanto, ela causa toxicidade indireta no cérebro. Isso se dá pela produção de EROs mediada pela doxorubicina. Essas EROs levam ao aumento da permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a liberação de citocromo c, da mesma maneira que se observa no coração, gerando apoptose de células neuronais. Desordens neurológicas e problemas cognitivos podem surgir como consequência dessa apoptose. A maioria desses problemas, contudo, desaparece um ano após a interrupção do tratamento (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Ademais, cerca de 40% dos pacientes em tratamento com doxorubicina apresentam problemas hepáticos. Isso se dá porque grande parte do fármaco é metabolizada no fígado. As EROs geradas pela doxorubicina produzem danos ao tecido hepático,

levando a sintomas como fraqueza e fadiga muscular e renal. As EROs também provocam danos nos rins, levando a lesões glomerulares, inflamação, dilatação tubular e permeabilidade capilar alterada. Isso gera nefropatia e proteinúria, sendo agravadas pelo fato de que a capacidade de regeneração dos rins é baixa (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012).

Figura 6 - Interação entre a doxorubicina com vários caminhos de apoptose no cardiomiócito. Do lado esquerdo da figura, mostra-se como a doxorubicina gera EROs. No centro, mostra-se a entrada da doxorubicina dentro das mitocôndrias. Já no lado direito, mostra-se mecanismos de inibição da apoptose gerada pela doxorubicina, mediada pela família de proteínas de choque térmico e pela calcineurina. DOX: Doxorubicina; Doxol: Doxorubicinol; eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial; Casp 3: Caspase 3; CytC: Citocromo C; HSF-1: Família do choque térmico-1; Hsp 25: proteína do choque térmico 25.



Adaptado de OCTAVIA *et al.*, 2012.

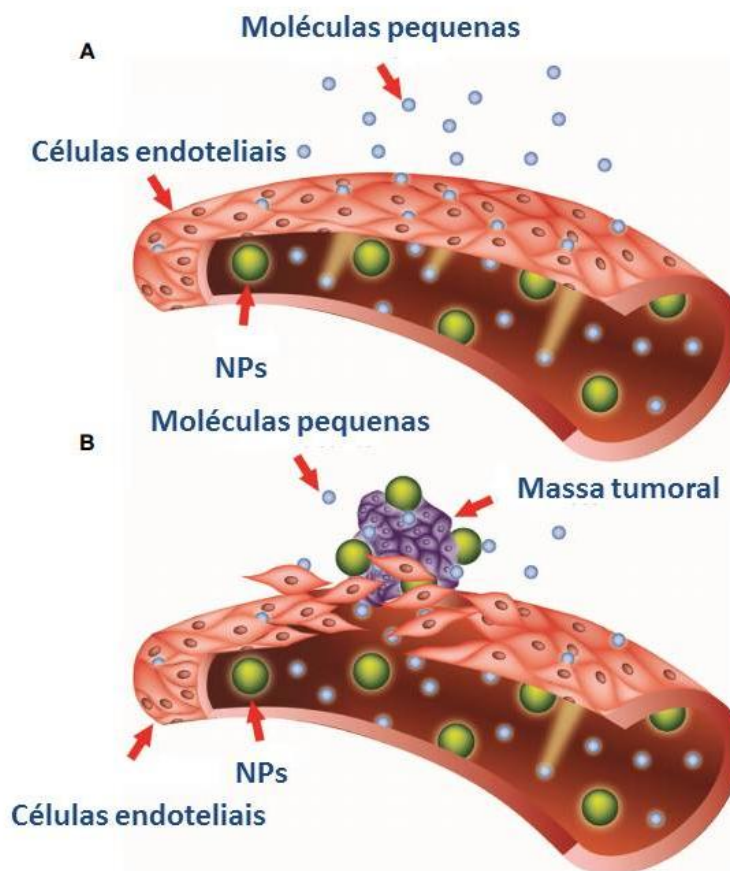
2.3 Nanotecnologia e câncer

Visando uma forma de fazer a veiculação de fármacos antitumorais de uma maneira mais segura, buscou-se terapias direcionadas e específicas, que atingissem as células cancerosas, mas que tivessem pouco impacto ou nenhum naquelas saudáveis. Esse conceito de uma terapia específica relembra a ideia de Paul Ehrlich de “balas mágicas”, na qual o medicamento seria naturalmente direcionado para seu sítio de ação específico, não interagindo com outras partes do organismo (TAURIN; NEHOFF; GREISH, 2012).

Uma possibilidade de ação específica para a terapia anticâncer surgiu com a descoberta do efeito EPR (efeito de permeação e retenção aumentadas) nos tecidos tumorais. Num estudo de 1908, foi visto em tecidos tumorais humanos e de outros animais, uma rede difusa de vasos sanguíneos permeáveis com fenestrações, semelhante ao que é visto em casos de processos inflamatórios (GOLDMANN, 1908). Essa organização difusa e permeável permitiria uma acumulação preferencial de macromoléculas na região tumoral. Tal conceito foi comprovado em 1986, com a injeção do corante Azul de Evans em roedores. O corante tem afinidade pela albumina e naturalmente se ligaria a ela assim que presente na corrente sanguínea. Ao analisar o tecido tumoral dos animais, percebeu-se ali, uma presença do corante bastante superior àquela dos outros tecidos, devido à acumulação da proteína albumina— uma macromolécula (MATSUMURA; MAEDA, 1986).

As fenestrações nas paredes da vasculatura tumoral explicam a entrada das macromoléculas. Essas fenestrações têm tamanho variado e diferem dependendo do tipo do tumor e sua localização. O tamanho destas situa-se entre 20 e 2000 nanômetros, geralmente. Esse é o componente da permeação aumentada do efeito EPR (**Figura 7**). No que concerne ao componente de retenção aumentada do efeito EPR, ele se dá pela baixa presença de capilares linfáticos na região, o que não promove uma retirada dessas macromoléculas do interstício tumoral de forma eficiente (BERTRAND *et al.*, 2014).

Figura 7 - Direcionamento de nanopartículas (NPs) para o tecido tumoral, evidenciando as diferenças entre (A) o tecido saudável e (B) o tecido tumoral.



Adaptado de BOZZUTO; MOLINARI, 2015.

Dessa maneira, a nanotecnologia passou a ser uma possibilidade de uma terapia mais direcionada para o tratamento de tumores sólidos. Aprisionando-se um fármaco ou outra molécula bioativa dentro de uma estrutura nanométrica, possibilita-se uma maior acumulação no sítio tumoral e aumenta-se a meia-vida plasmática frente a da molécula livre (FANG; NAKAMURA; MAEDA, 2011).

Deve-se notar, contudo, que nanocarreadores muito pequenos (abaixo de sete nanômetros) podem ser eliminados pelos rins, não oferecendo vantagens de acumulação na região tumoral. Ademais, há fenestrações também na vasculatura

hepática com tamanho por volta de 50 nanômetros. Além disso, partículas com tamanho maior que 200 nanômetros são rapidamente retiradas da circulação sanguínea pelo sistema retículo endotelial (RES), não alcançando quantidades suficientes no tecido tumoral (TAURIN; NEHOFF; GREISH, 2012). Assim, de uma maneira geral, acredita-se que o tamanho ideal de um nanocarreador deve se situar entre 50 e 200 nanômetros, apesar de que não há um consenso sobre a questão.

Buscando se valer da nanotecnologia para um tratamento mais direcionado do câncer, diversos grupos começaram a desenvolver formulações que trouxessem o benefício do efeito EPR para a clínica oncológica.

Em 1993, é aprovado o primeiro medicamento para o câncer baseado na nanotecnologia, por um grande órgão regulador. O SMANCS (poli (estireno-co-anidrido maleico)-neocarzinostatina) é um conjugado de uma proteína que apresenta ação antitumoral com um polímero. Esse conjugado mostrou promover maior circulação e acumulação no tecido tumoral que a proteína livre, tendo sido aprovado para tratamento de carcinoma hepatocelular pelo Ministério da Saúde do Japão (MAEDA, 2012).

Em 1995, nos Estados Unidos, uma formulação lipossomal de doxorubicina é aprovada para tratamento de Sarcoma de Kaposi associado à infecção por HIV e câncer de ovário em estado avançado, o Doxil[®]. A nanoencapsulação da doxorubicina em lipossomas diminuiu seus efeitos adversos, aumentou seu tempo de circulação e a entrega do fármaco no tumor foi melhorada (BARENHOLZ, 2012; SEYNHAEVE *et al.*, 2013).

Há que se destacar, contudo, dificuldades encontradas para os produtos lipossomais como dificuldades de escalonamento da produção e preços elevados, o que gera dificuldades para sua maior inserção no mercado. Sendo assim, carreadores nanoparticulados que apresentem maior capacidade de produção em grande escala e preços mais razoáveis podem emergir como alternativa aos lipossomas (MENHERT;

MÄDER; 2012; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; WISSING; KAISER; MÜLLER, 2004). Uma dessas alternativas são as NLS e os CLN.

2.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

As NLS e os CLN são sistemas coloidais surgidos como novas gerações das nanoemulsões (NE) óleo em água (O/A).

As NE O/A constituem um sistema de dimensões submicrométricas que foram inseridas com sucesso na nutrição parenteral na década de 1950. Elas são constituídas da mistura de lipídios líquidos e surfactantes em um meio aquoso. São termodinamicamente instáveis e possibilitam a veiculação de moléculas hidrofóbicas, em seu interior, que dificilmente seriam solubilizadas em um meio aquoso para veiculação endovenosa (BENITA; LEVY, 1993).

A possibilidade de controlar a liberação do fármaco pelas NE é limitada pelo estado líquido do carreador. Assim, o uso de lipídios sólidos, ao invés dos líquidos, foi alencado como uma ideia atrativa para se conseguir uma liberação controlada, já que a mobilidade do fármaco na matriz lipídica sólida deve ser reduzida. A partir dessa ideia, surgem as NLS (MEHNERT; MÄDER, 2012).

As NLS, da mesma forma que as NE, são compostas de lipídios e surfactantes em um meio aquoso, com a diferença que os lipídios se encontram em estado sólido e não mais em estado líquido. Esses lipídios, assim, mantêm-se sólidos a temperatura ambiente e corporal. As NLS podem ser preparadas usando-se uma enorme variedade de lipídios, tais como mono, di e triglicerídeos, misturas de ceras e estabilizados com surfactantes iônicos e não iônicos. Devido às numerosas vantagens que podem oferecer como proteção de fármacos instáveis da degradação, fácil preparação e baixa toxicidade, as NLS atraíram grande interesse no campo da pesquisa anticâncer, com a encapsulação de antineoplásicos (KANG *et al.*, 2010; MÜLLER; MÄDER; GOHLA, 2000; WONG *et al.*, 2007).

No entanto, há limitações das NLS que comprometem a sua utilização. Elas se devem ao estado sólido dos lipídios, o que gera uma alta organização da matriz lipídica. Essa alta organização leva a poucos espaços para a encapsulação de fármacos e favorece a uma rápida expulsão destes da matriz lipídica (BELOQUI *et al.*, 2016; FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013).

Além disso, moléculas no estado sólido podem se organizar de diversas formas no espaço, constituindo distintos polimorfos. Os lipídios das NLS, em grande parte cristalinos, podem sofrer mudanças polimórficas com o tempo. Geralmente, essas mudanças polimórficas geram uma maior organização da matriz lipídica, contribuindo ainda mais para a expulsão do fármaco da nanopartícula (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012).

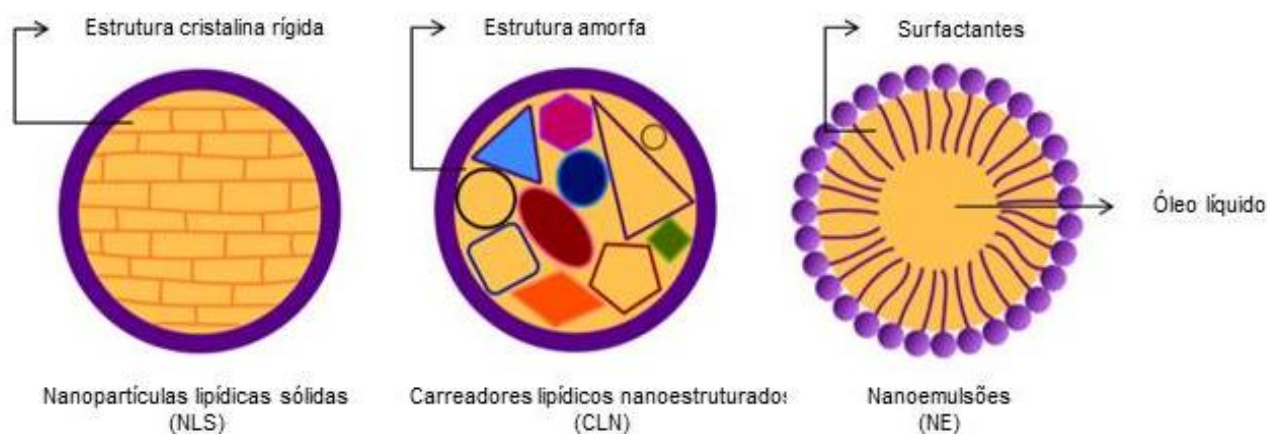
Dessa forma, uma alternativa interessante seria uma desestruturação (amorfização) da matriz lipídica, visando uma melhor acomodação e estabilidade da encapsulação dos fármacos. Assim, surge o conceito dos CLN.

Os CLN são sistemas coloidais ainda mais recentes, surgidos na virada do milênio e constituem uma segunda geração a partir das NLS. Esses sistemas se constituem de uma mistura de lipídios sólidos, lipídios líquidos e surfactantes. Assim, é buscado aproveitar as vantagens da incorporação de um fármaco em uma matriz lipídica sólida— como proteção contra o ambiente externo, controle da liberação, evitação de solventes orgânicos— com as vantagens da incorporação de um fármaco em uma matriz lipídica líquida— como alta capacidade de incorporação e maior estabilidade de encapsulação (BELOQUI *et al.*, 2016; FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013).

Dessa maneira, a incorporação de um lipídio líquido à composição do nanocarreador diminui a organização da matriz lipídica, permitindo que os fármacos inseridos se acomodem melhor (aumento a estabilidade) e em maior quantidade (aumentando o potencial de encapsulação) (BELOQUI *et al.*, 2016; FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013).

A **Figura 8** ilustra como são dispostos os CLN e suas diferenças para as NLS e as NE. Na NE a matriz oleosa é líquida, o que facilita acomodação do fármaco homogeneamente em sua estrutura e em maiores quantidades (PAN; TIKEKAR; NITIN, 2016). Já as NLS apresentam uma matriz rígida com poucos espaços para a acomodação do fármaco. Esse problema é resolvido com a adição de lipídios líquidos em sua estrutura, gerando os CLN. A mistura de lipídios sólidos e líquidos gera uma matriz sólida— só que amorfa— o que permite que uma maior quantidade de fármaco seja acomodada, sem mais os impedimentos gerados pela estrutura cristalina das NLS (FANG *et al.*, 2013).

Figura 8 - Estrutura das NLS, CLN e NE.

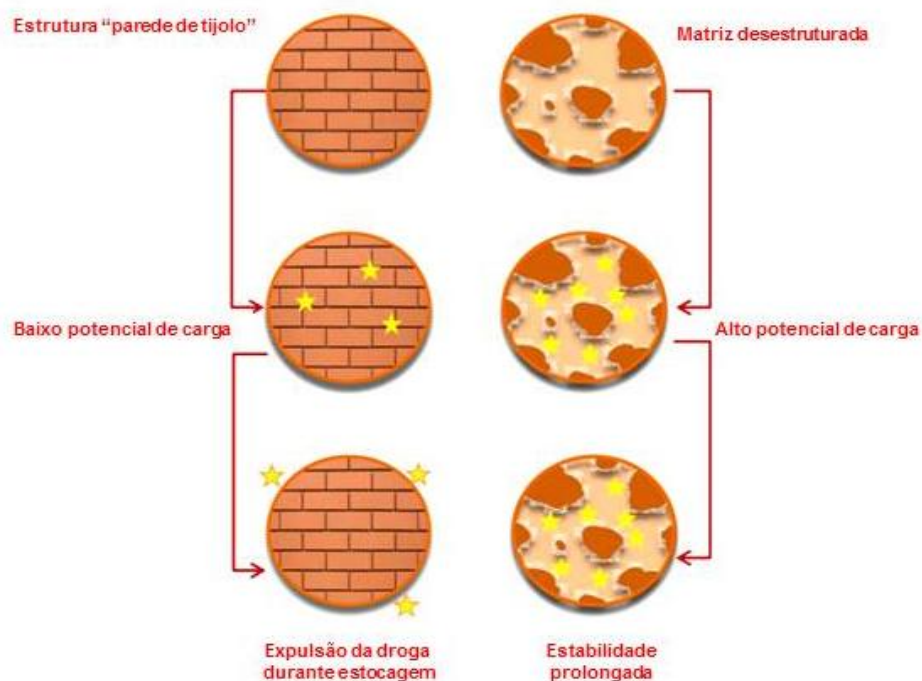


Adaptado de FANG *et al.*, 2013.

A **Figura 9** mostra com mais detalhes as vantagens dos CLN sobre as NLS. As NLS com sua organização cristalina comportam o fármaco entre os cristais do lipídio sólido (representados como blocos de tijolo). Há pouco espaço entre os cristais (prejudicando a encapsulação de maiores quantidades de fármaco) e as mudanças polimórficas— gerando diferentes conformações espaciais entre os cristais— modificam o espaço possível para a acomodação do fármaco, expulsando-o durante a estocagem. No caso dos CLN, a matriz é amorfa, assim, as moléculas dos lipídios que a constituem não se organizam de formato organizado, existindo mais espaços para que o fármaco se

acomode. Da mesma maneira, a amorfização evita as mudanças polimórficas que modificariam o espaço presente na matriz lipídica, formando sistemas mais estáveis (BELOQUI *et al.*, 2016).

Figura 9 - Ilustração esquemática da estrutura das NLS *versus* a estrutura dos CLN, onde as vantagens dos CLN estão destacadas.



Adaptado de BELOQUI *et al.*, 2016.

Diversos trabalhos vêm mostrando a capacidade dos CLN de encapsulação de fármacos e moléculas com potencial anticâncer. A encapsulação de antineoplásicos em CLN aumentou sua atividade citotóxica *in vitro* (BONDI *et al.*, 2014; SHAO *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2013), a atividade antitumoral *in vivo* (MUSSI *et al.*, 2015; SHAO *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2013), diminuiu a toxicidade *in vivo* (SHI *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2013) e aumentou o tempo de meia-vida (MUSSI *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2013) frente às substâncias na forma livre.

