

---

**SÁVIO MORATO DE LACERDA GONTIJO**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO DE INCLUSÃO DE  
ERLOTINIBE EM HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA E DA  
HIPERTERMIA ASSOCIADA À CISPLATINA**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2015**

---

---

Sávio Morato de Lacerda Gontijo

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO DE INCLUSÃO DE  
ERLOTINIBE EM HIDROXIPROPIL-BETA-CICLODEXTRINA E DA  
HIPERTERMIA ASSOCIADA À CISPLATINA**

Tese apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação da  
Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em  
Odontologia – área de concentração  
em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés

Co-orientador: Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra

Faculdade de Odontologia - UFMG

Belo Horizonte

2015

---

## FICHA CATALOGRÁFICA

G641  
2015  
T

Gontijo, Sávio Morato de Lacerda  
Avaliação da citotoxicidade do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil-beta-ciclodextrina e da hipertemia associada à cisplatina / Sávio Morato de Lacerda Gontijo. – 2015.

117f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura  
Coorientador: Rubén Dario Sinisterra

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Ciclodextrinas. 2. Neoplasias. I. Cortés Segura, Maria Esperanza. II. Sinisterra, Rubén Dario. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



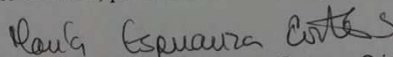
## FOLHA DE APROVAÇÃO

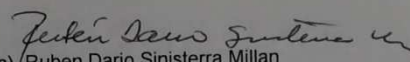
**Avaliação da citotoxicidade do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil-Beta-ciclodextrina e da hipertermia associada à cisplatina**

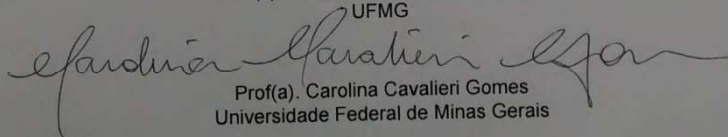
**SAVIO MORATO DE LACERDA GONTIJO**

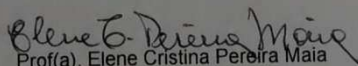
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração CLÍNICA ODONTOLÓGICA.

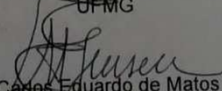
Aprovada em 13 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

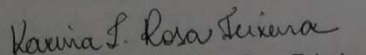
  
Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Ruben Dario Sinisterra Millan  
UFMG

  
Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
Prof(a). Elene Cristina Pereira Maia  
UFMG

  
Prof(a). Carlos Eduardo de Matos Jensen  
Universidade Federal de São João Del-Rei

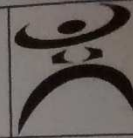
  
Prof(a). Karina Imaculada Rosa Teixeira  
FEAD

Belo Horizonte, 13 de julho de 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO SAVIO MORATO DE LACERDA GONTIJO

Realizou-se, no dia 13 de julho de 2015, às 14:00 horas, 318, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Avaliação da citotoxicidade do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil-Beta-ciclodextrina e da hipertermia associada à cisplatina*, apresentada por SAVIO MORATO DE LACERDA GONTIJO, número de registro 2011712151, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura - Orientador (UFMG), Prof(a). Ruben Dario Sinisterra Millan (UFMG), Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Elene Cristina Pereira Maia (UFMG), Prof(a). Carlos Eduardo de Matos Jensen (Universidade Federal de São João Del-Rei), Prof(a). Karina Imaculada Rosa Teixeira (FEAD).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 13 de julho de 2015.

*Maria Esperanza Cortes Segura*

Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura ( Doutora )

*Ruben Dario Sinisterra Millan*

Prof(a). Ruben Dario Sinisterra Millan ( Doutor )

*Carolina Cavalieri Gomes*

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes ( Doutora )

*Elene Cristina Pereira Maia*

Prof(a). Elene Cristina Pereira Maia ( Doutora )

*Carlos Eduardo de Matos Jensen*

Prof(a). Carlos Eduardo de Matos Jensen ( Doutor )

*Karina Imaculada Rosa Teixeira*

Prof(a). Karina Imaculada Rosa Teixeira ( Doutor )

Agradeço a Deus acima de tudo, por ter me permitido concluir este trabalho.

À minha família por estarem sempre presentes nessa caminhada de minha vida.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Esperanza Cortés, pelos ensinamentos, e por ter me adotado como um filho desde a graduação, e até hoje, tem a paciência de me orientar, apoiar e incentivar na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra, meu co-orientador, pelos ensinamentos, pela oportunidade, confiança e broncas, que ajudaram no meu amadurecimento tanto profissional quanto pessoal.

Ao *Dr. Allen's research group* (Christine, Dario, Frantz, Laís, Larissa, Loujin, Michael, Nancy, Raquel, Sandra, Sina, Sohyoung e Tara), em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christine Allen pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Mike muito obrigado pela paciência e ajuda nos experimentos.

À Coordenação, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Ao Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai pela amizade e ajuda com os experimentos de ITC.

À equipe do laboratório de angiogênese do ICB-UFMG, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Passos, Dr. Celso Viana e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Campos, pela ajuda nos experimentos *in vivo*.

Ao Dr. Márcio Sobreira pela paciência e ajuda nos experimentos de Citometria.

Ao Pedro pela grande amizade, pelos ensinamentos e ajuda na caracterização físico-química.

Aos colegas do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais - LEMB: Alfonso, Alinne, Ana Paula, Ana Pinzón, Diego, Eduardo, Esdras, Frederico, Gabi, Joel, Karina Teixeira, Karina Scheurmann, Kelen, Marcelo Speziali, Michele, Pedro, Ricardo e Vivianne, pelo agradável convívio e momentos de descontrações.

À CAPES pelo financiamento da presente pesquisa e pela minha bolsa nacional e PDSE (processo 99999.003131/2014-09).

Ao CNPq, FAPEMIG e INCT-NanoBiofar pelo financiamento de recursos concedidos para o desenvolvimento desta pesquisa.

---

## AGRADECIMENTOS

---

A todos, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

**Sumário**

Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xix
<b>Capítulo I: Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> e da angiogênese inflamatória do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil-<math>\beta</math>-ciclodextrina</b>	
1. Introdução e relevância.....	21
1.1 Câncer.....	21
1.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico.....	22
1.3 Caco-2.....	24
1.4 A431.....	25
1.5 Osteoblastos.....	26
1.6 Erlotinibe.....	27
1.7 Ciclodextrina.....	28
1.8 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho.....	32
1.9 Caracterização por análise térmica.....	32
1.10 Caracterização por ressonância magnética nuclear.....	33
1.11 Estudo de solubilidade de fases.....	33
1.12 Caracterização por calorimetria de titulação isotérmica.....	35
1.13 Citometria de fluxo.....	35
1.14 Ensaio de MTT.....	37
2. Objetivos.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. Materiais e métodos.....	39
3.1 Materiais.....	39
3.2 Preparação da mistura física.....	40
3.3 Preparação do composto de inclusão.....	40
3.4 Caracterização físico-química dos compostos.....	41
3.4.1 Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região do	

---



---

Infravermelho FTIR.....	41
3.4.2 Caracterização por Análise Térmica.....	41
3.4.3 Caracterização por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear.....	42
3.4.4 Estudo de solubilidade de fases.....	42
3.4.5 Caracterização por calorimetria de titulação isotérmica.....	43
3.5 Determinação da citotoxicidade em linhagens de células Caco-2.....	43
3.6 Determinação da citotoxicidade em linhagens de células A431.....	44
3.7 Determinação da citotoxicidade em osteoblastos.....	45
3.8 Determinação do percentual de células Caco-2 em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose.....	46
3.9 Estudo <i>in vivo</i> – Preparação e implantação das esponjas.....	47
3.10 Determinação da quantidade de hemoglobina.....	47
3.11 Determinação das atividades mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG).....	48
3.12 Análise dos dados.....	49
4. Resultados e discussão.....	50
4.1 Caracterização físico-química dos compostos.....	50
4.1.1 Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho – FTIR.....	50
4.1.2 Caracterização por Análise Térmica.....	52
4.1.3 Caracterização por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear - <i>RMN 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY</i> .....	54
4.1.4 Estudo de solubilidade de fases.....	56
4.1.5 Caracterização por calorimetria de titulação isotérmica.....	57
4.2 Teste de citotoxicidade em células Caco-2.....	58
4.3 Teste de citotoxicidade em células A431.....	62
4.4 Teste de citotoxicidade em osteoblastos.....	65
4.5 Determinação do percentual de células Caco-2 em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose.....	66
4.6 Estudo <i>in vivo</i> - Determinação da quantidade de hemoglobina (Hb) e das atividades da mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG).....	69
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	72