Alguns desses trabalhos dedicaram-se à encapsulação da doxorubicina nos CLN, assim como nas NLS. A doxorubicina é comercializada na forma de cloridrato, sendo solúvel em água e pouco solúvel nos lipídios que geralmente constituem as NLS e os CLN. Assim, sua encapsulação nesses sistemas coloidais fica comprometida. Uma estratégia usada por vários grupos de pesquisa é a conjugação da doxorubicina com uma molécula aniônica, formando um par iônico (CHEN *et al.*, 2015; MUSSI *et al.*, 2013, 2014, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; WONG *et al.*, 2004).

Tal estratégia se dá da seguinte forma: o cloridrato de doxorubicina é colocado para reagir com uma base (geralmente trietanolamina ou trietilamina), formando doxorubicina base livre. Esta, em contato com um ácido graxo— como o ácido láurico (CHEN *et al.*, 2015), ácido oleico (MUSSI *et al.*, 2014, 2015), ácido docosaexanoico (MUSSI *et al.*, 2013), dentre outros— protona-se e se liga iônica e se liga iônica ao ânion do ácido graxo que é formado (laurato, oleato, etc). Assim, há a conjugação com uma cadeia carbônica elevada, formando-se um composto de maior lipofilicidade, permitindo que a doxorubicina seja incorporada na matriz lipídica.

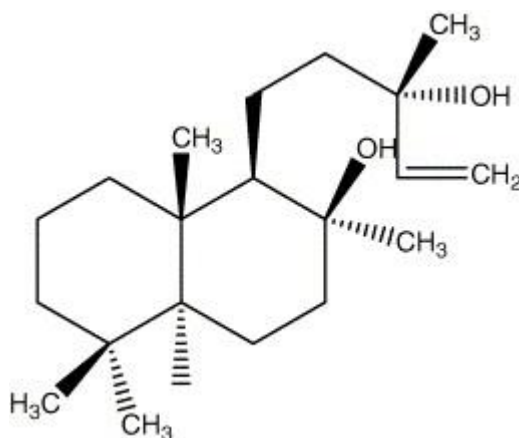
Afora os benefícios que a nanotecnologia pode proporcionar, vide a diminuição dos efeitos colaterais dos fármacos antineoplásicos, ela pode ser uma importante ferramenta para a veiculação de moléculas hidrofóbicas. Um número considerável, tanto de fármacos presentes no mercado, quanto de novas moléculas, apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, dificultando sua administração por algumas vias, como a endovenosa. Assim, as NLS e os CLN contituem também alternativas interessantes para a veiculação dessas moléculas. Um exemplo de uma molécula, onde foi permitida sua administração *in vivo* através da nanotecnologia, foi o esclareol.

2.5 Esclareol

O esclareol ((1*R*,2*R*,4*aS*,8*aS*)-1-[(3*R*)-3-Hidroxi-3-metil-4-penten-1-il]-2,5,5,8*a*-tetrametildecaidro-2-naftalenol) é um diálcool terciário, membro da família dos diterpenos do tipo labdano (**Figura 10**). Ele é usado como fragrância em cosméticos,

como flavorizante nas indústrias alimentícia e farmacêutica, além de tempero nas dietas chinesa e mediterrânea (JUNG *et al.*, 1998; MAHAIRA *et al.*, 2011; NOORI *et al.*, 2010). Primeiramente, ele foi isolado da *Salvia sclarea* (*fam.* Labiatae), uma planta nativa do mediterrâneo com ocorrência na Europa meridional e no Irã, sendo depois encontrado em coníferas (HATZIANTONIOU *et al.*, 2006; KUZMA; SKRZYPEK; WYSOKINSKA, 2006).

Figura 10 - Estrutura química do esclareol



O esclareol é conhecido por possuir forte atividade antimicrobiana (CHINO, 2005). Além dessa atividade, o esclareol mostrou importantes atividades citostáticas e citotóxicas em diversas linhagens de câncer, como de pulmão, renal, cólon, mama, próstata, ovário, dentre outras (HATZIANTONIOU *et al.*, 2006).

Apesar dos interessantes efeitos farmacológicos em células cancerosas, o mecanismo de ação do esclareol ainda não é totalmente esclarecido. Contudo, os estudos já relatados na literatura permitem a identificação de mecanismos relacionados à sua ação.

Em estudos realizados com células de câncer de cólon, de mama e leucêmicas, o esclareol levou a apoptose das linhagens tumorais. Essa apoptose se deu com um produção de DNA subdiplide e foi tempo-dependente (DIMAS *et al.*, 1999, 2001, 2006,

2007; HATZIANTONIOU *et al.*, 2006). Foi mostrado, também, que a diminuição da taxa de viabilidade celular gerada pelo esclareol em células de câncer de cólon humano coincidiu com um aumento da concentração deste diterpeno no citoplasma das células, indicando que sua ação pode se dar no citossol (PARADISSIS *et al.*, 2007b).

Outra característica da apoptose gerada pelo esclareol é a independência desse mecanismo da proteína p53. Foi mostrado que o esclareol ativa a maquinaria apoptótica das células de diversos tipos de câncer, independente se estas apresentavam fenótipo selvagem ou mutado para o gene p53. Contudo, viu-se que o esclareol induz aumento da expressão da proteína apoptótica p21. Constatou-se, ainda, que não há aumento da produção de EROs pelo diterpeno (MAHAIRA *et al.*, 2011).

A apoptose também se dá com regulação para baixo da proteína c-myc. O gene c-myc é um protooncogene ligado às mutações e imortalização celular. Essa apoptose, contudo, não acontece com regulação para baixo da proteína anti-apoptótica bcl-2 (DIMAS *et al.*, 2001).

Vistos os promissores resultados *in vitro*, o esclareol foi administrado *in situ* em tumores mamários murinos, mostrando uma drástica diminuição da taxa de crescimento do tumor. O estudo também mostrou que a administração intratumoral do esclareol, aumentou os níveis de interferon gama no sangue do animal, além de diminuir a quantidade de linfócitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+ que inibem a resposta imunológica dos linfócitos T (NOORI *et al.*, 2010).

No que concerne à administração *in vivo* do esclareol, dois problemas emergem: a alta lipofilia do composto e a sua toxicidade. Em relação ao primeiro, a lipofilia do composto requer que ele seja solubilizado em uma solução de surfactantes para que seja administrado parentalmente. Em relação à toxicidade, as doses terapêuticas de esclareol levaram a uma perda de consciência e morte de camundongos. No entanto, quando doses não tóxicas eram administradas, não se observavam efeitos consideráveis na redução dos tumores implantados nos animais (câncer de cólon

humano) (DIMAS *et al.*, 2007; MAHAIRA *et al.*, 2011). Assim, foi necessário o desenvolvimento de um sistema que permita a veiculação do esclareol em maiores doses sem que haja efeitos toxicológicos severos nos animais.

Dimas e colaboradores (2007) e Mahaira e colaboradores (2011) desenvolveram sistemas lipossomais contendo esclareol. As suspensões lipossomas quando injetadas intraperitonealmente levaram a uma redução significativa do tamanho dos tumores de cólon humano xenoinplantados nos camundongos. Os lipossomas não levaram a efeitos toxicológicos consideráveis nos animais. Tais resultados demonstram a grande possibilidade de se utilizar sistemas lipídicos nanoestruturados contendo esclareol para tratamento de tumores.

Além de seu efeito sozinho, o esclareol aumentou consideravelmente o efeito citotóxico da doxorubicina quando administradas conjuntamente em células de câncer de mama humano com depleção do gene p53 (DIMAS *et al.*, 2006) e em modelos esferóides de câncer de ovário humano resistentes à doxorubicina (PERCHE; TORCHILIN, 2012).

Perche e Torchilin (2012) mostraram que esse aumento do efeito citotóxico se dá de forma mais pronunciada quando as duas moléculas são administradas no mesmo momento.

Sendo assim, a veiculação conjunta do esclareol e da doxorubicina em uma mesmo nanocarreador permitiria que as duas moléculas chegassem ao mesmo tempo no sítio tumoral, potencializando o efeito de ambas. Assim sendo e diante do exposto acima, esse trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de CLN contendo esclareol e da doxorubicina para o tratamento do câncer.

3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar nanocarreadores lipídicos que permitam a encapsulação do esclareol e a co-encapsulação do esclareol com a doxorrubicina, tendo como perspectiva o tratamento de tumores malignos por administração endovenosa.

CAPÍTULO I

Encapsulação do diterpeno do tipo labdano “esclareol” em nanopartículas lipídicas e avaliação da sua atividade em linhagens tumorais humanas

1. INTRODUÇÃO

Há um grande esforço para a descoberta de novos compostos com atividade antineoplásica derivados de espécies vegetais. Isso se dá em virtude da dificuldade em se descobrir novas moléculas com atividade terapêutica advindas, unicamente, da síntese química. Ademais, compostos vegetais fornecem importantes informações sobre grupos farmacofóricos, possibilitando a sua mimetização em moléculas sintéticas (ATASANOV *et al.*, 2015).

Uma molécula de origem vegetal com promissora atividade anticâncer é o esclareol. Há diversos trabalhos descrevendo suas propriedades nos últimos anos (DIMAS *et al.*, 1999, 2001, 2006, 2007; HATZIANTONIOU *et al.*, 2006; MAHAIRA *et al.*, 2011; PARADISSIS *et al.*, 2007a; 2007b). Um grande inconveniente para o uso do esclareol é a sua hidrofobicidade ($\log P \sim 5$) que impede sua administração endovenosa. Uma alternativa para possibilitar a administração de compostos hidrofóbicos como o esclareol é a sua veiculação em nanoestruturas.

Trabalhos anteriores (DIMAS *et al.*, 2007; MAHAIRA *et al.*, 2011) relataram que a encapsulação do esclareol em lipossomas permitiu sua administração intraperitoneal em camundongos, em doses superiores àquelas que seriam toleradas se ele estivesse na forma livre.

Vistas as vantagens dos nanocarreadores lipídicos derivados das nanoemulsões (NLS e CLN), o primeiro capítulo desta dissertação busca a formulação desses sistemas carreando o esclareol. Esses carreadores, assim, podem ser uma alternativa para a veiculação do esclareol por via endovenosa. Os nanocarreadores formulados terão suas características físico-químicas e biológicas avaliadas em linhagens tumorais humanas e comparadas com aquelas do esclareol na sua forma livre.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar qual nanocarreador (NLS ou CLN) é mais adequado para a encapsulação do esclareol;
- 2- Avaliar a morfologia dos NLS e CLN carreando esclareol por microscopia de força atômica;
- 3- Avaliar a citotoxicidade do esclareol livre e encapsulado no nanocarreador de escolha em linhagem tumoral humana de mama (MDA-MB-231) e de cólon (HCT-116);
- 4- Avaliar o ciclo celular das células (MDA-MB-231 e HCT-116) após o tratamento com o esclareol livre e nanoencapsulado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Trietanolamina (TEA) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Compritol 888 ATO[®] (Monobehenato, dibehenato e tribehenato de glicerila) foi cedido gentilmente pela Gattefossé (Nanterre, França). Monoleato de sorbitano etoxilado (Tween[™] 80) e óleo de amendoim foram cedidos gentilmente pela Croda (Pensilvânia, Estados Unidos). Ácido oleico, citrato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), esclareol, iodeto de propídeo e Triton X-100 foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim Albuch, Alemanha). O Cell Titer Blue[®] (CTB) foi obtido da Promega (Madison, Estados Unidos). Os meios de cultura Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM), soro fetal bovino (SFB) e estreptomicina foram comprados da Gibco Life Technologies (Carlsbad, Estados Unidos). As demais substâncias utilizadas foram de grau analítico, sem purificação adicional.

3.2 Métodos

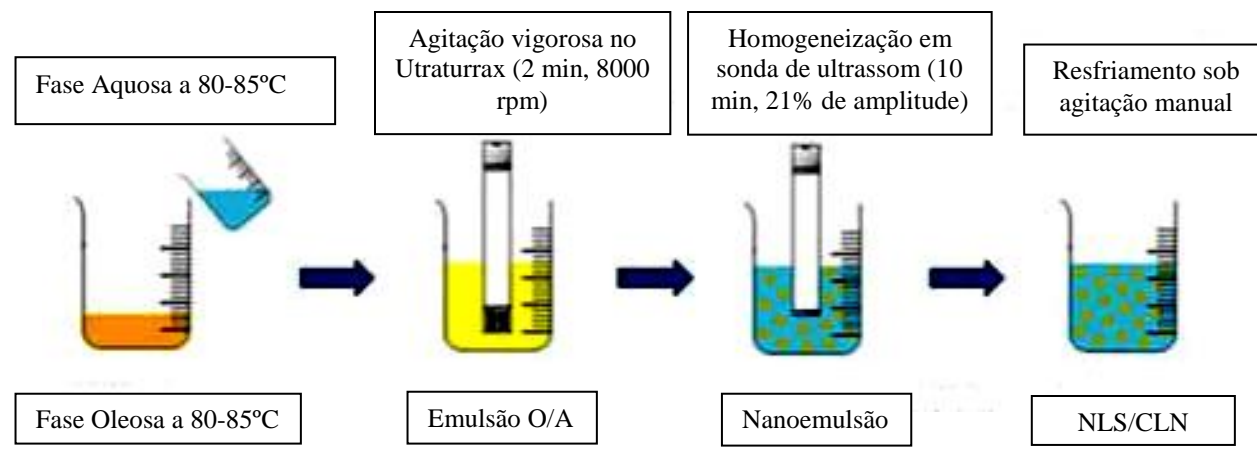
3.2.1 Preparo das formulações

As NLS e os CLN foram preparadas pelo método de homogeneização à quente utilizando o agitador Ultra Turrax T-25 (Ika Labortechnik, Staufen, Alemanha) e um aparelho de homogeneização do tipo ultrassom com sonda de alta potência de 500 W (Cole Parmer, Vernon Hills, Estados Unidos). A fase oleosa (FO) foi pesada e aquecida a 80-85 °C. Paralelamente, a fase aquosa (FA) foi aquecida até a mesma temperatura. As composições das formulações estão na **Tabela 1**. A FA foi então lentamente vertida sobre a FO sob agitação a 8.000 rpm (rotações por minuto) no agitador Ultra Turrax T-25. Após 2 minutos de agitação, a emulsão formada foi submetida à energia adicional durante 10 minutos no ultrassom com sonda de alta potência (21% de amplitude) (**Figura 11**). Em seguida, a suspensão das NLS ou dos CLN foi resfriada com o auxílio de agitação manual. Após chegada em temperatura ambiente, a formulação foi armazenada em frascos de penicilina ao abrigo da luz e mantida sob refrigeração (4°C).

Tabela 1 - Composição das NLS e CLN carreando esclareol

		(% p/v)	(% p/v)
		NLS-Esclareol	CLN-Esclareol
FO	Compritol	1,50	1,20
	Óleo de Amendoim	-----	0,30
	Tween 80	0,80	0,80
	Trietanolamina	0,06	0,06
	Ácido Oleico	0,10	0,10
	Esclareol	0,20	0,20
FA	Água ultrapura (q.s.p)	100	100

Figura 11 - Esquema mostrando a preparação das NLS e dos CLN.



Adaptado de CARNEIRO, 2013.

3.2.2 Caracterização das formulações

3.2.2.1 Diâmetro das partículas

O diâmetro médio das partículas foi determinado por espalhamento dinâmico da luz (DLS) utilizando-se de um Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) a um ângulo fixo de 90° e temperatura de 25° C. As formulações foram diluídas em água ultrapura a uma proporção de 1:100.

3.2.2.2 Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado pela técnica de DLS e análise da mobilidade eletroforética das nanopartículas. As medidas de potencial zeta foram realizadas utilizando-se um Zetasizer ZS90 à temperatura de 25° C. As formulações foram diluídas em água ultrapura a uma proporção de 1:100.

3.2.2.3 Microscopia de luz polarizada

A presença de cristais de esclerol nas formulações foi avaliada por microscopia de luz polarizada. Uma alíquota das formulações foi retirada, colocada sobre uma lâmina de

vidro sob uma lâminula, e avaliada em microscópio ótico (Zeiss Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) sob luz polarizada em campo escuro. A identificação de cristais no microscópio indicou uma expulsão do esclareol da matriz lipídica dos nanocarreadores.

3.2.2.4 Microscopia de Força Atômica

As amostras de NLS-Esclareol e CLN-Esclareol foram diluídas com água ultrapura na proporção 1:100. 10 μ L dessa diluição foram aplicadas sobre um suporte de mica. Após, a mica foi seca com gás argônio comprimido e colocada para análise em sonda com modo de contato intermitente em Microscópio de Força Atômica Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Tonawanda, Estados Unidos).

3.2.3 Avaliação biológica dos CLN carreando esclareol

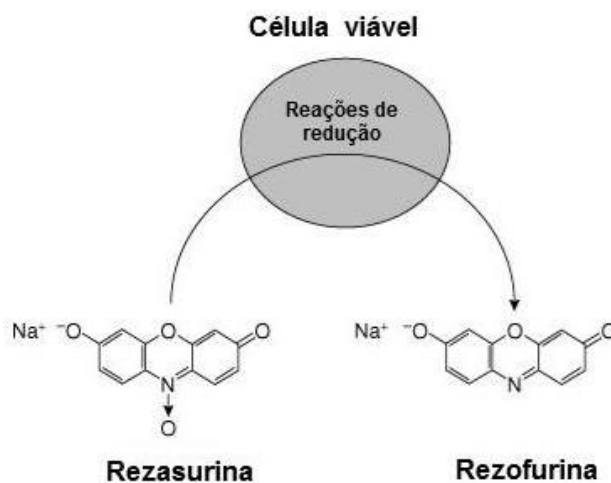
3.2.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Para se determinar a redução da viabilidade celular provocada pelo esclareol livre e pelos CLN carreando esclareol, foram utilizadas duas linhagens de células: uma de câncer de mama humano, MDA MB-231, e outra de câncer de cólon humano, HCT-116.

Para se avaliar a citotoxicidade, utilizou-se o CTB[®] de acordo com as instruções de uso do fabricante.

O CTB[®] consiste em uma solução do reagente rezasurina. As células viáveis convertem a rezasurina em uma molécula fluorescente, a resorufina. Essa conversão se dá nas mitocôndrias, no citoplasma e nos compartimentos microssomais das células viáveis (**Figura 12**). Comparando as intensidades de fluorescência emitidas entre o poço tratada e o poço controle (aquele onde não foi adicionado tratamento algum), calcula-se a redução da viabilidade celular naquela concentração.

Figura 12 - Conversão da rezasurina em rezofurina



De início, alíquotas das linhagens celulares foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas a uma temperatura de 37 °C e, em seguida, o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB (meio completo) foi adicionado sobre as células. A suspensão de células foi transferida para um frasco de cultura celular, incubado em estufa a 37°C e 5 % de CO₂ (3110 CO₂ Water Jacketed Incubator, Thermo Fisher, Waltham, Estados Unidos). A cada 48 horas, o meio de cultura dos frascos foi substituído.

Periodicamente, as células, mantidas em frascos de cultura celular, foram observadas em microscópio de luz invertido (CARL ZEISS Axiovert 25 Inverted Microscope 1050-705, Oberkochen, Alemanha) para monitorar parâmetros como morfologia, crescimento celular e possíveis contaminantes. Após as células atingirem confluência adequada, elas foram tripsinizadas. Após três tripsinizações em um mesmo frasco, a suspensão de células foi transferida para um novo frasco de cultivo. Nenhuma cultura celular sofreu mais que vinte tripsinizações.

Para coletar as células, adicionou-se 1,0 mL de tripsina, posteriormente inativada com meio DMEM completo. A suspensão obtida foi centrifugada a uma velocidade de 2000 rpm por 5 minutos e suspensa em 1,0 mL de meio de cultura DMEM completo. As

células obtidas foram inseridas em placas de 96 poços a uma concentração de 5×10^3 células/poço, sendo mantidas em estufa (5% de CO_2 a 37 °C) e incubadas por 24 horas. Na sequência, preparações com diferentes concentrações de esclareol (1,9; 3,8; 7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 120,0 μM) foram diluídas diretamente em meio de cultura, adicionadas nos poços, e mantidas incubadas por 24 horas em estufa (5% de CO_2 , a 37 °C). O esclareol foi solubilizado em DMSO, de modo que a máxima concentração de DMSO em um poço nunca chegasse a 0,5% v/v.

Após 24 horas de incubação com as preparações, todo o conteúdo dos poços foi removido. Na sequência, 40 μL de DMEM completo e 10 μL de CTB[®] foram adicionados aos poços com as células. As amostras foram mantidas, em média, por duas horas em estufa (5% de CO_2 , a 37 °C). Após o período de incubação foi feita a leitura das placas no equipamento Cytation 5 (BioTek, Winooski, Estados Unidos) pela intensidade da fluorescência, nos seguintes comprimentos de onda: 560 nm para excitação e 590/10 nm para emissão.

3.2.3.2 Avaliação do ciclo celular

Foram plaqueadas 2×10^5 células/poço em placas de 24 poços, sendo estas mantidas em estufa (5% de CO_2 , a 37 °C) por 24 horas. Após esse período, as células foram tratadas com concentrações equivalentes a 60 e 120 μM de esclareol. O tratamento deu-se por 24 horas, durante o qual as células foram novamente incubadas em estufa a 37 °C em ambiente com 5% de CO_2 . Após as 24 horas de incubação, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS pH 7,4. Após as lavagens, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e o *pellet* obtido foi ressuscitado em solução HFS (50 g/mL de Iodeto de Propídeo em 0,1% de citrato de sódio mais 0,1% Triton X-100) e foram incubadas a 4°C por 4 horas. A suspensão obtida foi lida em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, Broken Bow, Estados Unidos). Foi usado comprimento de onda de excitação de 488 nm e o filtro usado para a leitura da emissão foi o de 585/42 nm, relativos aos comprimentos de excitação e emissão do Iodeto de Propídeo. Um

mínimo de 10 mil eventos foram avaliados para cada análise. Usou-se como controle negativo, o DMSO na mesma concentração usada para solubilizar o esclareol livre.

3.2.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm DP (desvio-padrão). As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA). Para diferenças entre as características físico-químicas (tamanho, IP e potencial zeta) e para avaliar a diferença entre cada fase do ciclo celular entre os tratamentos, usou-se ANOVA de uma via; para avaliar a diferença entre as curvas de citotoxicidade, usou-se ANOVA de duas vias. Pós-teste t foi usado para avaliar a diferença entre os pares de grupos. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química e comparação entre NLS e CLN carreando esclareol

Dois tipos de nanopartículas lipídicas distintas foram preparados para a encapsulação do esclareol: uma NLS (aqui chamada de NLS-Esclareol) e um CLN (aqui chamado de CLN-Esclareol).

A diferença entre os dois tipos de formulação consiste, assim, na composição da matriz lipídica. Enquanto para a NLS-Esclareol, a matriz lipídica consiste apenas do lipídio sólido Compritol (dibenehato de glicerila com presença de mono e triglicerídeos do ácido behênico), para o CLN-Esclareol, a matriz lipídica tem além do Compritol, um lipídio líquido em sua composição: o óleo de amendoim (um triglicerídeo de cadeia longa).

Os resultados para diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta de ambas as formulações são mostrados na **Tabela 2**.

Não foram vistas diferenças para os três parâmetros analisados entre os quatro grupos analisados (NLS Brancas X CLN brancos X NLS-Esclareol x CLN-Esclareol). A ausência de diferenças significativas entre as NLS e os CLN, pode ser atribuída à baixa concentração de lipídio líquido (óleo de amendoim) nos CLN (20% da matriz lipídica). Trabalhos anteriores já mostraram que CLN tendem a apresentar tamanho médio menor do que as respectivas NLS (BONDÌ *et al.*, 2014; HAN *et al.*, 2014; PAN; TIKEKAR; NITIN, 2016), o que não foi visto no presente trabalho. Contudo, nesses trabalhos, a concentração do lipídio líquido na matriz lipídica foi geralmente maior do que aquela usada no presente estudo.

Tabela 2 - Características físico-químicas de NLS e CLN carreando esclareol.

	NLS- Branco	NLS-Esclareol	CLN-Branco	CLN-Esclareol
Diâmetro médio (nm)	126 ± 6	127 ± 16	124 ± 8	115 ± 5
IP	0,26 ± 0,01	0,30 ± 0,05	0,25 ± 0,03	0,23 ± 0,02
Potencial zeta (mV)	-26 ± 2	-27 ± 2	-27 ± 4	-22 ± 7

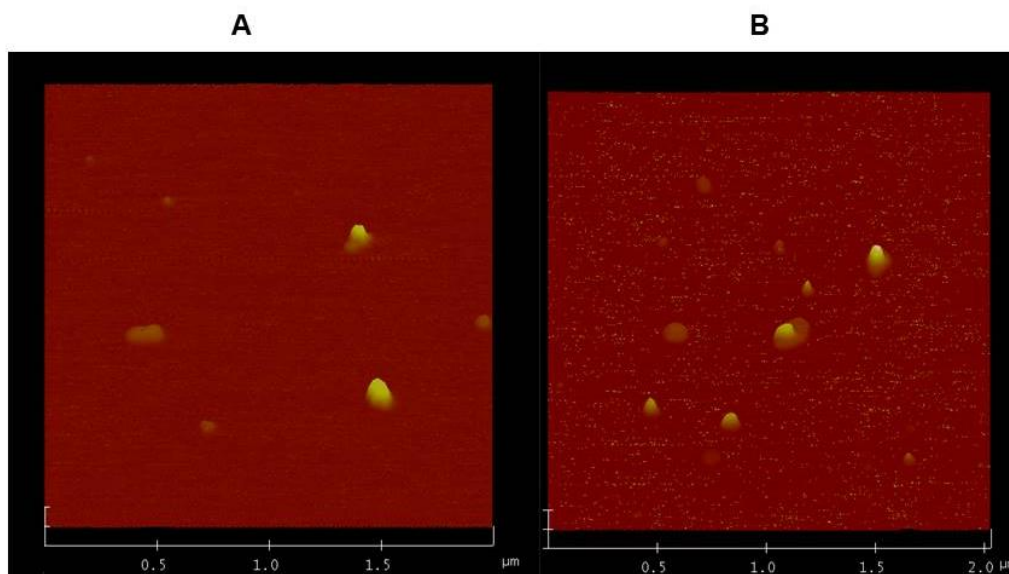
Dessa forma, os carreadores preparados apresentaram tamanho desejado para a administração venosa visando um *target* passivo; um índice de polidispersão baixo (até 0,30) e um potencial zeta negativo, que promoverá estabilidade eletrostática entre as nanopartículas formadas (esse potencial zeta negativo é devido, provavelmente, ao ácido oleico usado como co-surfactante, que— desprotonado no pH da formulação— apresenta carga negativa devido ao seu grupo carboxilato).

As NLS e os CLN contendo esclareol foram avaliados quanto à sua morfologia por Microscopia de Força Atômica (AFM). As imagens estão representadas na **Figura 13**. Imagens por AFM são talvez a técnica microscópica mais usada para se averiguar a morfologia de nanossistemas devido à facilidade de análise (WANG *et al.*, 2012). Tanto para os CLN, quanto para as NLS, viu-se uma presença de partículas de formato tendendo ao esférico e também de formatos mais irregulares. Tal comportamento irregular é comum para esses sistemas, já tendo sido relatado por outros autores (AJI ALEX *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2013).

Foram encontradas partículas com tamanho similar ao observado nas análises de diâmetro médio realizadas por DLS (120-130 nm). Contudo, a maioria das partículas apresentava tamanho menor (entre 40 e 100 nm). Esses achados estão em consonância com dados obtidos na avaliação da distribuição pelo DLS por número. Nela, a grande maioria das partículas, tanto nas NLS quanto nos CLN, tinha tamanho menor do que o valor médio encontrado (120-130 nm). O valor de tamanho médio encontrado pelo DLS pode ser atribuído, assim, à presença de algumas partículas na escala micrométrica, o que pôde ser verificado pela distribuição de partículas por volume pelo DLS foi realizada (dados não mostrados).

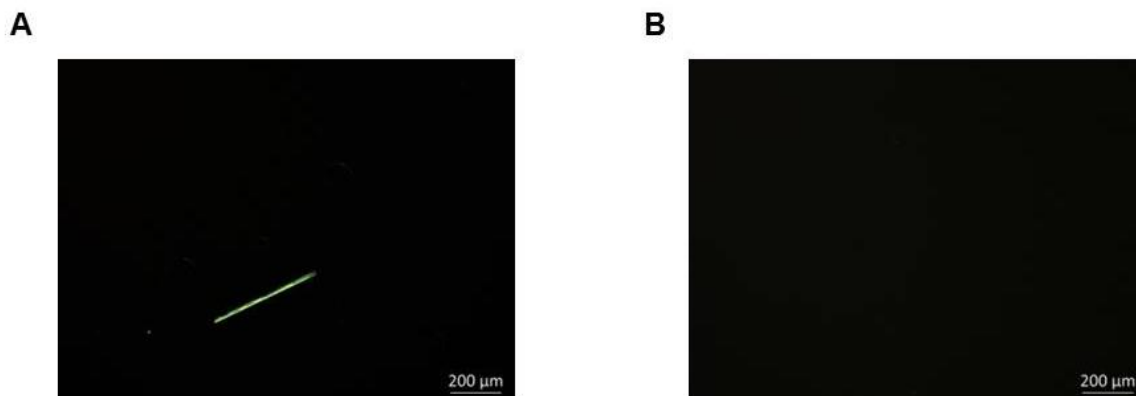
Vale ressaltar que no processo de produção das NLS e dos CLN, não há um procedimento de calibração de tamanho (como a extrusão), assim, inexoravelmente, haverá partículas de tamanho maior. Por mais, que elas representem uma parcela ínfima das partículas na formulação, alteram o valor médio de tamanho encontrado pelo DLS, além de aumentar o IP.

Figura 13 - Microscopia de força atômica de (A) CLN e (B) NLS carregando esclareol.



A fim de se averiguar se a encapsulação do esclareol nas NLS e nos CLN foi efetiva, procedeu-se a análise das formulações em microscópio de luz polarizada. A presença de cristais de esclareol foi claramente visualizada nas amostras de NLS, quando estas eram submetidas à luz polarizada, enquanto que essas estruturas não foram visualizadas para os CLN (**Figura 14B**). A **Figura 14A** dá exemplo de um cristal de esclareol visto em uma amostra de NLS. Isto pode ser atribuído, provavelmente, às imperfeições da matriz lipídica dos CLN que permitem melhor acomodação do esclareol. Essas imperfeições da matriz lipídica, permitindo a maior acomodação do fármaco em CLN em comparação com as NLS, são bastante descritas na literatura (BELOQUI *et al.*, 2016; FANG; AL-SUWAYEH; FANG, 2013; PAN; TIKEKAR; NITIN, 2016) e são uma das principais razões para o advento desse sistema frente às NLS desde a última década.

Figura 14 - Microscopia de luz polarizada de (A) NLS e (B) CLN carreando esclareol



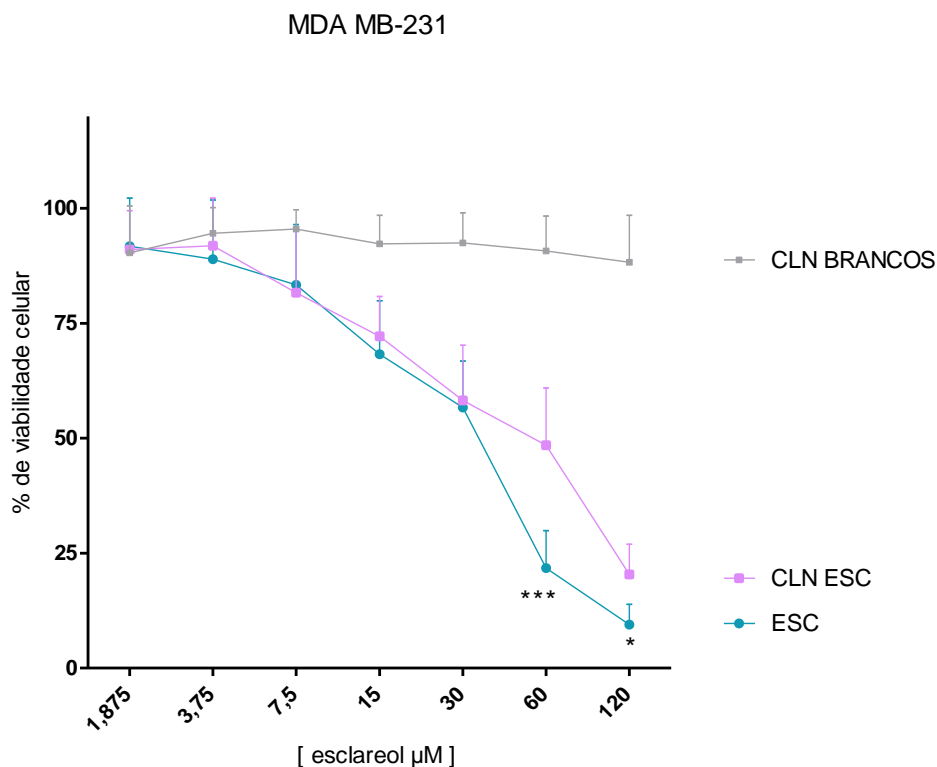
Avaliando-se as diferenças entre os dois sistemas testados (NLS e CLN) para carrear o esclareol, viu-se que ambos mostraram-se bem semelhantes quanto aos parâmetros avaliados. Contudo, detectou-se uma melhor encapsulação do esclareol em CLN quando em comparação com as NLS. Dessa maneira, os CLN foram selecionados como sistema carreador do esclareol para as avaliações biológicas em linhagens tumorais humanas.

4.2 Avaliação da atividade biológica dos CLN carreando esclareol

Tendo-se escolhido os CLN como nanocarreadores de escolha para a encapsulação do esclareol, procedeu-se, então, à sua avaliação biológica, bem como dos CLN brancos (sem esclareol) e do esclareol na sua forma livre.

Avaliou-se a citotoxicidade dos três grupos nas linhagens de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-231, e de carcinoma de cólon humano, HCT-116. As **Figuras 15 e 16** mostram os dados obtidos para as linhagens MDA-MB-231 e HCT-116, respectivamente.

Figura 15 - Redução de viabilidade celular de células MDA-MB-231 após o tratamento com esclareol livre (ESC), CLN brancos e CLN contendo esclareol (CLN ESC). *, *** (diferença estatística entre os grupos ESC e CLN ESC). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.



Percebe-se que em ambas as linhagens testadas, os CLN brancos não mostraram citotoxicidade. Tal comportamento não tóxico é amplamente descrito para NLS e CLN brancos, devido à natureza atóxica dos materiais que os constituem (DOKTOROVOVA; SOUTO; SILVA, 2014). Os valores de IC_{50} encontrados para ambas as formas do esclareol (encapsulada e livre) em ambas as linhagens, encontram-se na **Tabela 3**.

Figura 16 - Redução de viabilidade celular de células HCT-116 após o tratamento com esclareol livre (ESC), CLN brancos e CLN contendo esclareol (CLN ESC). *, * (diferença estatística entre os grupos ESC e CLN ESC). * = P < 0,05; *** = P < 0,001.**

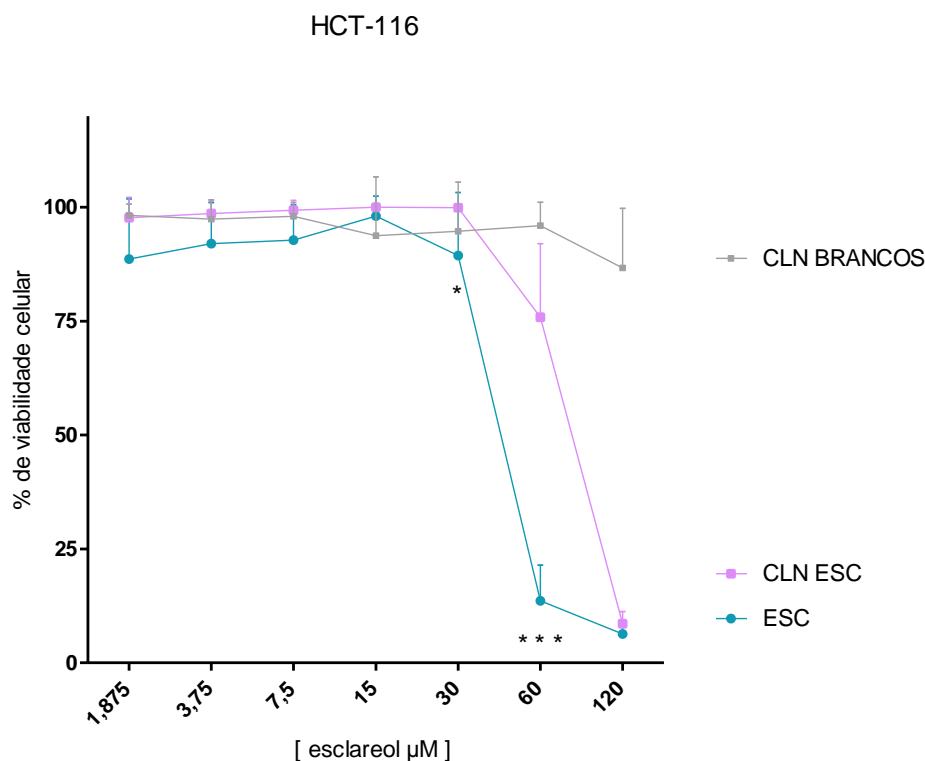


Tabela 3 - Valores de IC₅₀ para o esclareol livre e carregado em CLN para células MDA-MB-231 e HCT-116

	MDA-MB-231	HCT-116
Esclareol livre	28 ± 2 µM	45 ± 6 µM
CLN-Esclareol	42 ± 3 µM	75 ± 8 µM

Para vários fármacos convencionais usados na clínica (doxorrubicina e paclitaxel, por exemplo), costumam-se encontrar valores de IC₅₀ maiores para a linhagem MDA-MB-231 do que para a linhagem HCT-116 (LI *et al.*, 2015). Isso acontece porque a linhagem MDA-MB-231 apresenta status mutante para a proteína p53, enquanto que a linhagem HCT-116 apresenta status selvagem para essa proteína. Células com status mutante

são mais resistentes aos fármacos cuja ação citotóxica depende da p53 para gerar morte celular. Como o esclareol é uma molécula que tem seu mecanismo de morte celular independente da p53 (DIMAS *et al.*, 2006; MAHAIRA *et al.* 2011), esse comportamento não é observado para esse diterpeno, sendo os valores de IC₅₀ do esclareol maiores para a linhagem HCT-116.