---

**CAPÍTULO II: Avaliação *in vitro* da citotoxicidade da hipertermia associada à cisplatina em linhagens celulares de carcinoma de mama, colo do útero e pulmão**

1. Introdução e relevância.....	73
2. Objetivos.....	79
2.1 Objetivo geral.....	79
2.2 Objetivo específico.....	79
3. Materiais e Métodos.....	80
3.1 Materiais.....	80
3.2 Cultura de células.....	80
3.3 Ensaio de citotoxicidade.....	81
4. Resultados e discussão.....	83
4.1 Ensaio de citotoxicidade por MTS.....	83
4.2 Ensaio de citotoxicidade por APH.....	88
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	95
Referências.....	96
Anexo 1.....	110
Anexo 2.....	116

---

**Lista de Figuras**

Fig. 1.	Principais vias de sinalizações do EGFR.....	23
Fig. 2.	Via de sinalização do EGFR promovendo à proliferação de células mesenquimais progenitoras, pré-condrócitos e pré-osteoblastos, e inibindo a diferenciação celular.....	26
Fig. 3.	Estrutura química do erlotinibe.....	28
Fig. 4.	Estrutura físico-química da $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -CDs.....	29
Fig. 5.	Representação esquemática da formação do composto de inclusão em ciclodextrina.....	30
Fig. 6.	Estrutura química da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	31
Fig. 7.	Diagrama de solubilidade de fases.....	34
Fig. 8.	Espectro de absorção na região do infravermelho em KBr do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF) entre 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .....	51
Fig. 9.	Curvas TG do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF).....	53
Fig. 10.	Curvas DTA do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF).....	53
Fig. 11.	Mapa de contornos NOESY do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (DMSO- $d_6$ , 400MHz).....	55
Fig. 12.	Seção expandida entre f1: $\delta$ 7,2 e 8,4 e f2: $\delta$ 3,70 e 3,9 ppm do Mapa de contornos NOESY do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (DMSO- $d_6$ , 400MHz).....	55
Fig. 13.	Modelo de inclusão molecular proposto do ERL dentro da cavidade da HP- $\beta$ -CD baseado nos resultados de RMN 2D-NOESY.....	56

- Fig. 14. Diagrama de solubilidade de fases do composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD a 25°C..... 57
- Fig. 15. Curvas calorimétricas (ITC) para (a) HP- $\beta$ -CD 60,0 mM em solução aquosa de ácido acético a 10% v/v (triângulo preenchido) e HP- $\beta$ -CD 60,0 mM em ERL 4,0 mM (quadrado preenchido); (b) após a subtração da curva de titulação do branco e ajuste não-linear por *Wiseman Isotherm* (linha de preenchimento)..... 57
- Fig. 16. Teste de citotoxicidade, através do ensaio MTT, em células Caco-2 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações. \*\*\*  $p < 0,001$ ..... 59
- Fig. 17. Teste de citotoxicidade, através do ensaio MTT, em células A431 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ..... 62
- Fig. 18. Teste de citotoxicidade, através do ensaio MTT, em osteoblastos após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ..... 65
- Fig. 19. Tipo de morte celular em Caco-2 após 48 h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações..... 67
- Fig. 20. Teor de hemoglobina (Hb) dos implantes nos grupos tratados com ERL, HP- $\beta$ -CD, ERL:HP- $\beta$ -CD e DMSO 4% (veículo). \*  $p < 0,05$ ..... 69
- Fig. 21. Níveis de (a) neutrófilos e (b) acumulação de monócitos/macrófagos de acordo com os níveis de atividade de MPO e NAG, respectivamente, que foram detectados nas
-

	matrizes das esponjas dos grupos tratados [ERL, HP- $\beta$ -CD, ERL:HP- $\beta$ -CD, e o grupo de controle (DMSO 4%)].	70
Fig. 22.	Estrutura química da cisplatina.	76
Fig. 23.	Representação esquemática da reação de hidrólise da cisplatina.	76
Fig. 24.	Formação de aduto platina-DNA intrafita e interfitas.	77
Fig. 25.	Percentual de viabilidade das células de carcinoma de colo do útero, (a, b) SiHa e (c, d) ME-180, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio MTS).	84
Fig. 26.	Percentual de viabilidade das células de carcinoma de pulmão, (a, b) A549 e (c, d) H460, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47h e 71h a 37°C) (Ensaio MTS).	86
Fig. 27.	Percentual de viabilidade das células de carcinoma de mama, (a, b) MDA-MB-231 e (c, d) MDA-MB-468, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio APH).	89
Fig. 28.	Percentual de viabilidade das células de carcinoma de mama, (a, b) MDA-MB-436 e (c, d) HCC-1937, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio APH).	92
Fig. 29.	Teste de citotoxicidade em células Caco-2 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) e do DMSO (37,5=0,81%v/v; 7,5=0,162%v/v; 1,5=0,0324%v/v; 0,3=0,00648%v/v) em diversas concentrações.	110
Fig. 30.	Teste de citotoxicidade em células Caco-2 após 48 h na presença do erlotinibe livre (ERL), da $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), do composto de inclusão (ERL: $\beta$ -CD) e do DMSO (37,5=0,81%v/v; 7,5=0,162%v/v; 1,5=0,0324%v/v;	

---

	0,3=0,00648%v/v) em diversas concentrações.....	111
Fig. 31.	Teste de citotoxicidade em células A431 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) e do DMSO (37,5=0,1%v/v; 7,5=0,02%v/v; 1,5=0,004%v/v; 0,3=0,0008%v/v) em diversas concentrações.....	112
Fig. 32.	Teste de citotoxicidade em osteoblastos após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) e do DMSO (37,5=0,1%v/v; 7,5=0,02%v/v; 1,5=0,004%v/v; 0,3=0,0008%v/v) em diversas concentrações.....	113
Fig. 33.	Tipo de morte celular em Caco-2 após 48 h na presença do erlotinibe livre (ERL), do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do DMSO (37,5=0,81%v/v; 7,5=0,162%v/v; 1,5=0,0324%v/v; 0,3=0,00648%v/v), do irinotecano (IRI) e do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	114
Fig. 34.	Curva de calibração do ERL em HCl 0,1 M.....	114
Fig. 35.	Varredura do ERL no espectrofotômetro UV-visível.....	115

---

**Lista de Tabelas**

Tabela 1:	Características da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.....	39
Tabela 2:	Características do erlotinibe.....	40
Tabela 3:	Classificação da citotoxicidade em função da viabilidade celular.....	49
Tabela 4:	Atividade citotóxica dos compostos sobre a célula tumoral Caco-2 (ensaio MTT).....	60
Tabela 5:	Atividade citotóxica dos compostos sobre a célula tumoral A431 (ensaio MTT).....	63
Tabela 6:	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no sexo feminino, exceto pele não melanoma.....	73
Tabela 7:	Características genéticas de 4 linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativos.....	74
Tabela 8:	Características da cisplatina.....	80
Tabela 9:	Valores de IC <sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens SiHa e ME-180 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).....	85
Tabela 10:	Valores de IC <sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens A549 e H460 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).....	87
Tabela 11:	Valores de IC <sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).....	90
Tabela 12:	Valores de IC <sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens MDA-MB-436 e HCC-1937 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).....	93

---

**Lista de Abreviaturas**

2D-NOESY	Espectrometria de ressonância magnética nuclear bidimensional ( <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> )
APH	<i>Acid phosphatase cytotox assay</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
CD	Ciclodextrina
cDDP	<i>cis</i> -diaminodicloroplatina II
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERL	Erlotinibe
ERL:HP- $\beta$ -CD	Erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier
Hb	Hemoglobina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HPV	Papilomavírus humano
HP- $\beta$ -CD	Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória 50%
IP	Iodeto de propídio
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
MF	Mistura física
MPO	Mieloperoxidase
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NAG	N-acetilglicosaminidase
PBS	Tampão fosfato salina
PS	Fosfatidilserina