Com relação à atividade citotóxica do esclareol nanoencapsulado, os valores de IC₅₀ para os CLN foram maiores do que aqueles observados para o esclareol livre e isto para ambas as linhagens celulares (28 ± 2 vs. 42 ± 3 μ M para MDA-MB-231 e 45 ± 6 vs. 75 ± 8 μ M para HCT-116). Tal comportamento de menor citotoxicidade em comparação com o fármaco livre foi relatado para a encapsulação do esclareol em outra nanoestrutura, os lipossomas (HATZIANTONIOU *et al.*, 2006; MAHAIRA *et al.*, 2011).

Esses resultados foram explicados por duas observações feitas por Paradissis e colaboradores (2007b) em experimentos de captação celular do esclareol: em células HCT-116 e MCF-7, o esclareol livre teve um pico de absorção celular em 8 horas e para células de câncer de pulmão (H-460), em 16 horas. Contudo, quando o esclareol estava encapsulado em lipossomas, esse pico de absorção ocorreu em 48 horas para células MCF-7 e 72 horas para células HCT-116 e H-460. Assim, o esclareol encapsulado em lipossomas necessitaria de um tempo maior de incubação para ter uma ação citotóxica maior do que aquela observada para o esclareol na forma livre.

Além disso, em células HCT-116, foi feita uma avaliação da distribuição intracelular do esclareol comparando-se o livre com o encapsulado em lipossomas. Quando livre, o esclareol distribuiu-se praticamente todo no citossol. Quando em lipossomas, o esclareol distribuiu-se entre a membrana plasmática, núcleo e o citossol. Como se acredita que o esclareol tem seu sítio de ação nas mitocôndrias (presentes no citossol), o esclareol livre teria uma ação mais significativa do que aquele encapsulado em lipossomas (PARADISSIS *et al.*, 2007a).

Se considerarmos que um fenômeno similar ao observado para os lipossomas por Paradissis e colaboradores (2007a, 2007b) ocorreria também para os CLN, isso poderia explicar o maior IC_{50} visto quando o esclareol está encapsulado neste nanosistema: captação celular mais lenta e distribuição intracelular modificada.

Uma forma de contornar tal problema foi sugerida por Patel e colaboradores (2010). Nesse trabalho, lipossomas carregados com esclareol e contendo um lipídio que tem afinidade pela mitocôndria (esteariltrifenilfosfônio— STPP) foram preparados. Os lipossomas contendo tal lipídio mostraram-se mais citotóxicos em linhagem de carcinoma de cólon humano (COLO205) do que aqueles lipossomas que não o continham. Dessa maneira, um *target* ativo para as mitocôndrias pode ser uma alternativa para aumentar a atividade de nanocarreadores carregados com moléculas com ação nas mitocôndrias, como se acredita que é o caso do esclareol.

Uma vez que os comportamentos da citotoxicidade entre o esclareol na sua forma livre e em CLN foram distintos, buscou-se avaliar a distribuição do ciclo celular das células após o tratamento. Os mesmos três grupos investigados para os testes de citotoxicidade foram avaliados para a distribuição do ciclo celular: CLN brancos, CLN carreando esclareol (CLN ESC) e esclareol livre (ESC). Duas concentrações de esclareol (60 e 120 μ M) foram usadas. O ciclo celular foi dividido em: sub G0/G1, G0/G1, S e G2/M. A distribuição dos componentes do ciclo celular da linhagem MDA-MB-231 está descrita nas **Figuras 17 e 18** e para a linhagem HCT-116, nas **Figuras 19 e 20**.

Figura 17 - Distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com uma concentração de 60 μ M de esclareol.

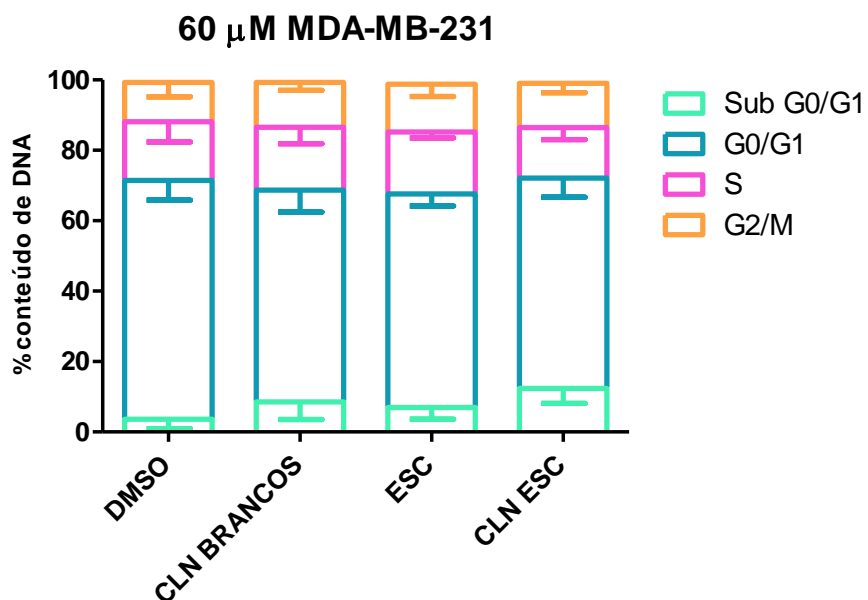


Figura 18 - Distribuição do ciclo celular de células da linhagem MDA-MB-231 após tratamento com uma concentração de 120 μ M de esclareol. **, * (diferença estatística para o grupo DMSO). ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.**

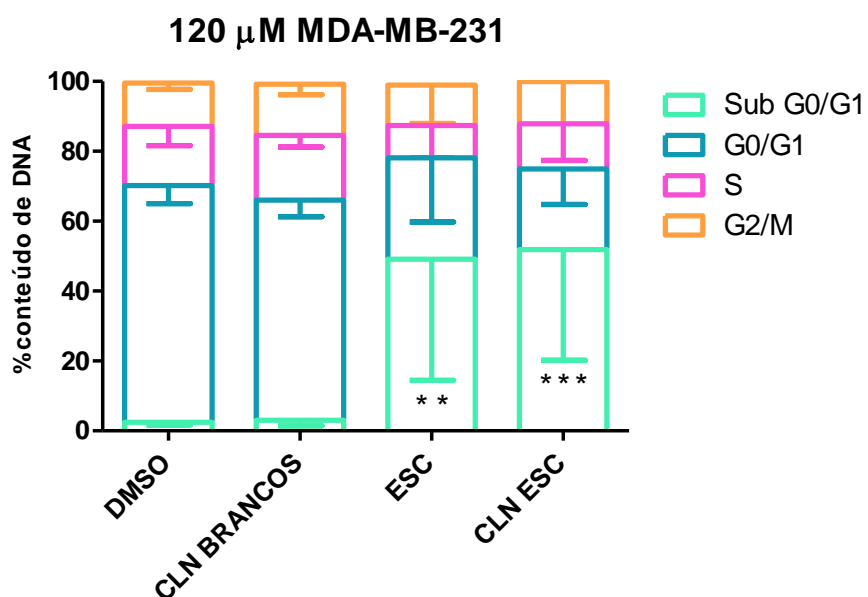


Figura 19 - Distribuição do ciclo celular de células da linhagem HCT-116 após tratamento com uma concentração de 60 μ M de esclareol.

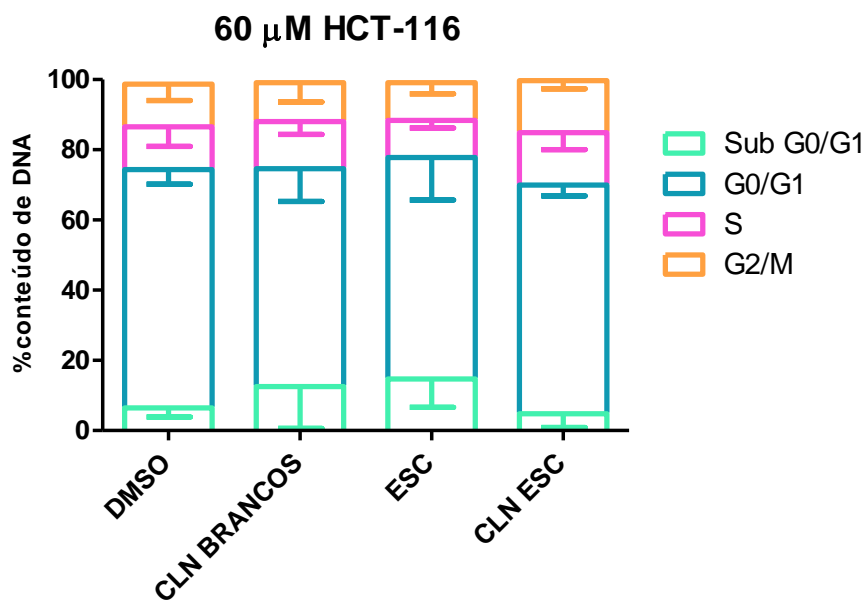
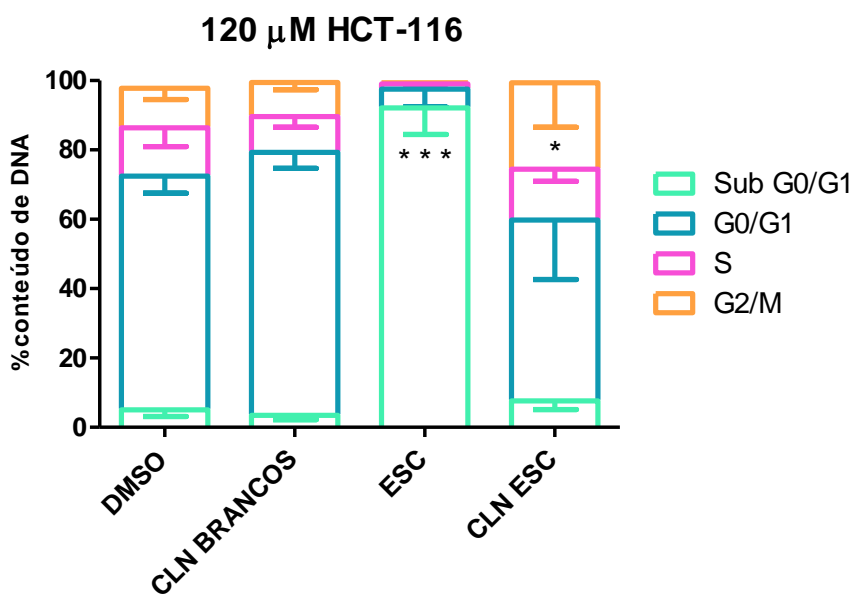


Figura 20 - Distribuição do ciclo celular de células da linhagem HCT-116 após tratamento com uma concentração de 120 μ M de esclareol. *, * (diferença estatística para o grupo DMSO). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.**



Os CLN não carregados com esclareol (CLN brancos) mostraram comportamento similar ao controle negativo (DMSO). Dessa maneira, mostra-se, mais uma vez, sua atoxicidade.

Duas concentrações de esclareol foram usadas para avaliação do ciclo celular, 60 e 120 μM . Para os tratamentos com 60 μM e para ambas as linhagens de células, as diferenças entre os grupos com esclareol (esclareol livre e CLN esclareol) e o controle negativo (DMSO) não foram significativas.

Para os tratamentos com 120 μM de esclareol, observou-se diferenças no ciclo celular das células tratadas com esclareol, na sua forma livre e nanoencapsulada. Quando se avalia o tratamento na linhagem MDA-MB-231, percebe-se um aumento da quantidade de DNA subdiploide (sub G0/G1) para o tratamento com o esclareol livre e encapsulado em CLN em comparação com o grupo controle (DMSO) (**Figura 19**). Esse aumento da porcentagem de DNA na fase sub G0/G1 é compensada por uma diminuição do conteúdo de DNA na fase G0/G1. O conteúdo de DNA subdiploide é aquele que apresenta conteúdo de DNA menor que $2n$. Conteúdo menor que $2n$ surge por um tratamento que gera fragmentação de moléculas de DNA. Essa fragmentação é um indicativo de um processo de morte celular por apoptose (DARZYNKIEWICZ; HALICKA; ZHAO, 2010). No entanto, as diferenças entre o grupo esclareol livre e o CLN esclareol não foram significativas.

A presença de conteúdo subdiploide em experimentos de ciclo celular após tratamento com esclareol foi relatado previamente em outros estudos com células HCT-116, MCF-7, MOLT-3 e H33JA-AJ13 (as duas últimas, linhagens leucêmicas humanas) (DIMAS *et al.*, 1999, 2001, 2006; MAHAIRA *et al.*, 2011).

Contudo, percebeu-se que para a linhagem HCT-116, o comportamento foi diferente daquele visto para a linhagem MDA-MBA-231 (**Figura 21**). O tratamento com o esclareol livre (120 μM) proporcionou um aumento expressivo no conteúdo do DNA subdiploide quando comparado com os demais grupos. Contudo, para os CLN

contendo esclareol, não se observou um aumento do DNA subdiploide. Em vez disso, observou-se aumento da quantidade de DNA nas fases G2/M em comparação ao grupo controle (DMSO). Enquanto a geração de conteúdo de DNA subdiploide pelo esclareol já tenha sido bem descrita na literatura, uma parada em G2/M, como vista para o tratamento a 120 μ M de CLN contendo esclareol em células HCT-116 ainda não havia sido relatada.

A parada em G2/M é relatada para diversos fármacos usados correntemente na clínica oncológica como a doxorrubicina (GOŁUŃSKI *et al.*, 2016), o paclitaxel (HAN; LEE; 2016), a cisplatina (VOLAND *et al.*, 2006) e o etoposídeo (NAM; DOI; NAKAYAMA, 2010). Para todos esses fármacos, a parada em G2/M está ligada à morte celular por apoptose. Em trabalhos anteriores, já havia sido mostrado que o esclareol gera morte celular por apoptose (DIMAS *et al.*, 1999, 2007; MAHAIRA *et al.*; PATEL *et al.*, 2010, 2011; WANG *et al.*, 2015), contudo, nunca com parada em G2/M. A parada em G2/M, contudo, também já foi relatada como um indicativo de morte celular por autofagia (FILIPPI-CHIELA *et al.*, 2011; LAMBERT *et al.*, 2008). Assim, surge-se o questionamento se esse comportamento distinto visto para as células HCT-116 quando tratadas com o esclareol encapsulado em CLN, seria devido talvez a um novo mecanismo de morte celular. Uma hipótese pode ser a morte celular por um mecanismo de autofagia.

Interessante, para essa discussão, o artigo publicado por Rheman e colaboradores (2014). Nele, vários derivados do esclareol foram sintetizados e avaliados quanto a melhora nas suas atividades citotóxicas frente à linhagem PC-3 (câncer de próstata humano). O melhor deles (chamado no trabalho de SS-12 e formado pelo acoplamento de um grupo fluorobezeno à estrutura do esclareol) é avaliado quanto a sua atividade apoptótica e autofágica, tendo provocado morte celular por ambos os mecanismos. O esclareol, no entanto, não gerou atividade autofágica. Viu-se também que quando se inibia a atividade autofágica do composto SS-12, inibia-se também sua atividade apoptótica, mostrando que sua atividade autofágica mostrava-se importante para a

apoptose observada. O trabalho não chega a discutir, contudo, o porquê de o SS-12 gerar atividade autofágica e o esclareol, não.

Moléculas diferentes podem vir a ter diferentes mecanismos de distribuição intracelular, ao apresentarem diferentes características físico-químicas (NDOLO *et al.*, 2010). Dessa maneira, um dos motivos dos resultados vistos por Rheman e colaboradores (2014) pode ter sido essa diferente distribuição.

Como se viu anteriormente (PARADISSIS *et al.*, 2007a), lipossomas contendo esclareol tinham distribuição intracelular diferente do esclareol livre, sendo essa uma explicação para a sua menor citotoxicidade. Pode-se supor, então, que os CLN contendo esclareol também tenham distribuição intracelular diferente da molécula livre, podendo apresentar, por conta disso, um diferente tipo de morte celular, como a autofagia. Ademais, Panzerine e colaboradores (2013) ressaltam que nanopartículas podem estimular processos autofágicos.

Dessa maneira, fica como perspectiva para esse trabalho, a análise se a parada em G2/M em células HCT-116, causada por CLN carreando esclareol é devida a um processo autofágico.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se com esse capítulo que é possível a encapsulação do esclareol em carreadores lipídicos como NLS e CLN. Entre as NLS e os CLN formulados, não foram encontradas diferenças substanciais, contudo, a presença de cristais de esclareol nas NLS e não nos CLN indicam que o último é um melhor sistema para sua encapsulação.

Quando os CLN contendo esclareol foram comparados com o esclareol livre quanto a sua citotoxicidade, viu-se que os CLN são menos citotóxicos que o esclareol livre nas linhagens estudadas quando os grupos são incubados com as células pelo período de 24 horas. Na análise de ciclo celular, viu-se que o esclareol livre gera conteúdo

subdiploide. Já quando se avaliou os CLN carregados com esclareol, ocorreu uma geração de DNA subdiploide na linhagem MDA-MB-231, mas não nas células HCT-116, sendo observada para esta linhagem, uma parada na fase G2/M. Estudos subsequentes mostrarão se esse comportamento distinto na linhagem HCT-116 reflete um diferente mecanismo de morte celular para os CLN carregando esclareol.

De qualquer maneira, mesmo com a menor citotoxicidade apresentada pelos CLN, os dados desse capítulo são importantes ao mostrar a possibilidade de encapsulação do esclareol. Isso porque a administração *in vivo* do esclareol é inviabilizada na sua forma livre, mas pode ocorrer se ele estiver encapsulado em nanocarreadores. Assim, os CLN formulados podem ser uma alternativa para a veiculação do esclareol.

CAPÍTULO II

Desenvolvimento e avaliação do potencial biológico de carreadores lipídicos nanoestruturados carreando esclareol e doxorrubicina

1. INTRODUÇÃO

No **Capítulo I**, CLN carregados com esclareol foram desenvolvidos e avaliados. Vistos os grandes benefícios que se pode obter ao combinar duas moléculas biologicamente ativas em um mesmo tratamento, buscou-se, nessa etapa do trabalho, avaliar os efeitos da combinação do esclareol com o antitumoral antracíclico doxorrubicina.

A doxorrubicina é um fármaco largamente utilizado para o tratamento de diversos tumores sólidos, linfomas, sarcomas, além de ser uma opção terapêutica para virtualmente todos os tipos de cânceres (CARVALHO *et al.*, 2009; TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012). Em dois trabalhos anteriores, Dimas e colaboradores (2006) e Perche e Torchilin (2012) já mostraram que a combinação entre o esclareol e a doxorrubicina gerou um efeito citotóxico e citostático sinérgico nas linhagens de câncer avaliadas.

Pretende-se, nessa etapa do presente trabalho, potencializar o efeito biológico dos CLN contendo esclareol, desenvolvidos previamente, com a adição, neles, da antraciclina doxorrubicina. Perche e Torchilin (2012) viram em estudo *in vitro* realizado com células de câncer de ovário que quando a doxorrubicina e o esclareol eram adicionados no mesmo momento nas células avaliadas, havia maior efeito citotóxico do que quando as moléculas eram adicionadas em momentos distintos. A presença de ambas as moléculas em um mesmo nanocarreador permite que as duas substâncias cheguem conjuntamente ao mesmo sítio celular, potencializado o seu efeito, portanto.

Ademais, a doxorrubicina quando veiculada em sistemas nanoestruturados (lipossomas) mostra-se menos cardiotoxica em câncer de mama metastático, menos leucopênica em câncer de ovário metastático e menos neutropênica em ambos (STYLIANOPULOS; JAIN, 2015). Dessa maneira, a co-encapsulação da doxorrubicina e do esclareol em CLN permite que o esclareol seja veiculado para a administração *in vivo*, que a doxorrubicina apresente uma menor toxicidade e possibilitaria que as

duas moléculas cheguem conjuntamente ao sítio celular tumoral, potencializando seus efeitos.

Dessa maneira, o **Capítulo II** tratará do desenvolvimento de CLN contendo doxorubicina e esclareol, sua caracterização físico-química e sua avaliação biológica em linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB-231).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Desenvolver CLN contendo doxorubicina e esclareol e avaliar seus parâmetros físico-químicos (tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta, encapsulação da doxorubicina e do esclareol);
- 2- Avaliar a liberação da doxorubicina dos CLN contendo doxorubicina e esclareol;
- 3- Determinar o sinergismo da combinação doxorubicina/esclareol em linhagem MDA-MB-231 no que tange ao seu efeito citotóxico;
- 4- Determinar a redução da viabilidade celular dos CLN contendo doxorubicina e esclareol em linhagem tumoral humana MDA MB-231.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Cloridrato de Doxorribicina foi adquirido da ACIC Chemicals (Ontário, Canada). Tetraidrofurano (THF) e Metanol (MeOH) foram adquiridos da Tedia (Fairfield, Estados Unidos). O restante do material usado foi o mesmo descrito no item 3.1 do **Capítulo I**.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo das formulações

O método de produção dos CLN é o mesmo mostrado no item 3.2.1 do **Capítulo I**. Foram desenvolvidas duas formulações contendo doxorubicina e esclareol,

apresentando como diferença entre elas apenas a concentração de esclareol. Elas foram chamadas de CLN-DOX-ESC 0,05 e CLN-DOX-ESC 0,20. A composição das formulações está descrita na **Tabela 4**. O método para a encapsulação da doxorubicina foi o do par iônico. A **Figura 21** representa o racional dessa metodologia. A trietanolamina foi usada como base de escolha para desprotonar a amina da porção glicosídica da doxorubicina, enquanto o ácido oleico foi o ácido graxo de escolha para, em uma reação ácido-base, conjugar-se com o nitrogênio agora livre da amina em questão, aumentando a hidrofobicidade do conjugado.

Figura 21 - Formação do par iônico entre a doxorubicina e o ácido oleico. (A) Formação da doxorubicina base livre e (B) ligação iônica entre a doxorubicina base livre e o ácido oleico.

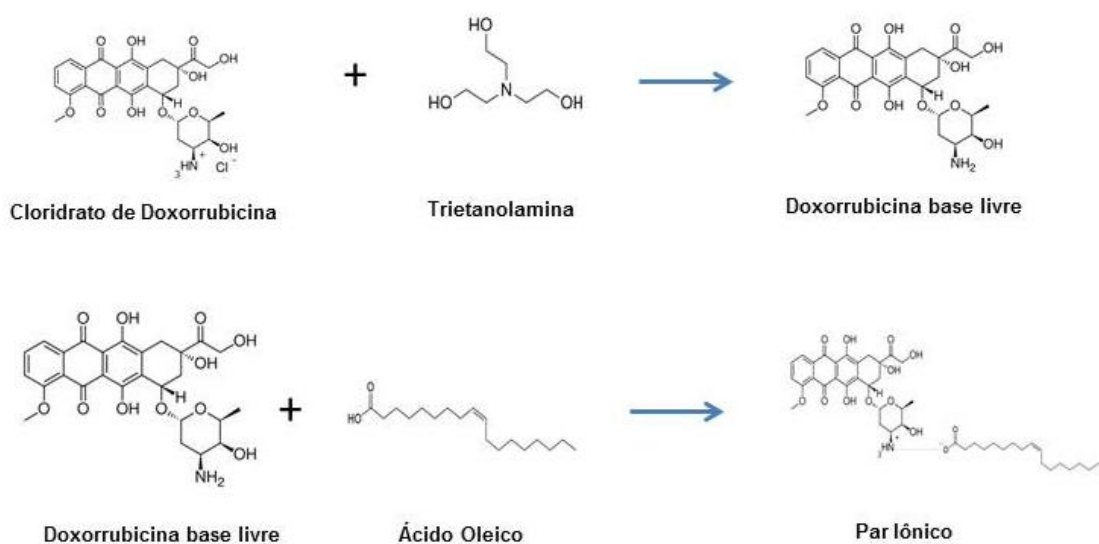


Tabela 4 - Composição dos CLN carreando doxorrubicina e esclareol.

		(%p/v)	(%p/v)
		CLN-DOX- ESC 0,05	CLN-DOX-ESC 0,20
FO	Compritol	1,20	1,20
	Óleo de Amendoim	0,30	0,30
	Tween 80	0,80	0,80
	Trietanolamina	0,06	0,06
	Ácido Oleico	0,10	0,10
	Cloridrato de Doxorrubicina	0,05	0,05
	Esclareol	0,05	0,20
FA	Água ultrapura (q.s.p)	100	100

3.2.2 Caracterização das formulações

3.2.2.1 Diâmetro das partículas

A determinação do diâmetro médio dos CLN foi realizada da mesma maneira apresentada no item 3.2.2.1 do **Capítulo I**.

3.2.2.2 Potencial zeta

A determinação do potencial zeta dos CLN foi realizada da mesma maneira apresentada no item 3.2.2.2 do **Capítulo I**.

3.2.2.3 Microscopia de luz polarizada

A visualização de cristais de esclareol presentes nos CLN foi realizada da mesma maneira apresentada no item 3.2.2.3 do **Capítulo I**.

3.2.2.4 Determinação do teor de encapsulação da doxorubicina

A detecção da doxorubicina foi feita através de análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna de fase reversa (C₈, 250 x 4.6 mm, 5µm) (ACE, Aberdeen, Reino Unido). A fase móvel foi composta por uma mistura de MeOH: tampão fosfato 0,01 M pH 3 (65:35). A detecção da doxorubicina se deu através de um detector de fluorescência com comprimento de onda de emissão a 470 nm e excitação a 555 nm. O fluxo foi de 1,0 mL/minuto e o volume de injeção foi de 20 µL (Módulo de bomba isocrática Waters 515, injetor automático Waters 717 Plus e detector Waters 474; Milford, Estados Unidos).

Para se determinar o Teor de Encapsulação (TE) da doxorubicina nas formulações foi utilizado o método de ultrafiltração descrito a seguir, sendo a EE (%) calculada pela seguinte fórmula (1):

$$\text{TE (\%)} = \frac{(\text{Doxorrubicina total} - \text{Doxorrubicina ultrafiltrada})}{\text{Doxorrubicina total}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Doxorrubicina ultrafiltrada = Corresponde à doxorubicina solúvel em água. A concentração da doxorubicina solúvel foi avaliada após a ultrafiltração realizada com o dispositivo Amicon[®] 10 k (Milipore, Billerica, Estados Unidos) submetido à centrifugação (Heraus Multifuge X1R, Thermo Scientific, Waltham, EUA) a 2400 rpm por 10 minutos. Os dispositivos foram previamente tratados com solução aquosa de Tween[™] 20 para inibir adsorção da doxorubicina. Uma alíquota de 500 µL do ultrafiltrado foi diluída em balão volumétrico de 10 mL com fase móvel, sendo após analisada por CLAE.

Doxorrubicina total = Corresponde à doxorubicina solúvel em água mais aquela encapsulada nos CLN. Para a análise do teor total de doxorubicina, uma alíquota de 200 µL da formulação foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 4 mL de THF ao balão para que houvesse a solubilização dos CLN. Em seguida, o volume do balão foi completado com MeOH. A dispersão obtida foi centrifugada a 2400 rpm por 10 minutos para precipitação da massa lipídica. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi retirada e diluída em fase móvel em um balão volumétrico para um volume de 25 mL. Em seguida, o seu conteúdo foi analisado por CLAE.

Para obtenção da curva analítica de linearidade da doxorubicina, pesou-se 50 mg de cloridrato de doxorubicina em um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado para 50 mL com uma mistura de água/MeOH na proporção de 1:1. Utilizando uma pipeta volumétrica transferiu-se 10 mL da solução 1 mg/mL para um balão volumétrico de 100 mL. O volume foi completado para 100 mL utilizando-se fase móvel, obtendo-se uma solução na concentração de 100 µg/mL. A partir da solução de 100 µg/mL, foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 62,5 ng/mL, 125 ng/mL, 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1000 ng/mL e 2000 ng/mL, diluindo-as também com fase móvel. Cada diluição foi realizada em triplicata.

3.2.2.5 Avaliação da doxorubicina liberada das formulações

A fim de se avaliar a liberação da doxorubicina presente nos nanocarreadores formulados, foi realizado estudo de liberação por diálise. 2 mL dos CLN foram colocados em um saco de diálise (membrana de éster de celulose, diâmetro de 33 mm, cut-off de 14 KDa/Sigma-Aldrich, Steinheim Albuch, Alemanha). Os sacos de diálise foram colocados em frascos contendo 50 mL de tampão PBS 7,4. Esses frascos foram mantidos na temperatura de 37°C e sob agitação magnética. Nos seguintes tempos (1, 2, 4, 8 e 24 horas), 500 µL do meio receptor foi retirado e a concentração de doxorubicina foi determinada por CLAE. Do mesmo modo, solução de cloridrato de doxorubicina na concentração de 0,5 mg/mL foi também submetida ao estudo e teve seu perfil de liberação de doxorubicina construído. A liberação de todos os grupos (CLN-DOX-ESC 0,05, CLN-DOX-ESC 0,20 e solução de cloridrato de doxorubicina 0,5 mg/mL) foi avaliada em triplicata.

3.2.3. Avaliação Biológica dos CLN-Doxorubicina-Esclareol

3.2.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Para se determinar a atividade citotóxica dos CLN carregados com esclareol e doxorubicina, bem como da doxorubicina e do esclareol livres, foi utilizada uma linhagem de câncer de mama humano, MDA MB-231.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o CTB[®] com o mesmo protocolo descrito no item 3.2.3.1 do **Capítulo I**.

Plaqueou-se 5×10^3 células/poço, as quais foram mantidas em estufa (5% de CO₂, a 37 °C) e incubadas por 24 horas. Na sequência, o meio de cultura foi removido e as preparações com diferentes concentrações de doxorubicina (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 µM) foram diluídas diretamente em meio de cultura, e mantidas incubadas por 24 horas em estufa (5% de CO₂, a 37 °C). Considerando que duas razões molares entre doxorubicina: esclareol foram usadas nas formulações (1:1,9 para os CLN-DOX-ESC

0,05 e 1:7,5 para os CLN-DOX-ESC 0,20), as concentrações de esclareol testadas foram 0,47; 0,94; 1,875; 3,75; 7,5; 15,0; 30,0 μM (para a razão molar doxorubicina:esclareol 1:1,9) e 1,875; 3,75; 7,5; 15,0; 30,0; 60,0; 120,0 μM (para a razão molar doxorubicina:esclareol 1:7,5). Da mesma maneira descrita no item 3.2.3.1 do **Capítulo I**, o esclareol foi solubilizado primeiramente em DMSO e depois diluído e meio de cultura. A concentração máxima de DMSO em um poço sempre foi menor que 0,5% v/v.

Decorridas 24 horas, as placas foram lavadas três vezes com PBS 7,4. Após, 40 μL de DMEM completo e 10 μL de CTB foram adicionados em cada poço. As amostras foram mantidas, em média, por duas horas em estufa (5% de CO_2 , a 37 °C). Após o período de incubação, foi feita a leitura das placas pela intensidade da fluorescência, nos seguintes comprimentos de onda: 560 nm para excitação e 590/10 nm para emissão no equipamento Cytation 5 (BioTek, Winooski, Estados Unidos).

3.2.3.2 Avaliação do sinergismo entre a doxorubicina e o esclareol

Os resultados obtidos para os testes de viabilidade celular foram fornecidos ao *software* CompuSyn[®] (CompuSyn Inc., Paramus, Estados Unidos). O *software* calculou o CI (*combination index* ou índice de combinação) entre as moléculas, dando a informação sobre o efeito aditivo, antagônico ou sinérgico entre elas. A **Tabela 5** mostra a relação entre o CI e o sinergismo (ou antagonismo) de uma combinação.

3.2.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm DP. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA. Para diferenças entre as características físico-químicas (tamanho, IP, potencial zeta e teor de encapsulação da doxorubicina) usou-se ANOVA de uma via e para avaliar a diferença entre as curvas de citotoxicidade, usou-se ANOVA de duas vias. Pós-teste t foi usado

para avaliar a diferença entre os pares de grupos. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos.

Tabela 5 - Valores de CI e efeito combinado correspondente.

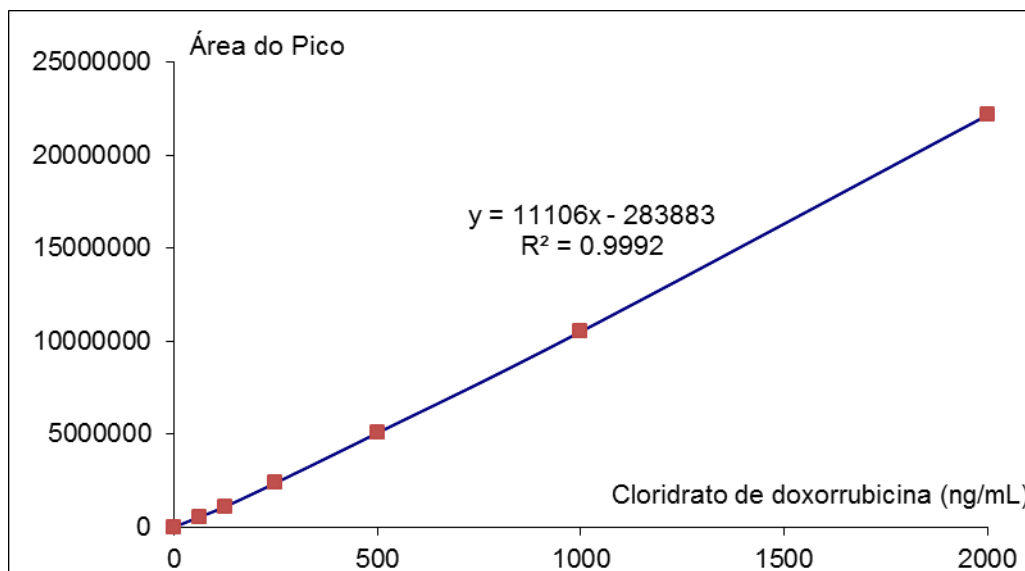
Intervalo do CI	Descrição do Efeito
< 0,1	Sinergismo muito forte
0,1 - 0,3	Forte sinergismo
0,3 – 0,7	Sinergismo
0,7 – 0,85	Sinergismo moderado
0,85 – 0,9	Sinergismo discreto
0,9 – 1,1	Aditivo
1,1 – 1,2	Antagonismo discreto
1,2 – 1,45	Antagonismo moderado
1,45 – 3,3	Antagonismo
3,3 – 10	Forte antagonismo
> 10	Antagonismo muito forte

Adaptado de CHOU, 2006.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química e comparação entre CLN carreando doxorrubicina e diferentes quantidades de esclareol

A curva de calibração para a quantificação de cloridrato de doxorrubicina por CLAE está representada na **Figura 22**. A equação da reta obtida com a análise de regressão linear foi $y = 11106x - 283883$. O coeficiente de correlação linear mostrou-se satisfatório ($r^2 = 0,9992$).

Figura 22 - Curva de linearidade obtida para a doxorrubicina por CLAE.

Foram desenvolvidos CLN contendo doxorrubicina e com duas concentrações de esclareol (0,05 e 0,2% p/v). Os parâmetros físico-químicos encontrados para os carreadores formulados estão descritos na **Tabela 6**. Os CLN com 0,05% p/v de esclareol serão chamados de CLN-DOX-ESC 0,05 e os CLN com 0,2% p/v serão chamados de CLN-DOX-ESC 0,20.