---



RE	Receptor de estrógeno
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP	Receptor de progesterona
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TG	Termogravimetria
$\alpha$ -MEM	<i>Alpha-minimal essential</i>

---

## Resumo:

Estratégias amplamente utilizadas para potencializar os efeitos citotóxicos de moléculas antitumorais com o objetivo de reduzir a dose aplicada e os efeitos colaterais são a inclusão molecular e a associação da quimioterapia com a hipertermia. No presente trabalho foram estudadas estas duas estratégias, sendo a primeira a inclusão molecular que é muito utilizada para aumentar a solubilidade, a absorção e a disponibilidade de moléculas; e a segunda, a hipertermia que é uma proposta de tratamento do câncer no qual as células do tumor são afetadas pela elevação da temperatura local, podendo ser associada com a quimioterapia para potencializar os efeitos dessa técnica. Para a inclusão molecular usou-se a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) a fim de aumentar a solubilidade, a absorção e a disponibilidade do erlotinibe (ERL), caracterizou-se fisico-quimicamente, e avaliou-se a citotoxicidade e a apoptose *in vitro*, e a angiogênese inflamatória *in vivo* em camundongos Swiss. Para avaliar o efeito citotóxico da hipertermia (aquecimento a 42°C ou 43°C por 1h) associada à cisplatina utilizou-se linhagens de câncer de mama triplo-negativos (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e HCC-1937), linhagens de câncer de colo do útero (ME-180 e SiHa) e linhagens de câncer de pulmão (A549 e H460). A caracterização físico-química mostrou a formação do complexo de inclusão em estado sólido e aquoso, e com uma razão molar entre o ERL e HP- $\beta$ -CD preferencialmente de 1:1. O estudo de solubilidade de fases mostrou um diagrama do tipo  $A_L$  e a calorimetria de titulação isotérmica e a espectrometria de ressonância magnética nuclear, efeito Overhauser nuclear suportam essa formação. Os ensaios de citotoxicidade mostraram uma maior citotoxicidade do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) em relação ao ERL livre (37,5  $\mu$ M), o que pode ser explicado pelo aumento na solubilidade do ERL pela HP- $\beta$ -CD. Além disso, o ERL e o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD apresentaram citotoxicidade maior para as células tumorais (A431 e Caco-2) em relação a célula normal (osteoblastos). Em adição, o composto de inclusão apresentou atividade anti-angiogênica sem afetar a ativação e recrutamento de neutrófilos e macrófagos. Sendo assim, os resultados sugerem que o composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) poderia ser utilizado para o desenvolvimento de formulações à base de ERL. Com relação ao efeito da hipertermia, o calor

apresentou citotoxicidade em 3 das 4 linhagens de câncer de mama avaliadas (MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468) e em 2 linhagens de câncer de colo do útero (ME-180 e SiHa), sendo esse efeito mais evidente na temperatura de 43°C. As células de câncer de pulmão apresentaram resistência ao aquecimento. Além disso, o calor alterou o valor da concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) da cisplatina nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-436. A hipertermia mostrou apresentar atividade citotóxica para as células tumorais, mas deve ser utilizada com critério, uma vez que determinadas células apresentaram resistência ao aumento da temperatura.

Palavras-chave: erlotinibe, ciclodextrina, composto de inclusão, cisplatina, hipertermia, câncer.

---

## Abstract:

Strategies widely used to potentiate the cytotoxic effects of antitumor molecules with the aim of reduce the applied dose and side effects are molecular inclusion and the combination of chemotherapy with hyperthermia. In this thesis, these two strategies were studied, the first molecular inclusion that is widely used to enhance solubility, absorption and availability molecules; and the second, hyperthermia which is a proposal for treatment of cancer where the tumor cells are affected by local temperature elevation and can be associated with chemotherapy to enhance the effects of this technique. For molecular inclusion used to hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) to enhance solubility, absorption and availability of erlotinib (ERL), was characterized physico-chemically and evaluated the *in vitro* cytotoxicity and apoptosis, and *in vivo* inflammatory angiogenesis in Swiss mice. To evaluate the cytotoxic of hyperthermia (heating to 42°C or 43°C for 1h) associated with cisplatin was used triple-negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 and HCC-1937), cervical cancer cell lines (ME-180 and SiHa) and lung cancer cell lines (A549 and H460). The physico-chemical characterization showed the formation of the inclusion complex in solid and aqueous state and with a molar ratio between the ERL and HP- $\beta$ -CD preferably 1:1. Phase-solubility analysis showed  $A_L$ -type diagrams and the isothermal titration calorimetry and nuclear Overhauser effect spectroscopy support that formation. Cytotoxicity assays showed a higher cytotoxicity of inclusion complex (ERL:HP- $\beta$ -CD) in relation to the free ERL (37.5  $\mu$ M), which can be explained by increase in solubility of ERL by HP- $\beta$ -CD. Furthermore, the ERL and inclusion complex ERL:HP- $\beta$ -CD showed higher cytotoxicity to tumor cells (A431 and Caco-2) than to normal cell (osteoblasts). In addition, the inclusion complex exhibited antiangiogenic activity without affect the activation and recruitment of neutrophils and macrophages. Thus, the results suggest that the inclusion complex (ERL:HP- $\beta$ -CD) may be used for the development of ERL-based formulations. With regard the effect of hyperthermia, heat was cytotoxicity in 3 of the 4 breast cancer cell lines evaluated (MDA-MB-231, MDA-MB-436 and MDA-MB-468) and in 2 cervical cancer cell lines (ME-180 and SiHa), this being more evident on 43°C. The lung cancer cells were resistant to

---

heat. Furthermore, the heat changed the cisplatin value of 50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) in MDA-MB-231 and MDA-MB-436 cells. Hyperthermia showed cytotoxic activity for tumor cells, but should be used with a criterion, because certain cells exhibit resistance to the temperature increase.

Keywords: erlotinib, cyclodextrin, inclusion complex, cisplatin, hyperthermia cancer.

---

Para uma melhor compreensão do presente trabalho ele será dividido em dois capítulos: o Capítulo I: Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade *in vitro* e da angiogênese inflamatória do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e o Capítulo II: Avaliação *in vitro* da citotoxicidade da hipertermia associada à cisplatina em linhagens celulares de carcinoma de mama, colo do útero e pulmão.

## **CAPÍTULO I: Preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade *in vitro* e da angiogênese inflamatória do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

### 1. Introdução e relevância:

#### 1.1 Câncer:

O câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. A descoberta dos oncogenes e seus precursores os proto-oncogenes, destacou-se pelo fato de como estes, agindo por meio de seus produtos, as proteínas, alteravam o comportamento celular (1-3).

A ativação dos oncogenes ou a perda de um gene que suprime o potencial neoplásico das células leva à interrupção dos caminhos regulatórios normais que controlam as funções celulares básicas, incluindo a divisão, proliferação, diferenciação e apoptose (1-3).

Nos tecidos e órgãos do corpo, as células se dividem de forma ordenada e controlada. Quando ocorre alguma disfunção celular que altera este processo é produzido um excesso de tecido, denominado tumor (4).

As modalidades terapêuticas tradicionais do câncer são cirurgia, radioterapia e quimioterapia.

O tratamento cirúrgico consiste na exérese do tumor com margem de segurança e, por isso, pode ser bastante mutilante (5).

A radioterapia é uma modalidade terapêutica que age por ionização dos tecidos que somada a outros efeitos como excitação e formação de radicais livres, causa mudanças químicas nos componentes celulares. O dano tecidual

---

está relacionado à dose de irradiação absorvida e à fase da divisão em que se encontram suas células no momento em que receberam a irradiação (6, 7).