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os parâmetros físico-químicos dos CLN formulados, indicando que a quantidade de esclareol parece não interferir nos parâmetros avaliados. O tamanho médio dos CLN foi apropriado para uma administração endovenosa, o IP foi baixo e virtualmente toda a doxorrubicina foi encapsulada (devido à formação do par iônico entre a doxorrubicina e o ácido oleico).

Tabela 6 - Características físico-químicas de CLN carreando esclareol e doxorubicina

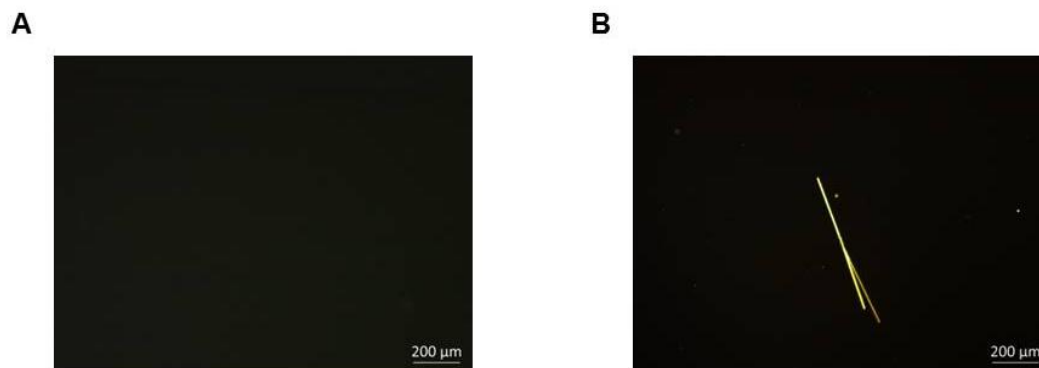
	CLN-DOX- ESC 0,05	CLN-DOX- ESC 0,20
Diâmetro médio (nm)	119 ± 3	123 ± 2
IP	0,24 ± 0,02	0,26 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	-27 ± 10	-19 ± 2
Teor de encapsulação da DOX (%)	99 ± 0	98 ± 1

É descrito que valores de potencial zeta com módulo maior que 30 são ideais para a estabilização eletrotática de nanopartículas (BENITA; LEVY, 1993). No entanto, a estabilização de sistemas coloidais também pode se dar por impedimento estérico (FLORENCE; ATTWOOD, 2006). O TweenTM 80, usado como surfactante nas formulações, apresenta uma cadeia polimérica de óxido de etileno em sua composição, conferindo assim um impedimento estérico aos CLN formulados. Isso dá estabilidade às formulações, mesmo que os valores de potencial zeta encontrados apresentem módulo inferior a 30.

Foi avaliada também a presença de cristais de esclareol em ambas as formulações por microscopia de luz polarizada (**Figura 23**). Visualizou-se a presença de cristais de esclareol nos CLN-DOX-ESC 0,20, não sendo o mesmo visto para os CLN-DOX-ESC 0,05. No **Capítulo I**, os CLN formulados com 0,2% p/v de esclareol não apresentaram cristais de esclareol quando vistos sob o microscópio de luz polarizada. Isso mostra que

a presença da doxorrubicina, interfere na encapsulação do esclareol, favorecendo a sua expulsão dos CLN.

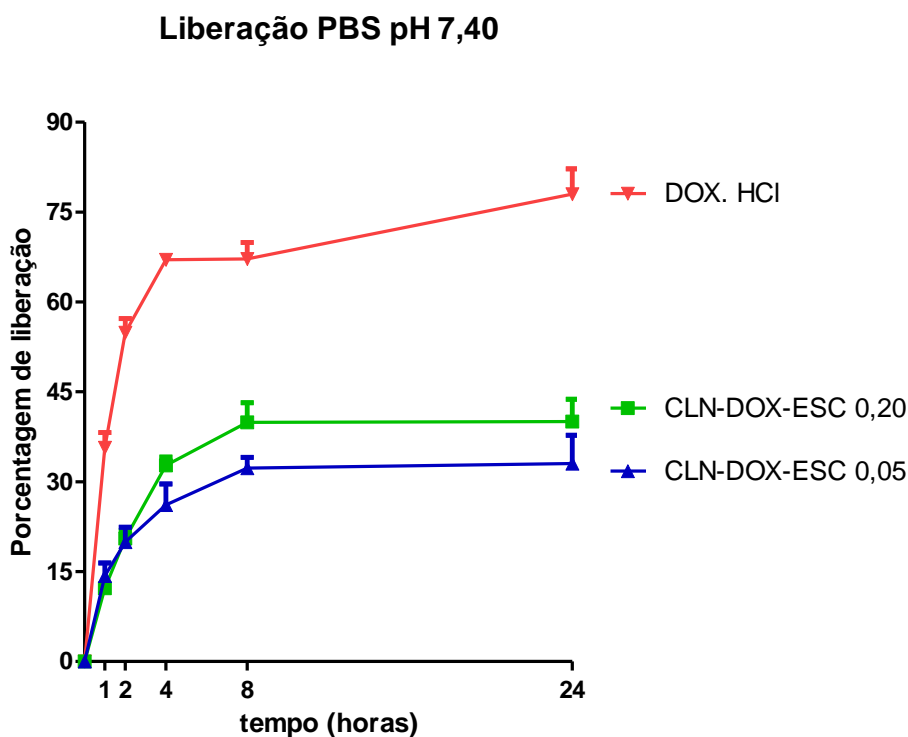
Figura 23 - Microscopia de luz polarizada dos (A) CLN-DOX-ESC 0,05 e dos (B) CLN-DOX-ESC 0,20.



A fim de avaliar como é o comportamento da liberação da doxorrubicina encapsulada em CLN e sua forma livre (cloridrato, DOX. HCl), procedeu-se o estudo de liberação em meio PBS pH 7,40 (**Figura 24**). Em 24 horas, a liberação da doxorrubicina livre, na forma de cloridrato, foi próxima de 80% ($78 \pm 3\%$), quando presente em solução aquosa. Por outro lado, a liberação da doxorrubicina a partir dos CLN foi muito menor do que aquela observada para a forma livre: da ordem de 30% para os CLN-DOX-ESC 0,05 ($33 \pm 5\%$) e da ordem de 40% para os CLN-DOX-ESC 0,20 ($40 \pm 4\%$).

Tais dados sugerem que há uma liberação controlada de doxorrubicina quando encapsulada em CLN. Vários trabalhos da literatura mostram uma liberação menor de um fármaco quando encapsulado em NLS e CLN em comparação com sua forma livre (LV *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SHAO *et al.*, 2015). Isso se dá pelo fato de que quando o fármaco está na sua forma livre, a liberação se dá pelo simples mecanismo de difusão da fração livre no saco de diálise para o meio receptor. Contudo, quando o fármaco está encapsulado, é necessário um mecanismo que o libere da nanoestrutura: erosão, desintegração ou desadsorção (RHAMAN *et al.*, 2014), fazendo com que esse processo seja mais lento do que o visto para a solução do fármaco livre.

Figura 24 - Liberação da doxorubicina na sua forma livre (DOX.HCl) e em CLN em PBS pH 7,40.



Vê-se na **Figura 24**, uma liberação inicial rápida da doxorubicina seguida de um platô, para ambos os CLN. Esse comportamento é bastante característico para a liberação de fármacos a partir de NLS e CLN (SELVAMUTHUKUMAR; VELMURUGAN, 2012). Essa liberação relativamente rápida da doxorubicina no início do estudo pode ser atribuída a fração do fármaco que está presente na superfície externa da nanopartícula (RHAMAN *et al.*, 2014), enquanto que o platô visto subsequentemente refere-se à fração presente no interior da partícula e que tem mais dificuldade de ser liberada.

Mussi e colaboradores (2015) encontraram uma liberação por volta de 40% menor de doxorubicina encapsulada em CLN em comparação com uma solução de cloridrato de doxorubicina e esse achado está em consonância com os dados descritos no presente trabalho. Nesse estudo, o método de encapsulação da doxorubicina também foi o do par iônico, utilizando-se também o ácido oleico como contra-íon de escolha.

Quando se compara os CLN-DOX-ESC 0,05 com os CLN-DOX-ESC 0,20, vê-se que a liberação da doxorubicina foi menor nos CLN com menor concentração de esclareol. Isso se deve, provavelmente, a uma desestruturação da matriz lipídica provocada pela presença do esclareol. Assim, a saída da doxorubicina fica facilitada nos CLN com uma maior quantidade do diterpeno. Como se deseja uma liberação mais controlada da doxorubicina, visando que ela seja entregue somente no sítio tumoral, uma liberação menor de doxorubicina como a vista para os CLN-DOX-ESC 0,05, mostra-se mais vantajosa.

4.2 Avaliação da atividade biológica dos CLN carreando esclareol e doxorubicina

Visando avaliar se a combinação doxorubicina: esclareol tem efeito sinérgico, as duas moléculas foram encapsuladas em CLN como mostrado no item 4.1 desse capítulo. Nessa segunda etapa, a combinação entre as duas moléculas foi avaliada tanto na forma livre, quanto encapsulada em CLN, na linhagem de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-231.

Foram desenvolvidos dois CLN, um como 0,05% p/v de esclareol e outro com 0,20% p/v. A concentração de doxorubicina foi a mesma em ambos, 0,05% p/v. Dessa maneira, a razão p/p de doxorubicina/esclareol nos CLN foi de 1:1 e de 1:4. Quando se passa essa razão p/p para uma razão molar, encontram-se as seguintes razões doxorubicina: esclareol— 1:1,9 e 1:7,5.

Essas duas razões molares foram avaliadas na sua forma livre. Os resultados encontram-se nas **Figuras 25** e **26**. Na **Figura 25**, percebe-se que a combinação doxorubicina: esclareol na razão 1:1,9 gera maior citotoxicidade do que aquela observada para cada fármaco isolado. Na **Figura 26**, contudo, viu-se que a combinação entre os dois fármacos na razão 1:7,5 gerava uma citotoxicidade maior do que aquela observada para a doxorubicina isolada, porém menor do que aquela observada para o esclareol. A fim de calcular os valores de CI para as combinações nessas duas razões, inseriu-se os dados no *software* CompuSyn[®]. O CI pode ser expresso para qualquer

fração de morte celular, tendo um valor diferente para cada um deles. Foi escolhido representar o CI apenas para o Fa_{50} (onde há morte de 50% das células). Os valores encontrados estão descritos na **Tabela 7**. Viu-se que na razão molar doxorubicina: esclareol 1:1,9, o diterpeno e a antraciclina apresentam atividade sinérgica, enquanto que na na razão molar 1:7.5, os dois apresentam atividade antagônica.

Figura 25 - Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol nas suas formas livres isolados ou em combinação na razão molar 1:1,9 em linhagem MDA-MB-231. *** (diferença estatística para os grupos DOX LIVRE e ESC LIVRE). *** = $P < 0,001$.

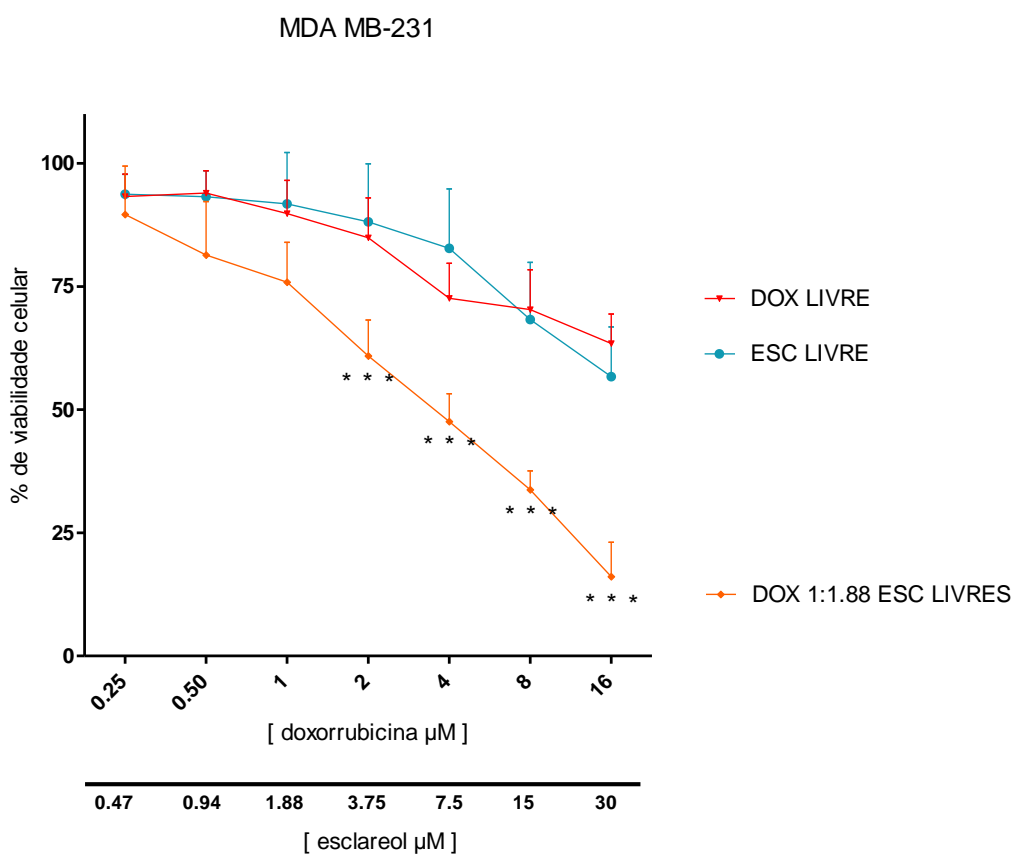
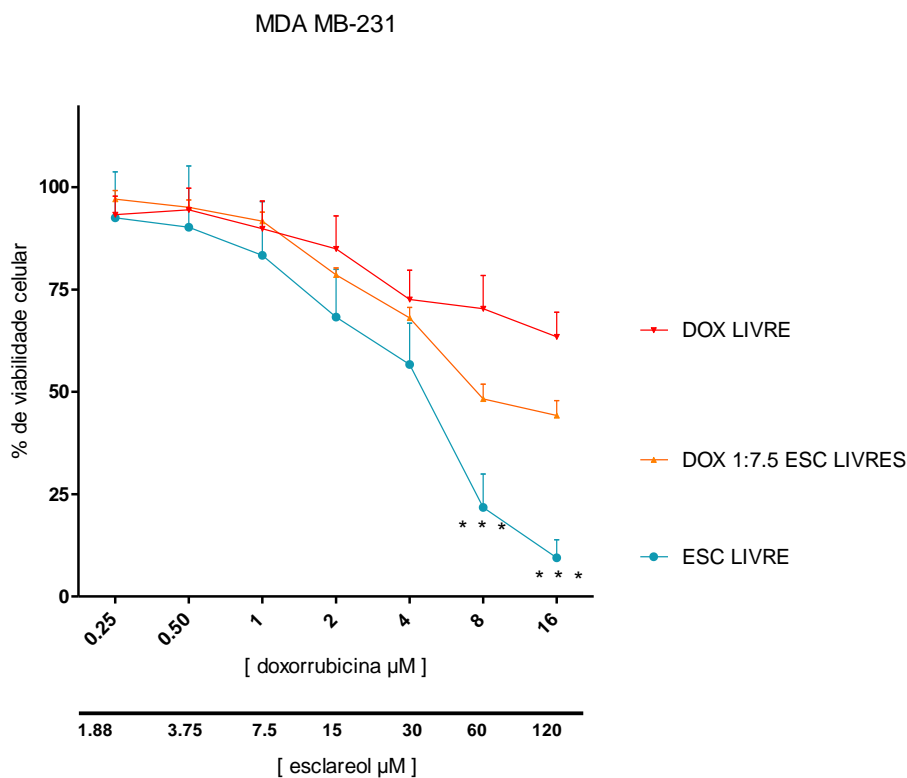


Figura 26 - Citotoxicidade da doxorubicina e do esclarel nas suas formas livres isolados ou em combinação na razão molar 1:7,5 em linhagem MDA-MB-231. * (diferença estatística para os grupos DOX LIVRE e DOX 1:7.5 ESC LIVRES). *** = P< 0,001.**



É importante frisar que nem toda razão entre duas moléculas que apresentam ação citotóxica vai ser sinérgica. Os mecanismos de morte celular de moléculas citotóxicas várias vezes são semelhantes, sendo que certas razões entre as moléculas podem gerar inibição desse mecanismo, enquanto outras os potencializam (CHOU *et al.*, 2006).

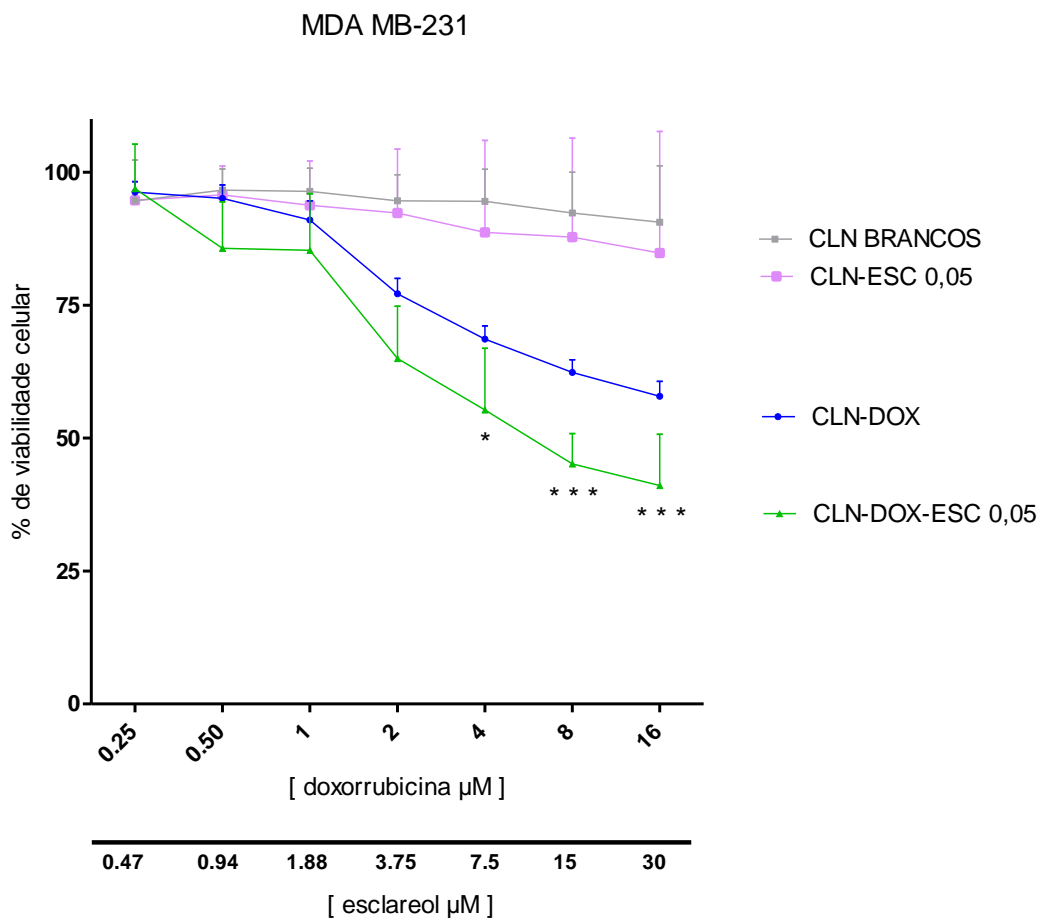
Um interessante exemplo é o do trabalho de Rai e colaboradores (2016). Nele, testam-se diferentes razões molares entre a doxorubicina e o resveratrol em células da linhagem MDA-MB-231. Com pequenas mudanças na razão entre as duas moléculas, variou-se o valor de CI de 0,49 até 1,27. Isso mostra que mais do que combinar duas moléculas com mesma atividade terapêutica, deve-se ater as quais proporções, a combinação gera ganho de atividade.