A terapia com quimioterápicos é uma modalidade de tratamento que emprega substâncias químicas, também denominadas drogas antineoplásicas ou citotóxicas, capazes de matar as células neoplásicas através da regressão do tumor ou das metástases, fornecendo ao doente a cura ou o controle da doença ou melhorando a qualidade de vida do paciente (8, 9). Os pacientes em tratamento com drogas quimioterápicas podem apresentar efeitos colaterais, sendo a fadiga, o mal estar, a alopecia, os calafrios, as náuseas e os vômitos, os mais frequentes. Há atualmente no mercado uma série de drogas quimioterápicas, que podem ser utilizadas de maneira isolada ou em combinação. O advento da associação da radioterapia e da quimioterapia tem por objetivo preservar as estruturas com uma boa função, para se extinguir com o tempo as sequelas radicais advindas das ressecções cirúrgicas de grande porte (10). Além disso, a atividade local da radioterapia é reforçada pela utilização simultânea da quimioterapia que pode erradicar possíveis micrometástases fora do campo irradiado e melhorar a sobrevida (11).

Entretanto, o sucesso das modalidades convencionais de tratamento é limitado, em parte, pela notável resistência dos tumores à quimioterapia. As tentativas para superar essa resistência com doses mais elevadas de quimioterápicos, inevitavelmente, resultam em um grau inaceitável de toxicidade e danos aos tecidos normais. Assim, há uma necessidade de desenvolvimento de novas terapias que sejam bem toleradas e eficazes. A identificação das alterações moleculares tem permitido o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas visando direcionar o tratamento para as células tumorais. Atualmente, com base em inúmeros estudos pré-clínicos e clínicos, uma nova estratégia terapêutica para o câncer é inibir a proliferação celular, através da inibição do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (12).

## 1.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico:

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) pertence à família dos receptores tirosina-quinase, sendo membros da família de

---

receptores ErbB/HER (*human epidermal growth factor receptor*), composta ainda pelos HER-2, HER-3 e HER-4, e está envolvido em processos normais de proliferação, sobrevivência, adesão, migração, diferenciação celular e apoptose (Fig.1).

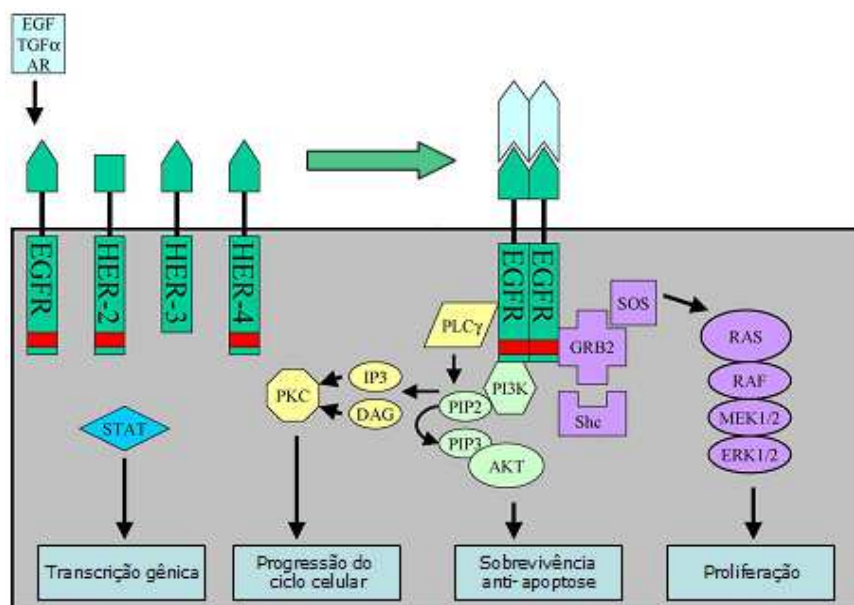


Fig. 1. Principais vias de sinalizações do EGFR (13).

Até o momento, foram identificados 7 ligantes agonistas para o EGFR: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação do crescimento alfa (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento semelhante ao EGF ligado a heparina (HB-EGF), anfirregulina, betacelurina, epirregulina e epigen (14).

Com o isolamento e sequenciamento da proteína do EGFR foi possível a descoberta de suas características estruturais e do seu funcionamento (13, 15).

Estruturalmente, o EGFR é constituído por 3 regiões: uma região extracelular, composta de 4 domínios, que está envolvido no reconhecimento e ligação ao EGF; uma região transmembrana, que faz seu caminho extracelular através da bicamada lipídica da membrana plasmática para o citoplasma; e um domínio intracelular, que se estende para o interior do citoplasma com atividade da tirosina quinase com 5 sítios de autofosforilação (13, 16).

Na forma inativa, o receptor apresenta uma conformação com menos afinidade pelo ligante. Quando a molécula de EGF se aproxima, o receptor assume outra conformação estrutural, com maior afinidade pelo seu ligante,



podendo interagir com o mesmo. A ligação do EGF ao EGFR media sua homodimerização, que consiste na formação de um dímero quando da ligação de dois EGFRs ou, mais raramente, sua heterodimerização, ligação do EGFR a outros membros da família, levando a alterações conformacionais do receptor e culminando na auto-fosforilação de resíduos de tirosina, que passam a servir de sítio de ligação para um pequeno grupo de proteínas sinalizadoras intracelulares, levando a uma cascata de sinalização que permite numerosas respostas combinatórias que regulam a proliferação, apoptose, angiogênese, adesão e diferenciação celular. Em células anormais essas vias se desregulam, levando à hiperproliferação e à migração ou metástase (17, 18).

A desregulação na via de sinalização do EGFR, através da superexpressão do receptor, alterações na dimerização e deficiência de fosfatases, muitas vezes conduz à transformação maligna (19), caracterizada por acentuada proliferação celular, angiogênese, metástase e inibição da apoptose (20). Além disso, a superexpressão do EGFR tem sido relatada em 80-90% dos carcinomas de células escamosas, relacionada à maior agressividade da doença, resistência à quimioterapia e à radioterapia, pobre prognóstico, aumento do risco de recorrência, metástase e diminuição na sobrevida do paciente (21). Esta superexpressão vai aumentando continuamente em paralelo às anormalidades histológicas, indo da hiperplasia à displasia, carcinoma *in situ* e invasivo (3, 22).

Esta super-expressão do EGFR é resultado do aumento na síntese de mRNA, assim como da diminuição de sua inibição, estando presente em diversos tipos celulares, tais como em linhagens de carcinoma de cólon (Caco-2) e linhagens de carcinoma epidermóide (A431) (23, 24). A super-expressão do EGFR não está presente na mucosa de pacientes saudáveis, porém o receptor está expresso em diversas células do organismo, tais como os fibroblastos (25) e os osteoblastos, funcionando de forma a manter a homeostase óssea (26).

### 1.3 Caco-2:

As células Caco-2 são provenientes de carcinoma de cólon humano e contêm cerca de 6.000 receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFRs)

---

por célula, distribuídos de forma desigual, entre a membrana apical e basolateral, e respondem ao fator de crescimento epidérmico (EGF) (27).

O EGF está presente em todo o trato gastrointestinal e apresenta um papel significativo na restituição dos danos na mucosa intestinal e oral. A ativação mediada pelo ligante ao EGFR desencadeia uma cascata de eventos que resultam em migração e proliferação celular, que servem para reparar a superfície desnuda da mucosa, estimulando o processo de reepitelização. Além disso, essa ativação aumenta a produção de mucopolissacarídeos, prostaglandinas e componentes extracelulares da matriz, que desempenha um papel importante na proteção das superfícies das mucosas. Entretanto, o EGF também resulta na proliferação de células cancerosas, tais como a Caco-2 (28, 29).

As células Caco-2, *in vitro*, crescem formando monocamadas semelhantes ao epitélio do cólon, sendo utilizadas como modelos para reproduzir a mucosa humana e estudar o efeito de fármacos sobre o EGFR (30). Estudo *in vitro* em células Caco-2 através da utilização de erlotinibe, um inibidor do EGFR, reduziu a proliferação celular e aumentou a apoptose, podendo ser utilizado em carcinomas de mucosa (31).

#### 1.4 A431:

As células A431 são provenientes de carcinoma epidermóide humano da vulva e são utilizadas em estudos de citotoxicidade e do ciclo celular associado a cânceres que expressam níveis anormalmente elevados de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (32, 33).

As células A431 apresentam mutações no gene supressor tumoral *p53*, sendo assim, são altamente sensíveis a estímulos mitógenos (34, 35).

A estimulação das células epidérmicas A431 pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) induz a rápida fosforilação de proteínas sinalizadoras intracelulares que controlam os processos celulares de crescimento, proliferação e apoptose. Em baixas concentrações (picomolar) o EGF promove o crescimento celular de células A431, enquanto que, em concentrações mais elevadas (nanomolar) inibe o crescimento, pois a ligação excessiva ao EGFR

---

aumenta a atividade da tirosina quinase, resultando em desbalanço no processo de crescimento (36).

As células A431 são modelos para estudar o efeito de fármacos sobre o EGFR. Estudo *in vitro* com células A431 através da utilização de erlotinibe, um inibidor do EGFR, reduziu a sobrevivência celular e aumentou o percentual de células na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (33, 37-39). Estudo *in vivo* em modelos A431 mostra uma inibição de 66% no crescimento tumoral após aplicação do erlotinibe (40).

### 1.5 Osteoblastos:

O tecido ósseo é constantemente remodelado, através da formação e reabsorção óssea. Este processo é resultado de uma interação entre hormônios, fatores de crescimento e outras proteínas de sinalização (26).

Os fatores de crescimento participam da remodelação óssea através da ativação dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFRs). Esta rede de receptores regula aspectos como a proliferação e a diferenciação de osteoblastos, condrócitos e osteoclastos (26).

Os fatores de crescimento ao se ligarem ao EGFR estimulam a proliferação de osteoblastos e condrócitos, mas inibem sua diferenciação, alterando a produção de fosfatase alcalina e conseqüentemente a mineralização (Fig. 2) (26, 41, 42).

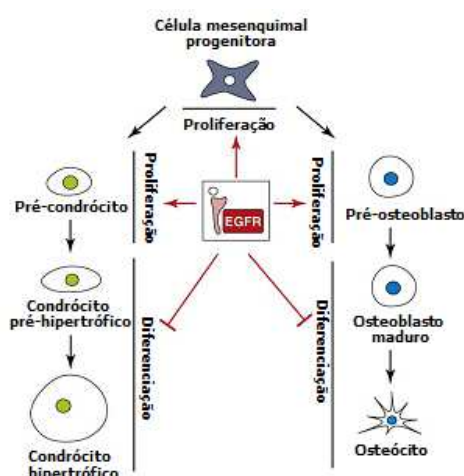


Fig. 2. Via de sinalização do EGFR promovendo à proliferação de células mesenquimais progenitoras, pré-condrócitos e pré-osteoblastos, e inibindo a diferenciação celular (26).

Estudo em animais desprovidos de EGFRs mostrou redução na proliferação de osteoblastos e diferenciação celular acelerada (43). Além disso, estudo com ratos transgênicos que apresentavam superexpressões de fatores de crescimento epidérmico (EGFs) resultou em alta proliferação de osteoblastos no periósteo e endósteo, e redução da espessura da cortical óssea (44).

#### 1.6 Erlotinibe:

O erlotinibe (Tarceva<sup>®</sup>) (Fig. 3) é um potente inibidor seletivo e reversível da proteína tirosina-quinase, que está localizada no domínio intracelular do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), e tem efeito antitumoral estabelecido em neoplasias com aumento da expressão desses receptores (21, 45). Esse fármaco atua inibindo a autofosforilação do EGFR e induzindo à parada do ciclo celular na fase G<sub>1</sub> e apoptose (12). Estudo *in vitro* e *in vivo* mostra que o erlotinibe apresenta atividade anti-angiogênica através da redução na expressão de genes pro-angiogênicos, redução na proliferação celular e na densidade vascular. As vias angiogênicas são importantes alvos para a inibição do crescimento tumoral (46).

O erlotinibe é um fármaco antitumoral disponível na forma oral, em comprimido, nas dosagens de 25, 100 e 150 mg de cloridrato de erlotinibe (47).

Em relação à farmacocinética, o erlotinibe apresenta uma biodisponibilidade moderada, com 44% da concentração plasmática agindo sobre o tumor (48). O erlotinibe é metabolizado pelas enzimas hepáticas do citocromo P450, principalmente CYP3A4, CYP3A5, CYP1A1 e CYP1A2 (49), e seus metabólitos são excretados predominantemente por meio das fezes (83%). A solubilidade do erlotinibe em água é baixa ( $\approx$  5-20  $\mu$ M em pH 7) e aumenta com a redução do pH (0,4 mg/mL em pH 2). Seu tempo de meia vida médio é de 25,6 h e o pKa a 25 °C é de 5,42 (50).

O erlotinibe é aprovado nos EUA pela *Food and Drug Administration* (FDA) e na Europa pela *European Medicines Agency* (EMA) para o tratamento do câncer de pulmão de células não pequenas avançado ou metastático, após a falha na primeira linha de quimioterapia, e em combinação com gencitabina para o tratamento do câncer de pâncreas localmente

---

avançado, irressecável ou metastático. Também é aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento do câncer de pulmão (51).

Os efeitos colaterais mais comuns do erlotinibe são erupções cutâneas e diarreia (52). Outros efeitos como insuficiência renal, neutropenia e trombocitopenia são menos frequentes (53).

Apesar de vários resultados clínicos favoráveis pela utilização do erlotinibe sozinho ou em combinação com outros antitumorais, a produção de novas formulações, mais seguras e eficazes, é uma importante estratégia para evolução dos tratamentos farmacológicos contra o câncer. Neste sentido, as ciclodextrinas (CDs) são potenciais sistemas carreadores de fármacos, tais como o erlotinibe (Fig. 3), que apresenta possíveis regiões capazes de interagir com as CDs, objetivando aumentar a solubilidade em água, diminuir a concentração aplicada, reduzir os efeitos colaterais, aumentar a biodisponibilidade e a atividade.

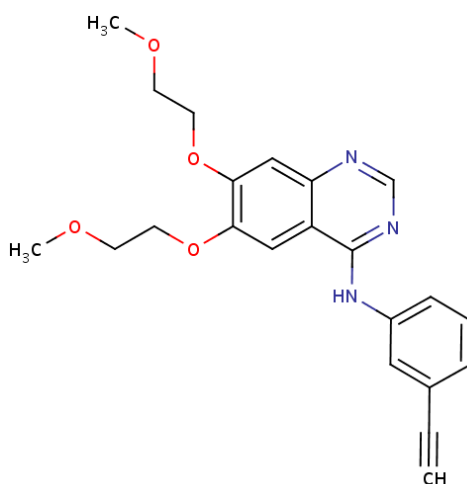


Fig. 3. Estrutura química do erlotinibe (39).

### 1.7 Ciclodextrina:

As ciclodextrinas (CDs) (Fig. 4) são utilizadas como carreadoras de fármacos, podendo modificar suas propriedades físico-químicas, tais como a solubilidade e, conseqüentemente, alterar sua biodisponibilidade através da formação de compostos de inclusão e/ou associação. As moléculas dos fármacos interagem com as CDs impedindo a degradação que pode ocorrer no

trato gastrointestinal, aumentando a absorção e a biodisponibilidade (54, 55). Além disso, as CDs controlam a liberação da molécula, diminuindo o número de administrações realizadas pelo paciente (54, 56-58).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos de ocorrência natural ou semissintética, constituídas por unidades glicosídicas unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. As CDs mais comuns e importantes são as que apresentam seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD) e oito ( $\gamma$ -CD) unidades de glicose (54). Devido à conformação em cadeira das unidades glicosídicas, as CDs apresentam uma forma tronco-cônica com altura constante (7,9 Å) e uma cavidade hidrofóbica, cuja dimensão e tamanho é determinada pelo número de unidades de glicose (Fig. 4), na qual pode ser incluída uma grande variedade de moléculas-hóspedes (59).

Devido à diferença no diâmetro da cavidade interna, cada CD apresenta uma capacidade diferente de formação do composto de inclusão com diferentes tamanhos de moléculas hospedeiras (56).