Tabela 7 - IC₅₀ do esclareol e da doxorubicina nas suas formas livres e o CI entre eles nas duas razões avaliadas em linhagem MDA-MB-231. Entre parênteses a contribuição de cada uma das moléculas para o valor de IC₅₀ é mostrada.

	IC ₅₀	CI (Fa ₅₀)
DOX	34 ± 8 µM	_____
ESC	28 ± 2 µM	_____
DOX/ESC 1:1,9	9,6 ± 1,3 µM (3,3 µM DOX + 6,3 µM ESC)	0,35
DOX/ESC 1:7,5	83 ± 6 µM (10 µM DOX + 73 µM ESC)	3,11

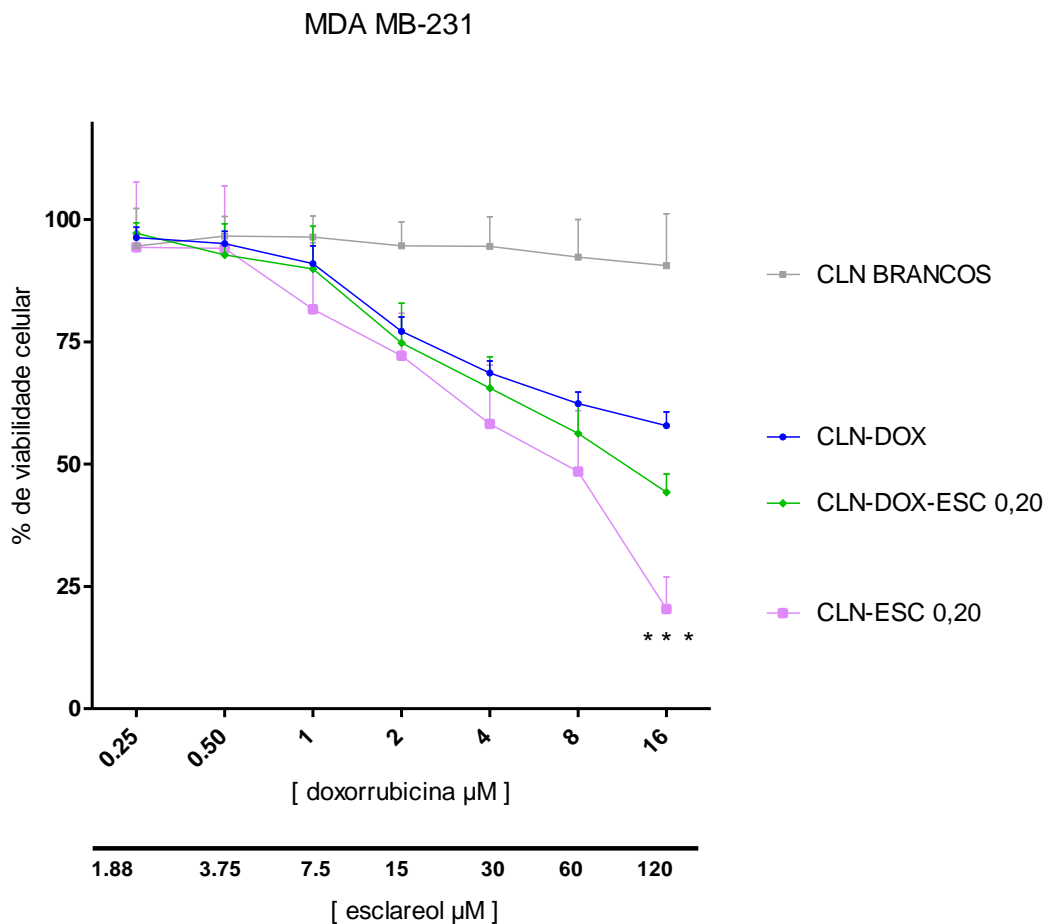
Faz-se necessário, contudo, avaliar se o comportamento visto para as moléculas livres se mantém quando estas estão encapsuladas em CLN. A **Figura 27** mostra a atividade citotóxica para os CLN brancos, CLN contendo apenas doxorubicina (CLN-DOX), CLN contendo apenas esclareol a 0,05% p/v (CLN-ESC 0,05) e CLN co-encapsulando doxorubicina + esclareol (CLN-DOX-ESC 0,05). A **Figura 28** mostra a citotoxicidade dos CLN contendo apenas esclareol a 0,2% p/v (CLN-ESC 0,20) e CLN co-encapsulando doxorubicina + esclareol (CLN-DOX-ESC 0,20), além dos respectivos controles (CLN brancos e CLN contendo apenas doxorubicina).

Figura 27 - Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol encapsulados em CLN (CLN-ESC 0,05; CLN-DOX; CLN-DOX-ESC 0,05) em linhagem MDA-MB-231. *, *** (diferença estatística para o grupo CLN-DOX). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.



Da mesma maneira que se viu para as moléculas livres, encontra-se o mesmo comportamento para os CLN em relação ao sinergismo/antagonismo da combinação. Na razão molar doxorubicina: esclareol 1:1,9, a citotoxicidade induzida pelos CLN-DOX-ESC 0,05 foi significativamente maior do que aquela observada para os CLN-ESC 0,05 e os CLN-DOX (**Figura 27**). Em contraste, na razão molar doxorubicina: esclareol 1:7,5, a citotoxicidade induzida pelos CLN-DOX-ESC 0,20 foi significativamente menor do que aquela observada para os CLN-ESC 0,20 mostrando vantagem somente quando comparada com os CLN-DOX (**Figura 28**).

Figura 28 - Citotoxicidade da doxorubicina e do esclareol encapsulados em CLN (CLN-ESC 0,20; CLN-DOX; CLN-DOX-ESC 0,20), em linhagem MDA-MB-231. *** (diferença estatística para os grupos CLN-DOX e CLN-DOX-ESC 0,20). *** = $P < 0,001$.



A **Tabela 8** mostra os valores de IC_{50} para os CLN contendo doxorubicina e esclareol e os respectivos CI. O valor de IC_{50} para os CLN-DOX-ESC 0,05 ($20 \pm 4 \mu\text{M}$) foi significativamente menor do que aquele observado para os CLN-DOX-ESC 0,2 ($91 \pm 14 \mu\text{M}$). Percebe-se que quando a combinação doxorubicina: esclareol está encapsulada em CLN, ela se apresenta menos citotóxica do que a combinação livre e isto para ambas as razões molares. Para a razão molar 1:1,9, os valores do IC_{50} para a combinação livre e para os CLN-DOX-ESC 0,05 foram de $9,6 \pm 1,3 \mu\text{M}$ e $20 \pm 4 \mu\text{M}$, respectivamente. Quando se analisa a razão molar 1:7,5, os valores do IC_{50} para a combinação livre e para os CLN-DOX-ESC 0,2 foram de $83 \pm 6 \mu\text{M}$ e $91 \pm 14 \mu\text{M}$,

respectivamente. Essa menor citotoxicidade interfere também nos valores calculados de CI.

Tabela 8 - IC₅₀ dos CLN carreando o esclareol e a doxorrubicina e os respectivos CI nas duas razões avaliadas em linhagem MDA-MB-231. Entre parênteses a contribuição de cada uma das moléculas para o valor de IC₅₀ é mostrada.

Formulações	IC ₅₀	CI (Fa ₅₀)
CLN DOX-ESC 0,05	20 ± 4 µM	0,73
Razão 1:1,9	(7 µM DOX + 13 µM ESC)	
CLN DOX-ESC 0,20	91 ± 14 µM	3,45
Razão 1:7,5	(11 µM DOX + 80 µM ESC)	

Para a razão molar 1:1,9, os valores de CI da combinação livre e para os CLN-DOX-ESC 0,05 foram de 0,35 (sinergismo) e 0,73 (sinergismo moderado), respectivamente. Quando se analisa a razão molar 1:7,5, o CI da combinação livre foi de 3,11, enquanto que para os CLN-DOX-ESC 0,20, o CI encontrado foi de 3,45. Com valores diferentes de CI, a descrição do efeito se alterou para as duas razões avaliadas: CLN-DOX-ESC 0,05 demonstraram um sinergismo moderado entre o esclareol e a doxorrubicina, enquanto que os CLN-DOX-ESC 0,20 demonstraram um forte antagonismo entre as moléculas.

A razão para a menor citotoxicidade e, portanto, de uma maior CI para os CLN do que para a combinação livre, provavelmente é a menor atividade do esclareol quando encapsulado, como mostrado no **Capítulo I**.

Além disso, no tocante à possível redução dos efeitos toxicológicos da doxorrubicina, deve-se notar a redução da concentração de fármaco necessária para gerar 50% de morte celular quando este está em CLN. O IC₅₀ para a doxorrubicina livre foi de 34 µM,

enquanto que para os CLN formulados, esse valor foi menor. Para os IC_{50} dos CLN-DOX-ESC 0,05 e dos CLN-DOX-ESC 0,20, os valores de IC_{50} referentes à doxorubicina foram, respectivamente, 7 μM e 11 μM . Isso gera um Índice de Redução de Dose (IRD) para a doxorubicina. Ou seja, com uma menor concentração do fármaco gera-se o mesmo efeito farmacológico desejado. A **Tabela 9** mostra em quantas vezes a quantidade de doxorubicina necessária para levar a 50% da morte celular é diminuída quando ela está encapsulada em CLN contendo doxorubicina e esclareol.

Tabela 9 - Índice de Redução de Dose necessária para 50% de morte celular em células MDA-MB-231 para a doxorubicina quando encapsulada em CLN-DOX-ESC 0,05 e CLN-DOX-ESC 0,20.

Formulações	IC_{50}	IRD (DOX)
DOX livre	34 \pm 8 μM	
CLN DOX-ESC 0,05 Razão 1:1,9	20 \pm 4 μM (7 μM DOX + 13 μM ESC)	4,9
CLN DOX-ESC 0,20 Razão 1:7,5	91 \pm 14 μM (11 μM DOX + 80 μM ESC)	3,1

Deste modo, percebe-se um valor de IRD para a doxorubicina de cinco vezes para os CLN-DOX-ESC 0,05 e de três vezes para os CLN-DOX-ESC 0,20. Assim, uma menor concentração de doxorubicina é necessária para se levar ao mesmo efeito citotóxico. Vistos os efeitos toxicológicos do fármaco, em especial os cardiotóxicos, essa redução de dose pode gerar importantes benefícios.

Dessa forma, mesmo que os CLN encapsulando doxorubicina e esclareol apresentem menor atividade citotóxica do que as combinações livres, deve-se considerar que eles

promovem a redução da quantidade de doxorubicina necessária para um mesmo efeito citotóxico. Além disso, os CLN-DOX-ESC 0,05 apresentam sinergismo entre as duas moléculas, sendo, portanto, nanocarreadores promissores para posteriores estudos *in vivo*.

5 CONCLUSÕES

Buscou-se nesse **Capítulo II**, o desenvolvimento de um nanocarreador que co-encapsulando a doxorubicina e o esclareol e que proporcionasse um efeito sinérgico entre o fármaco e o diterpeno. Viu-se que os CLN-DOX-ESC 0,05 proporcionavam uma melhor encapsulação do esclareol e um melhor controle da liberação da doxorubicina em comparação com os CLN-DOX-ESC 0,20. Ademais, viu-se que os CLN-DOX-ESC 0,05 demonstraram efeito sinérgico entre a doxorubicina e o esclareol em linhagem MDA-MB-231, enquanto que os CLN-DOX-ESC 0,20 apresentavam antagonismo no que tange à atividade citotóxica das moléculas.

Não obstante a combinação encapsulada ser menos citotóxica do que a livre nas condições avaliadas, os CLN-DOX-ESC 0,05 mostram-se promissores para futuros estudos, já que mantêm o sinergismo entre as moléculas avaliadas. Além disso, apresentam potencial para diminuir as reações adversas induzidas pela doxorubicina, conforme dados bem conhecidos para outros nanocarreadores contendo esta antraciclina, bem como viabilizam a administração *in vivo* do esclareol, molécula de baixa solubilidade aquosa.

CONCLUSÕES GERAIS

Apesar das interessantes propriedades farmacológicas contra linhagens de câncer *in vitro*, o esclareol apresenta dificuldades de ser administrado *in vivo* devido à sua hidrofobicidade. Dessa maneira, o trabalho buscou desenvolver nanocarreadores que permitissem a sua administração, além de averiguar se o esclareol tem a capacidade de aumentar o efeito anticâncer do fármaco antitumoral, doxorrubicina.

Foi possível desenvolver CLN contendo esclareol, o que permitiria sua administração *in vivo*. Contudo, viu-se que a ação citotóxica do diterpeno é reduzida quando encapsulada. Ademais, viu-se um diferente padrão de parada no ciclo celular para células HCT-116, quando o esclareol está encapsulado, o que pode ser uma das explicações para a reduzida citotoxicidade.

O esclareol potencializou as ações da doxorrubicina na linhagem MDA-MB-231 quando na razão molar 1:1,9 (doxorrubicina:esclareol). Embora a encapsulação das moléculas em CLN tenha diminuído a ação citotóxica em comparação com a combinação dos fármacos livres, o sinergismo foi mantido.

Assim, o trabalho apresenta uma nova forma de permitir a veiculação do esclareol, além de demonstrar que ele pode ser um potencializador do antineoplásico doxorrubicina.

Ficam como perspectivas para o trabalho:

- o desenvolvimento de estratégias para aumentar o efeito do esclareol, quando encapsulado, através da adição nas formulações de moléculas que tenham *target ativo* pelos sítios mitocondriais, como derivados do trifenilfosfônio. Além disso, em estudos de Alakohova e colaboradores (2010) e Sahay e colaboradores (2010), micelas constituídas de Pluronic[®] 85 mostraram uma acumulação preferencial nas mitocôndrias, nas células avaliadas. Os copolímeros Pluronic[®] são um dos surfactantes mais usados para o preparo de CLN. Assim, uma possibilidade de direcionar os nanocarreadores

formulados para as mitocôndrias, poderia ser a inserção do Pluronic[®] como surfactante nas formulações. Por último, o aumento do tempo de incubação dos CLN nos estudos de citotoxicidade pode aumentar sua ação citotóxica frente ao esclareol livre;

- uma melhor caracterização físico-química dos sistemas, com a realização de testes como calorimetria exploratória diferencial e análises de espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier para se entender melhor a interação entre os diferentes componentes das nanoestruturas;

- estudos de mecanismos de morte celular dos CLN-Esclareol, especialmente os de apoptose, necrose e autofagia, a fim de se averiguar se quando encapsulado em CLN, o diterpeno tem um diferente mecanismo de morte celular;

- por fim, avaliações *in vivo* dos CLN formulados em modelos de câncer experimental, a fim de se avaliar a atividade antitumoral deles.

REFERÊNCIAS

- ALAKHOVA, D. Y. et al. Differential Metabolic Responses to Pluronic in MDR and non-MDR cells: a Novel Pathway for Chemosensitization of Drug Resistant Cancers. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 89-100, 2010.
- ALEX AJI, M. R.; CHACKO, A. J.; JOSE, S.; SOUTO, E. B. Lopinavir Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Intestinal Lymphatic Targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42(1-2), p. 11-18, 2011.
- ÁLVAREZ-CEDRÓN, L.; SAYALERO, M. L.; LANA O, J. M. High-performance Liquid Chromatographic Validated Assay of Doxorubicin in Rat Plasma and Tissues. **Journal of Chromatography B**, v. 721, p. 271-278, 1999.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2015. **Atlanta: American Cancer Society**, 56 p., 2015.
- ARMAROLIA, P. V. et al. European Code against Cancer, 4th Edition: Cancer screening. **Cancer Epidemiology**, 39S, p. S139-152, 2015.
- ATASANOV, A. G. et al. Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant Derived Natural Products: A Review. **Biotechnology Advances**, v. 33(8), p. 1582-1614, 2015
- BARBOSA, I. R.; de SOUZA, D. L. B.; BERNAL, M. M.; COSTA, I. C. C. Cancer Mortality in Brazil. **Medicine**, v. 94(16), p. 1-6, 2015.
- BARENHOLZ, Y. Doxil[®]- the First FDA-approved Nano-drug: Lessons Learned. **Journal of Controlled Release**, v. 160(2), p. 117-134, 2012.
- BELOQUI, A.; SOLINÍS, M. A.; DELGADO, A.; RODRÍGUEZ-GASCÓN, A.; ALMEIDA, A. J.; PRÉAT, V. Nanostructured Lipid Carriers: Promising Drug Delivery Systems for Future Clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, p. 143-161, 2016.
- BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82 (11), p. 1069-1079, 1993.
- BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKZAD, O. M. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 66, p. 2-25, 2014.
- BHANDARI, R.; KAUR, I. P. Pharmacokinetics, Tissue Distribution and Relative Bioavailability of Isoniazid-Solid Lipid Nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, p. 202-212, 2013.

BONDÌ, M. L. et al. Entrapment of an EGFR inhibitor into nanostructured lipid carriers (NLC) improves its antitumor activity against human hepatocarcinoma cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12(21), p. 1-9, 2014.

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

CARNEIRO, G. Desenvolvimento de Nanocarreadores Lipídicos Contendo Ácido Retinóico para o Tratamento de Câncer. 119 p., Tese de Doutorado, **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2013.

CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3267-3285, 2009.

CROCE, C. M. Oncogenes and Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 385(5), p. 502-511, 2008.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G.; Chemotherapy and the War on Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 65-72, 2005.

CHAMPOUX, J. J. DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHEN, H. et al. pH-Responsive Therapeutic Solid Lipid Nanoparticles for Reducing P-Glycoprotein-Mediated Drug Efflux of Multidrug Resistant Cancer Cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10(1), p. 5035-5048, 2015.

CHINO, I. Labdanes of Natural Origin-Biological Activities (1981-2004). **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1295-1317, 2005.

CHOU, T. C. Theoretical Basis, Experimental Design and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58(3), p. 621-681, 2006.

DARZYNKIEWICZ, Z.; HALICKA, H. D.; ZHAO, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow and Laser Scanning Cytometry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 676, p. 137-147, 2010.

DATTA, A. et al. Selective Targeting of FAK-Pyk2 Axis by Alpha-naphthoflavone Abrogates Doxorubicin Resistance in Breast Cancer Cells. **Cancer Letters**, v. 362(1), p. 25-35, 2015.

DIMAS, K. et al. The Effect of Sclareol on Growth and Cell Cycle Progression of Human Leukemic Cell Lines. **Leukemia Research**, v. 23(3), p. 217-234, 1999.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C.; VAOS, V.; IONNIDIS, P.; TRANGAS, T. Labdene Type Diterpenes Down-regulate the Expression of *c-myc* Protein, but not of *bcl-2* in Human

Leukemia T-cells Undergoing Apoptosis. **Leukemia Research**, v. 25(6), p. 449-454, 2001.

DIMAS, K. et al. Labd-14-ene-8,13-diol (Sclareol) Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer and Enhances the Activity of Anticancer Drugs. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60(3), p. 127-133, 2006.

DIMAS, K. et al. Sclareol Induces Apoptosis in Human HCT116 Colon Cancer Cells *in vitro* and Suppression of HCT116 Tumor Growth in Immunodeficient Mice. **Apoptosis**, v. 12(4), p. 685-694, 2007.

DOKTOROVOVA, S.; SOUTO, E. B.; SILVA, A. M. Nanotoxicology Applied to Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers- A Systematic Review of *in vitro* Data. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 87, p. 1-18, 2014.

FANG, J.; NAKAMURA, H.; MAEDA, H. The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved and Limitations and Augmentation of the Effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63(3), p. 136-151, 2011.

FANG, C.; AL-SUWAYEHB, S. A.; H.; FANG, J. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Drug Delivery and Targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7(1), p. 41-55, 2013.

FILIPPI-CHIELA, E. C.; VILLODRE, E. S.; ZAMIN, L. L.; LENZ, G. Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. **PLoS One**, v. 6(6), p. 1-23, 2011.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. S. Physicochemical Principles of Pharmacy. **Springer**, 4^a Edição, 491 p., 2006.

GARNIS, C.; BUYS, T. P. H.; LAM, W. L. Genetic Alteration and Gene Expression Modulation During Cancer Progression. **Molecular Cancer**, v. 3(9), p. 1-23, 2004.

GOLDMANN, E. The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with Special Reference to the Vascular System. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 1, p.1-13, 1908.

GOŁUŃSKI, G. et al. Pentoxifylline as a Modulator of Anticancer Drug Doxorubicin. Part II: Reduction of Doxorubicin DNA Binding and Alleviation of its Biological Effects. **Biochimie**, v. 123, p. 95-102, 2016.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for Making Human Tumor Cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 347(20), p. 1593-1603, 2002.

HAN, B.; LEE, M. Paclitaxel-Induced G2/M Arrest via Different Mechanism of Actions in Glioma Cell Lines with Differing p53 Mutational Status. **International Journal of Pharmacology**, v. 12(1), p. 19-27, 2016.

HAN, Y. et al. Transferrin-Modified Nanostructured Lipid Carriers as Multifunctional Nanomedicine for Codelivery of DNA and Doxorubicin. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 4107-4116, 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v.144(5), p. 646-674, 2011.

HANDE, K. R. Topoisomerase II Inhibitors. **Update on Cancer Therapeutics**, v. 3(1), p. 13-26, 2008.

HATZIANTONIOU, S.; DIMAS, K.; GEORGOPOULOS, A.; SOTIRIADOU, N.; DEMETZOS, C. Cytotoxic and Antitumor Activity of Liposome-incorporated Sclareol Against Cancer Cell Lines and Human Colon Cancer Xenografts. **Pharmacological Research**, v. 53(1), p. 80-87, 2006.

HERCEG, Z. et al. Towards Incorporating Epigenetic Mechanisms into Carcinogen Identification and Evaluation. **Carcinogenesis**, v. 34(9), p. 1955-1967, 2013.

HU, C. J.; ZHANG, L. Nanoparticle-based Combination Therapy Toward Overcoming Drug Resistance in Cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 83(8), p. 1104-1111, 2012.

ICHIKAWA, Y. et al. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124(2), p. 617-630, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. **INCA**, 122 p., 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Biennial Report, **IARC**, 174 p., 2013.

JONES, R. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, v. 44 (1), p. 25-29, 2015.

JUNG, M.; KO, I.; LEE, S.; CHOI, S. J.; YOUN, B. H.; KIM, S. K. A Concise Synthesis and *in vitro* Cytotoxicity of New Labdane Diterpenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8(23), p. 3295-3298, 1998.

KANG, K. W. et al. Doxorubicin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Overcome Multidrug Resistance in Cancer Therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6(2), p. 210-213, 2010.

KHAZEI, S.; SALEHINIYA, H.; MOHAMMADIAN-HAFSHE-JANI, A. Some Facts About Cancer in the World Using Registered Cancer in 2012. **Iranian Journal of Public Health**, 44(11), p. 1555-1560, 2015.

KIEVIT, F. M. et al. Doxorubicin Loaded Iron Oxide Nanoparticles Overcome Multidrug Resistance in Cancer *in vitro*. **Journal of Controlled Release**, 152(1), p. 76-83, 2011.

KUZMA, L.; SKRZYPEK, Z.; WYSOKINSKA, H. Diterpenoids and Triterpenoids in Hairy Roots of *Salvia sclarea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 171-179, 2006.

LAMBERT, L. A. et al. Autophagy: a Novel Mechanism of Synergistic Cytotoxicity Between Doxorubicin and Roscovitine in Sarcoma Model. **Cancer Research**, 68(19), p. 7966-7974, 2008.

LI, L. et al. Synthesis, in vitro and in vivo Antitumor activity of Scopoletin-cinnamic acid Hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 26, p. 300-307, 2015.

LI, J. et al. A Review on Phospholipids and their Main Applications in Drug Delivery Systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10(2), p. 81-98, 2015.

LIND, M. J. Principles of Systemic Anticancer Therapy. **Medicine**, v. 44(1), p. 20-24, 2015.

LV, W. et al. Brucea Javanic Oil-loaded Nanostructured Lipid Carriers (BJO NLCs): Preparation, Characterization and in vitro Evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 504, p. 312-319, 2016.

MA, P. et al. Development of Idarubicin and Doxorubicin Solid lipid Nanoparticles to Overcome Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Leukemia. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5(2), p. 151-161, 2009.

MAEDA, H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond. **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 138-144, 2012.

MAHAIRA, L. G. et al. The Labdane Diterpene Sclareol (labd-14-ene-8, 13-diol) Induces Apoptosis in Human Tumor Cell Lines and Suppression of tumor Growth *in vivo* via a p53-independent Mechanism of Action. **European Journal of Pharmacology**, v. 666, p. 173-182, 2011.

MAHÉO, K. et al. Differential Sensitization of Cancer Cells to Doxorubicin by DHA: a Role for Lipoperoxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39(6), p. 742-751, 2005.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H., A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. **Cancer Research**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Applications. **Advanced Drug delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MISHRA, B.; PATEL, B. B.; TIWARI, S. Colloidal Nanocarriers: a Review on Formulation Technology, Types and Applications toward Targeted Drug Delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6(1), p. 9-24, 2010.

MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery- a Review of the State of Art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50(1), p. 161-177, 2000.

MUSSI, S. V.; SILVA, R. C.; OLIVEIRA, M. C.; LUCCI, C. M.; AZEVEDO, R. B.; FERREIRA, L. A. M. New Approach to Improve Encapsulation and Antitumor Activity of Doxorubicin Loaded in Solid Lipid Nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48 (1-2), p. 282-290, 2013.

MUSSI, S. V. et al. Novel Nanostructured Lipid Carrier Co-loaded with Doxorubicin and Docosahexaenoic Acid Demonstrates Enhanced *in vitro* and Overcomes Drug Resistance in MCF-7/Adr Cells. **Pharmaceutical Research**, v. 31, p. 1882-1892, 2014.

MUSSI, S. V. et al. Improved Pharmacokinetics and Enhanced Tumor Growth Inhibition Using a Nanostructured Lipid Carrier Loaded with Doxorubicin and Modified With a Layer-by-Layer Polyelectrolyte Coating. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, p. 186-193, 2015.

NAM, C.; DOI, K.; NAKAYAMA, H. Etoposide Induces G2/M Arrest and Apoptosis in Neural Progenitor Cells via DNA Damage and an ATM/p53- Related Pathway. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 485-493, 2010.

NDOLO, R. A.; JACOBS, D. T.; FORREST, M. L.; KRISE, J. P. Intracellular Distribution-based Anticancer Drug Targeting: Exploiting a Lysosomal Acidification Defect Associated with Cancer Cells. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 2(4), p. 131-136, 2010.

NITISS, J. L. Targeting DNA Topoisomerase II in Cancer Chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, p. 338-350, 2009.

NOORI, D.; HASSAN, Z. M.; MOHAMMADI, M.; HABIBI, Z.; SOHRABI, N; BAYANOLHAGH, S. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo. **Cellular Immunology**, v. 263, p. 148-153, 2010.

NORAT, T. et al. European Code against Cancer 4th Edition: Diet and cancer. **Cancer Epidemiology**, 39S, p. S56-66, 2015

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; CRIJNS, H. J.; MOENS, A. L. Doxorubicin-induced Cardiomyopathy: from Molecular Mechanisms to Therapeutic Strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52(6), p. 1213-1225, 2012.

OLIVEIRA, M. S. et al. α -Tocopherol Succinate Improves Encapsulation and Anticancer Activity of Doxorubicin Loaded in Solid Lipid Nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 246-253, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Fact Sheet nº 197. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em 01/02/2017.

PAN, Y.; TIKEKAR, R. V.; NITIN, N. Distribution of a Model Bioactive Within Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers Influences its Loading Efficiency and Oxidative Stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511(1), p. 322-330, 2016.

PANZARINI, E.; INGUSCIO, V.; TENUZZO, B. A.; CARATA, E.; DINI, L. Nanomaterials and Autophagy: New Insights in Cancer Treatment. **Cancers**, v. 5, p. 296-319, 2013.

PARADISSIS, A.; HATZIANTONIOU, S.; GEORGOPOULOS, A.; PSARRA, A. G.; DIMAS, K.; DEMETZOS, C. Liposomes Modify the Subcellular Distribution of Sclareol Uptake by HCT-116 Cancer Cell Lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 61, p. 120-124, 2007.

PARADISSIS, A.; HATZIANTONIOU, S.; GEORGOPOULOS, A.; DIMAS, K.; DEMETZOS, C. Uptake Studies of Free and Liposomal Sclareol by MCF-7 and H-460 Human Cancer Cell Lines. **Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications**, Springer, p. 125-133, 2007.

PATEL, N. R. et al. Mitochondria-Targeted Liposomes Improve the Apoptotic and Cytotoxic Action of Sclareol. **Journal of Liposome Research**, v. 20(3), p. 244-249, 2010.

PATEL, M. N. et al. Characterization and Evaluation of 5-Fluoruracil-loaded Solid Lipid Nanoparticles Prepared via a Temperature-modulated Solidification Technique. **AAPS PharmSciTech**, v. 15(6), p. 1498-1508, 2014

PERCHE, F.; TORCHILIN, V. P. Cancer Cell Spheroids as a Model to Evaluate Chemotherapy Protocols. **Cancer Biology and Therapy**, v. 13(12), p. 1205-1213, 2012

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.

PRIMEAU, A. J.; RENDON, A.; HEDLEY, D.; LILGE, L.; TANNOCK, I. F. The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 8782-8788, 2005.

RADTKE, M.; MÜLLER, R. H. NLC™: Nanostructured Lipid Carriers: the New Generation of Lipid Drug Nanocarriers. **New Drugs**, v. 2, p. 48-52, 2001.

RAHMAN, H. S. et al. Zerumbone-loaded Nanostructured Lipid Carrier G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis via Mitochondrial Pathway in a Human Lymphoblastic Leukemia Cell Line. **International Journal of Nanotechnology**, v. 9, p. 527-538, 2014.

RAI, G.; MISHRAA, S.; SUMANA, S.; SHUKLAA, Y. Resveratrol Improves the Anticancer Effects of Doxorubicin *in vitro* and *in vivo* Models: a Mechanistic Insight. **Phytomedicine**, v. 23, p. 233-242, 2016.

REHMAN, S. et al. Design and Synthesis of Antitumor Heck-Coupled Sclareol Analogues: Modulation of BH3 Family Members by SS-12 in Autophagy and Apoptotic Cell Death. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58(8), p. 3432-3444, 2015.

SAHAY, G.; GAUTAM, V.; LUXENHOFER, R.; KABANOV, A. V. The utilization of Pathogen-like Cellular Trafficking by Single Chain Block Copolymer. **Biomaterials**, v. 31, p. 1757-1764, 2010.

SCROEDER, A. et al. Treating Metastatic Cancer with Nanotechnology. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 39-50, 2012.

SCHÜZ, J. European Code against Cancer 4th Edition: 12 ways to reduce your cancer risk. **Cancer Epidemiology**, 39S, p. S1-10, 2015.

SEYNHAEVE, A. L. B.; DICHEVA, B. M.; HOVING, S.; KONING, G. A.; HAGEN, T. L. M. Intact Doxil is Taken up Intracellularly and Released Doxorubicin Sequesters in the Lysosome: Evaluated by *in vitro/in vivo* Live Cell Imaging. **Journal of Controlled Release**, v. 172(1), p. 330-340, 2013.

SHAO, Z. et al. Targeted Lung Cancer Therapy: Preparation and Optimization of Transferrin-Decorated Nanostructured Lipid Carriers as Novel Nanomedicine for Co-delivery of Anticancer Drugs and DNA. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1223-1233, 2015.

SHI, F.; YANG, G.; REN, J.; GUO, T.; DU, Y.; FENG, N. Formulation Design, Preparation, and *in vitro* and *in vivo* Characterizations of β -elemene- Loaded Nanostructured Lipid Carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2533-2541, 2013.

SIMUNEK, T.; STIRBA, M.; POPELOVÁ, O.; ADAMCOVÁ, M.; HRDINA, R.; GERSL, V. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Overview of Studies Examining the Roles of Oxidative Stress and Free Cellular Iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, p. 154-171, 2009.

STEWARD, B. W.; WILD, C. P. World Cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer**, 630 p., 2014

STYLIANOPOULOS, T.; JAIN, R. K. Design Considerations for Nanotherapeutics in Oncology. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11(8), p. 1893-1907, 2015.

SELVAMUTHKUMAR, S.; VELMURUGA, R. Nanostructured Lipid Carriers: A Potential Drug Carrier for Cancer Chemotherapy. **Lipids in Health and Disease**, v. 11 (159), 2012.

SILVA, P. Farmacologia. **Guanabara Koogan**, Oitava Edição, 1352 p., 2010.

TACAR, O.; SRIAMORNSAKB, P.; DASSA, C. R. Doxorubicin: an Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, p. 157-170, 2012.

TAURIN, S.; NEHOFF, H.; GREISH, K. Anticancer Nanomedicine and Tumor Vascular Permeability: Where is the Missing link? **Journal of Controlled Release**, v. 164, p. 265-275, 2012.

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D.; LIU, L. F. Adriamycin-Induced DNA Damage Mediated by Mammalian DNA Topoisomerase II. **Science**, v. 226, p. 466-468, 1984.

THORN, C. F. et al. Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 21(7), p. 440-446, 2011.

TRÉDAN, O.; GALMARINI, C. M.; PATEL, K.; TANNOCK, I. F. Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, p. 1441-1454, 2007.

UNER, M.; YENER, G. Importance of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) in Various Administration Routes and Future Perspectives. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2(3), p. 289-300, 2007.

URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VIÑALS, F.; CAPELLÁ, G. Recent Advances in Cancer Therapy: an Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 3-10, 2010.

VOLAND, C. et al. Repression of Cell Cycle-Related Proteins by Oxaliplatin but not Cisplatin in Human Colon Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5(9), p. 2149-2157, 2006.

WANG, J. et al. Physicochemical Characterization, Photo-stability and Cytotoxicity of Coenzyme Q10-Loading Nanostructured Lipid Carrier. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, p. 2136-2148, 2012.

WANG, L. et al. Sclareol, a Plant Diterpene, Exhibits Potent Antiproliferative Effects via the Induction of Apoptosis and Mitochondrial Potential Loss in Osteosarcoma Cancer Cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 11(6), p. 4273-4278, 2015.

WISSING, S. A.; KAYSERB, O.; MÜLER, R. H. Solid Lipid Nanoparticles for Parenteral Drug Delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56(9), p. 1257-1272, 2004.

WONG, H. L.; BENADAYAN, R.; RAUTH, A. M.; LI, Y.; WU, X. Y. Development of Solid Lipid Nanoparticles Containing Ionically Complexed Chemotherapeutic Drugs and Chemosensitizers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93(8), p. 1993-2008, 2004.

WONG, H. L.; BENADAYAN, 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, X. et al. Preparation and Characterization of 4-dendimethylaninosancycline (CMT-3) Loaded Nanostructured Lipid Carrier (CMT-3/NLC) Formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 450(1-2), p. 225-234, 2013.

YANG, F.; TEVES, S. S.; KEMP, C. J.; HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA Torsion and Chromatin Dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Cancer**, v. 1845(1), p. 84-89, 2014.

YING, X.; CUI, D.; YU, L.; DU, Y. Solid Lipid Nanoparticles Modified with Chitosan Oligosaccharides for the Controlled Release of Doxorubicin. **Carbohydrate Polymers**, v. 84(4), p. 1357-1364, 2011.

YUAN, L.; LIU, C.; CHEN, Y.; ZHANG, Z.; ZHOU, L.; QU, D. Antitumor Activity of Tripterine via Cell-penetrating Peptide-coated Nanostructured Lipid Carriers in a Prostate Cancer Model. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4339-4350, 2013.