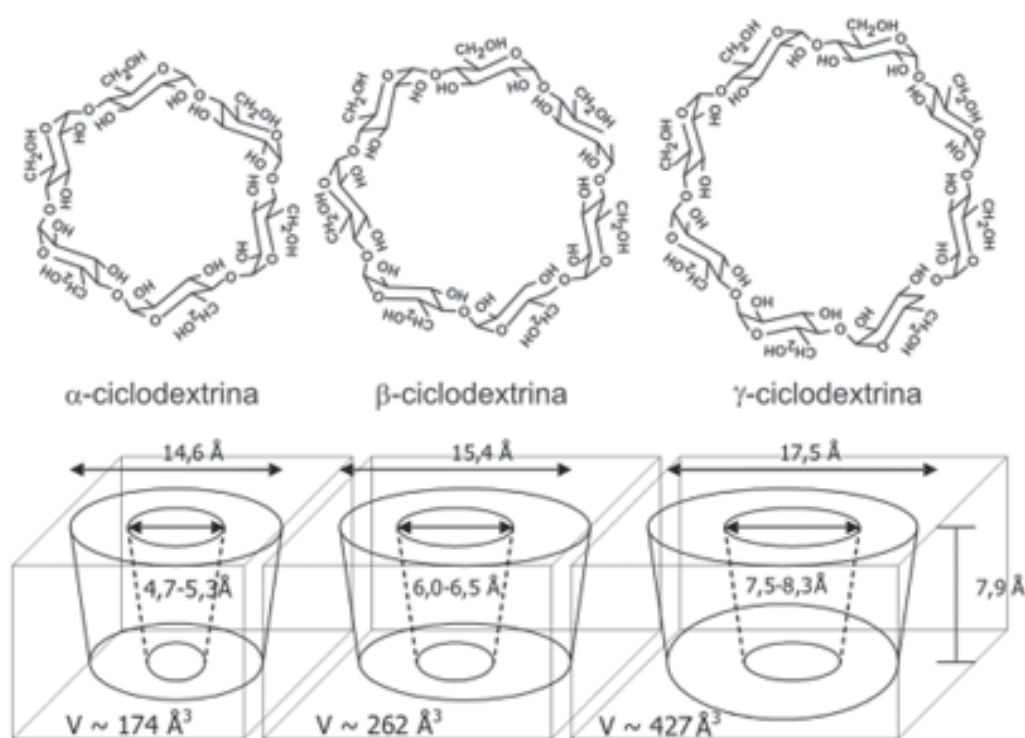


Fig. 4. Estrutura físico-química da  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -ciclodextrinas constituídas por unidades glicosídicas unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 (59).

Na ausência da molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica levemente apolar é ocupada por moléculas de água, cujas interações são

energeticamente desfavoráveis, dada à natureza da interação polar-apolar. Contudo, uma molécula hóspede menos polar que as moléculas de água, quando adicionada à solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa esta cavidade, tornando o sistema energeticamente mais favorável, e portanto, mais estável do ponto de vista termodinâmico (Fig. 5) (60, 61).

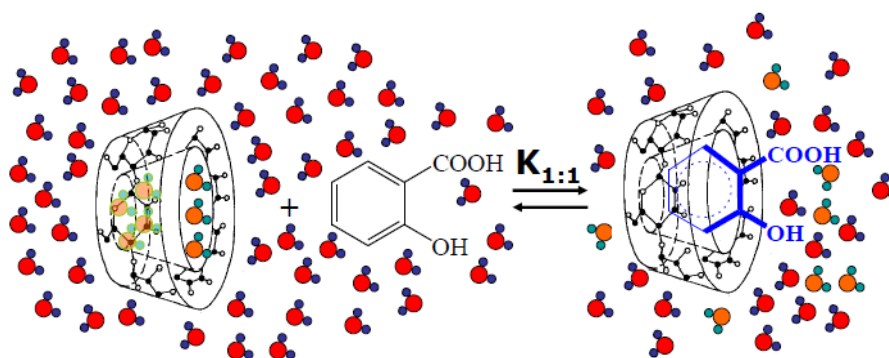


Fig. 5. Representação esquemática da formação do composto de inclusão em ciclodextrina (62).

Em solução aquosa, as moléculas hóspedes interagem com as ciclodextrinas na maioria das vezes através de ligações não-covalentes simultâneas, tais como: ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas, interações dipolo-dipolo e transferências de cargas. Todas estas interações podem ser consideradas como relativamente “fracas”, porém dão lugar a efeitos sinérgicos quando atuam em conjunto, resultando na formação de complexos. Por outro lado, tais forças devem ser suficientemente fracas para liberar as moléculas-hóspede, sob condições específicas (61). Portanto, esse processo é dinâmico, no qual a molécula hóspede continuamente se associa e desassocia da ciclodextrina (60). A formação de compostos de inclusão altera significativamente as características físico-químicas das moléculas inclusas sem interferir nas atividades da substância, pois sua complexação é um processo dinâmico rapidamente reversível (63).

Além das CDs naturais existem as CDs sintéticas, que foram desenvolvidas no intuito de melhorar as características físico-químicas e biológicas das CDs. Devido ao fato de serem compostos polidroxílicos, as CDs podem ser transformadas em uma grande variedade de derivados (64).

Atualmente, o grupo de derivados mais utilizados são as ciclodextrinas hidroxialquiladas, tal com a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) (Fig. 6).

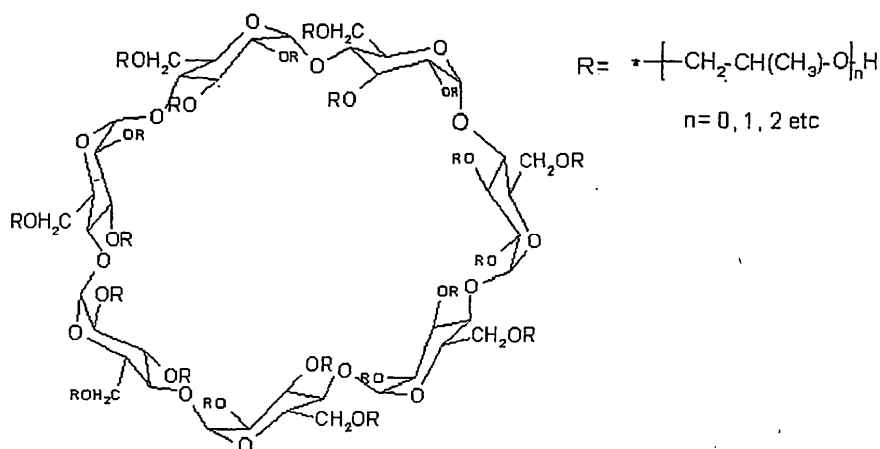


Fig. 6. Estrutura química da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (54).

A HP- $\beta$ -CD é bem tolerada pelo organismo humano e é isenta de efeitos adversos quando administrada por via oral. Além disso, a HP- $\beta$ -CD apresenta redução da toxicidade parenteral, o que viabiliza sua utilização em formulações intravenosas (65). A administração de HP- $\beta$ -CD via parenteral, pode levar a uma deposição considerável de colesterol e de ésteres de colesterol nos rins. Entretanto, tais quantidades são significativamente inferiores às aquelas observadas no caso de  $\beta$ -CD, o que aponta para uma menor tendência do complexo com HP- $\beta$ -CD à cristalização, o que lhe confere uma nefrotoxicidade mais baixa em comparação com a  $\beta$ -CD. Além disso, a HP- $\beta$ -CD apresenta uma atividade hemolítica menos pronunciada em relação às CDs naturais (56), sendo, portanto, a representante mais amplamente utilizada pela indústria farmacêutica.

A literatura tem relatado muitas técnicas de caracterização de compostos de inclusão com CDs, contudo, de maneira geral, elas trazem evidências que em conjunto podem confirmar o fenômeno de inclusão, baseando-se em alterações físico-químicas tanto da molécula incluída quanto da molécula de ciclodextrina (60, 66). A dificuldade em caracterizar os compostos de inclusão é devido ao fato das técnicas de caracterização físico-químicas existentes e aplicadas a este tipo de sistema com ciclodextrinas não serem sensíveis à distinção entre as espécies livres e as espécies incluídas,



tanto em solução quanto no estado sólido (62). A caracterização físico-química está principalmente direcionada a investigar aspectos relacionados às possíveis orientações da molécula hóspede no processo de inclusão, determinar sua geometria e estrutura tridimensional, além dos aspectos termodinâmicos e cinéticos, utilizando um conjunto de diferentes técnicas, tais como a ressonância magnética nuclear (RMN), análise térmica, espectroscopia na região do infravermelho, estudo de solubilidade de fases e calorimetria de titulação isotérmica (56, 62, 66-68).

### 1.8 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho:

A interação da molécula hóspede com a ciclodextrina provoca alterações nas frequências vibracionais das substâncias na região do infravermelho, geralmente com desaparecimento e/ou deslocamento de bandas. Quando não há a interação entre as moléculas, as bandas continuam com as mesmas características das substâncias isoladas (66). No entanto, essa técnica não é a mais adequada como evidência conclusiva de complexação (69). A espectroscopia na região do infravermelho é realizada a fim de detectar a ocorrência de novas absorções, desaparecimento de bandas ou deslocamentos de absorção que poderão ser atribuídos às interações entre a molécula e a CD.

### 1.9 Caracterização por análise térmica:

A inclusão de moléculas hóspedes na cavidade da ciclodextrina provoca alterações nos eventos térmicos da substância hóspede. Técnicas como a calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TG) e análise termogravimetria derivada (DTG) são bastante utilizadas nos estudos de complexação (70). Estas técnicas descrevem o uso de metodologias analíticas que determinam as propriedades físicas e químicas de uma amostra, em função da temperatura ou tempo. Na técnica de DSC mede-se a diferença de energia fornecida à substância e um material de referência em função da temperatura, enquanto a substância e a referência são submetidas a uma programação controlada de temperatura. Dessa forma, detectam-se mudanças

---

entálpicas do sistema, tais como desidratação, fusão, recristalização e decomposição. Os principais indicativos de complexação são: o desaparecimento, redução, alargamento ou deslocamento do pico de fusão da molécula (71). Já a técnica de TG, permite detectar as variações de massa (perda ou ganho de massa) sofridas pela amostra em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. A DTG leva às mesmas informações que a TG, porém com acréscimo de resolução, pois registra a velocidade da alteração da massa. A decomposição térmica dos compostos de inclusão é frequentemente observada em temperatura acima da temperatura de decomposição da molécula não-complexada, o que evidencia um aumento de estabilidade da molécula hóspede quando complexada. Este aspecto é tomado como evidência da formação do complexo (72).

#### 1.10 Caracterização por ressonância magnética nuclear:

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido a técnica que evidencia mais diretamente a formação do composto de inclusão, através da observação das mudanças provocadas nos sinais de próton  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$  presentes na molécula da ciclodextrina e na molécula hóspede, elucidando a estrutura do composto e identificando a parte da molécula hospedeira que está incluída na cavidade da ciclodextrina (73, 74). No caso de RMN de  $^1\text{H}$ , os prótons H3 e H5 são direcionados para o interior da cavidade da molécula, enquanto H1, H2 e H4, estão localizados no seu exterior. Dessa forma, se a molécula-hóspede está acomodada na cavidade, então os prótons localizados no interior da cavidade, H3 e H5, ou próximo a ela, H6, devem estar deslocados. Alternativamente, se a associação ocorrer no exterior da estrutura, H1, H2 e/ou H4 devem ser afetados (56, 60, 74).

#### 1.11 Estudo de solubilidade de fases:

A aplicação mais importante das ciclodextrinas está no aumento da solubilidade de fármacos em meio aquoso devido à formação de compostos de inclusão. O diagrama de solubilidade de fase desenvolvido por Higuchi e

---

Connors (75) constitui na aproximação mais utilizada na caracterização de compostos de inclusão em solução. Este método baseia-se na alteração da solubilidade da molécula hóspede frente à adição de ciclodextrinas em concentrações crescentes, permitindo fazer inferências sobre a estequiometria de inclusão e estimar o valor da constante de associação. Os valores de concentração da molécula hóspede são representados graficamente em função das concentrações de ciclodextrina, exibindo dois tipos de perfis: A e B. O diagrama do tipo A indica que a solubilidade da molécula hóspede aumenta com concentrações crescentes da ciclodextrina, sendo subdividido em:

- $A_L$ : aumento linear na solubilidade da molécula hóspede em relação ao aumento na concentração da ciclodextrina;
- $A_P$ : desvio positivo da linearidade, no qual mais de uma molécula de ciclodextrina se complexa com a molécula hóspede;
- $A_N$ : desvio negativo da linearidade, refletindo interações soluto-soluto e soluto-solvente.

O diagrama tipo B indica a formação de um composto de solubilidade limitada, sendo subdividido em  $B_S$  e  $B_I$ :

- $B_S$ : A solubilidade do complexo aumenta até atingir seu limite. A partir dessa solubilidade, o aumento na concentração da ciclodextrina acarretará a precipitação do composto;
- $B_I$ : O complexo de inclusão é praticamente insolúvel (54, 75).

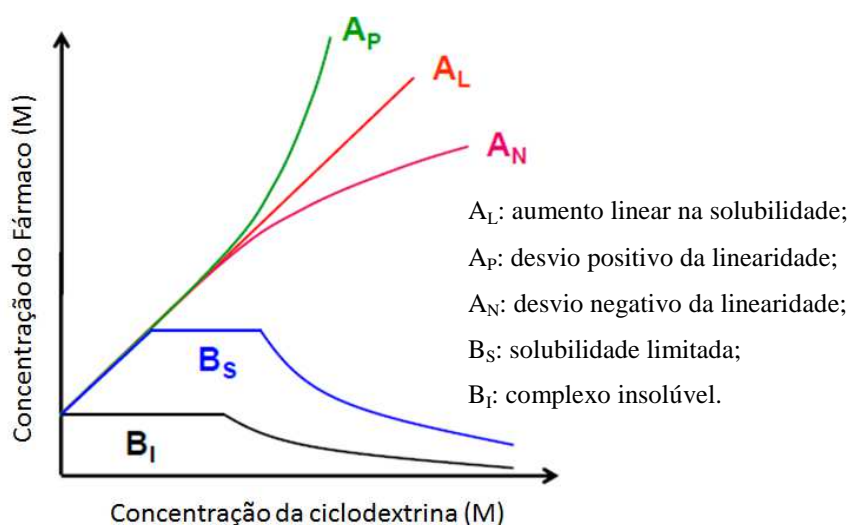


Fig. 7. Diagrama de solubilidade de fases (54, 75).

### 1.12 Caracterização por calorimetria de titulação isotérmica:

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma técnica usada para determinar os parâmetros termodinâmicos de interações moleculares. É frequentemente usada para estudar a interação de moléculas, como exemplo, a interação entre antitumorais e ciclodextrinas (76, 77). A ITC é uma técnica quantitativa que pode medir diretamente a afinidade de ligação ( $K$ ), mudanças na entalpia ( $\Delta H$ ) e na estequiometria ( $n$ ) da interação entre as moléculas em solução. A partir desses parâmetros, também é possível determinar mudanças na energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) e mudanças na entropia ( $\Delta S$ ), proporcionando assim, um perfil termodinâmico completo da interação molecular em um único ensaio. A ITC é uma técnica bastante útil, uma vez que permite quantificar a afinidade e a termodinâmica da ligação, permitindo uma maior otimização da interação entre as substâncias. Dentre as vantagens desse ensaio pode-se destacar a capacidade de análise a nível nanomolar e picomolar sem limitações de peso molecular, solução tampão, soluções coloridas ou partículas em suspensão (78-80).

### 1.13 Citometria de fluxo:

A citometria é uma técnica que permite a análise e quantificação de células ou partículas biológicas suspensas em meio líquido em fluxo. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, tais como as características físicas e/ou químicas de uma célula. O seu princípio baseia-se na dispersão da luz, frontal (*forward scatter* – FSC), que correlaciona-se com o volume celular, e lateral (*side scatter* – SSC), que correlaciona-se com a complexidade morfológica da célula (por exemplo: forma do núcleo, quantidade e tipo dos grânulos citoplasmáticos e rugosidade da membrana), e pela fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais, tais como anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (81).

A aplicação da citometria de fluxo, através do uso simultâneo da anexina V conjugada com (FITC) e iodeto de propídio (IP), permite a distinção entre células em apoptose e necrose (82).

---

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada regulada pelo DNA (83, 84). Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células. Uma célula em apoptose apresenta características morfológicas distintas de uma célula em necrose (83).

As células em apoptose apresentam perda de aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas (85), citoesqueleto alterado, volume celular reduzido, citoplasma denso, organelas compactadas, degradação do DNA, cromatina condensada, com aparência de núcleos picnóticos (86, 87), prolongamento da membrana celular, com empacotamento do conteúdo intracelular (corpos apoptóticos) e externalização da fosfatidilserina (PS) (88) sem perda da integridade da membrana e sem resposta inflamatória (89).

Além disso, as células em apoptose expõem na sua superfície PS, enquanto células viáveis mantêm esses fosfolipídios na face interna da membrana plasmática. A exposição da PS é um dos primeiros eventos que se passa na superfície de uma célula em processo de apoptose (90).

Já a necrose é uma morte celular caótica, caracterizada por apresentar edema celular, dilatação das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, desagregação dos ribossomos, rompimento da membrana plasmática, com liberação dos componentes celulares e resposta inflamatória (91).

Conforme citado anteriormente, uma forma de distinção entre células em apoptose e necrose é através do uso simultâneo da anexina V conjugada com (FITC) e iodeto de propídio (IP). A Anexina V é uma proteína que se liga fortemente à superfície de fosfolipídeos de membrana plasmática de carga negativa, tal como as PS externalizadas, de forma reversível na presença de íons de cálcio (92, 93).

A anexina V não consegue penetrar na membrana celular e comporta-se como uma proteína extrínseca. Desse modo, a translocação da PS da região interna para a região externa da membrana celular, e sua ligação com a anexina V é uma forte evidência que a célula está em apoptose (94).

Mudanças nesta assimetria da membrana, que é analisada através da medição da aderência de Anexina V à membrana celular, podem ser detectadas antes das alterações morfológicas associadas ao início da apoptose e antes da perda da integridade da membrana. Ao conjugar a Anexina V ao FITC é possível avaliar os níveis de PS expostas na membrana celular externa

---

que se associaram a Anexina V, indicando e quantificando as células apoptóticas (apoptose precoce) (94).

Associando ao IP, pode-se mensurar células em que há perda da integridade da membrana, o que poderia indicar fase tardia de apoptose ou necrose. O IP é uma molécula que se intercala em qualquer DNA emitindo fluorescência, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável devido ao alto peso molecular. Assim, as células em necrose ou em apoptose tardia exibem os mesmos padrões característicos quanto à permeabilidade de membrana. Desse modo, corar células simultaneamente com Anexina V-FITC e IP permite a discriminação de células viáveis (FITC - PI -), no início da apoptose (FITC + PI -), células tardiamente apoptóticas ou necróticas (FITC + PI +) e células necróticas (FITC - PI +) (95).

#### 1.14 Ensaio de MTT:

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que pode ser usado para determinar a citotoxicidade, através do estímulo ou inibição do crescimento e da viabilidade celular. O MTT amarelo (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é reduzido a formazan roxo na mitocôndria das células vivas. Uma solução é adicionada para dissolver os cristais insolúveis de formazan roxo produzindo uma solução colorida, que pode ser quantificada em um espectrofotômetro (geralmente entre 500 e 600 nm). A redução do MTT amarelo ao formazan roxo ocorre apenas quando as enzimas mitocondriais redutases estão ativas, portanto a conversão está diretamente relacionada ao número de células vivas. Quando a quantidade de formazan roxo produzido por células tratadas com um agente é comparada com a quantidade de formazan produzido por células não-tratadas, a efetividade do agente em causar a morte de células pode ser deduzida (96, 97).

---

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

- Caracterizar físico-quimicamente e avaliar a citotoxicidade, o efeito apoptótico e a angiogênese inflamatória do composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.

### 2.2 Objetivos específicos

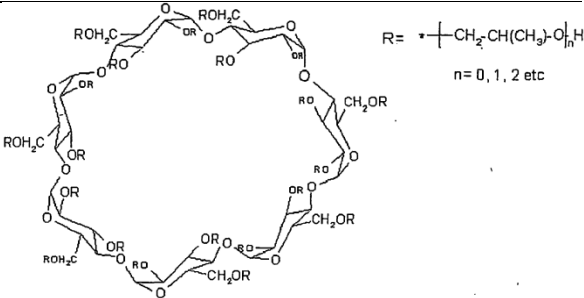
- Preparar um composto de inclusão de erlotinibe em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina através do método de liofilização, assim como sua mistura física;
  - Caracterizar os compostos por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, análise térmica, ressonância magnética nuclear, estudo de solubilidade de fases e calorimetria de titulação isotérmica;
  - Avaliar a citotoxicidade em duas linhagens celulares tumorais (Caco-2 e A431), e uma linhagem celular normal (osteoblastos), na presença dos compostos;
  - Determinar o percentual de células Caco-2 em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose após o tratamento com os compostos;
  - Avaliar a atividade anti-angiogênica e anti-inflamatória através da quantificação de hemoglobina, mieloperoxidase (MPO) e n-acetilglicosaminidase (NAG) *in vivo*.
-

### 3. Materiais e métodos:

#### 3.1 Materiais:

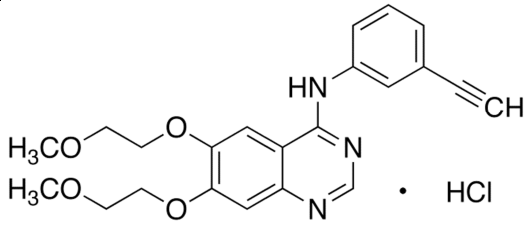
Os materiais utilizados foram: cloridrato de erlotinibe (*USBiological*, Salem, MA, EUA); hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Cerestar, Hammond, IN, EUA); soro fetal bovino, aminoácidos não-essenciais, L-glutamina, tripsina/EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) baixa e alta concentração de glicose (Sigma, St. Louis, MO, EUA); HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*), estreptomicina/anfotericina e colagenase tipo II (Gibco, Grand Island, NY, EUA); MTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) (LGC Biotecnologia, SP, Brasil); L-glutamina (Vetec, RJ, Brasil); e esponjas de poliéter-poliuretano (Vitafoam, Manchester, Reino Unido). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico. As Linhagens de células Caco-2 (ATCC HTB-37) foram gentilmente doadas pela Pontífica Universidade Javeriana – Colômbia e as células A431 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

**Tabela 1: Características da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina**

Código	HP- $\beta$ -CD
Estrutura molecular	
Massa molecular	1450,02 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilidade (H <sub>2</sub> O; 25 °C)	Solúvel em água ( $\geq 600$ mol.L <sup>-1</sup> a 25°C)
Ponto de fusão	> 200°C
Procedência	CERESTAR
Lote	YI- 470-185
Pureza	98%
Nome IUPAC	hidroxipropil-ciclohepta-glucoamilose



**Tabela 2: Características do erlotinibe**

<b>Código</b>	ERL
<b>Estrutura molecular</b>	
<b>Fórmula molecular</b>	$C_{22}H_{23}N_3O_4 \cdot HCl$
<b>Massa molecular</b>	429,90 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilidade (H<sub>2</sub>O; 25 °C)</b>	≈ 5-20 μM
<b>Ponto de fusão</b>	233 °C
<b>Origem</b>	<i>USBiological</i>
<b>Lote</b>	L12022202
<b>Nome IUPAC</b>	<i>N</i> -(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-amine hydrochloride

### 3.2 Preparação da mistura física:

A mistura física composta de erlotinibe e hidroxipropil-β-ciclodextrina na razão molar de erlotinibe:hidroxipropil-β-ciclodextrina (1:1) foi realizada através da mistura das substâncias em um eppendorf a temperatura ambiente (≈ 25°C) até obter uma mistura homogênea. A mistura física foi utilizada após a preparação.

### 3.3 Preparação do composto de inclusão:

A preparação do composto de erlotinibe:hidroxipropil-β-ciclodextrina foi realizada através do método de liofilização de solução aquosa de erlotinibe e hidroxipropil-β-ciclodextrina na razão molar (1:1), tomando como base os métodos previamente descritos na literatura para inclusão em ciclodextrinas (98).

Inicialmente foi preparada a temperatura ambiente (≈ 25°C), uma suspensão aquosa de erlotinibe (ficou em agitação por 4 h) e acrescentada a

essa, uma solução aquosa de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ficou em agitação por 4 h) na concentração indicada para se obter a razão molar de erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1). A seguir, obteve-se uma solução que ficou em agitação magnética por 12 h, seguida pelo congelamento em nitrogênio líquido e liofilização. Esse método de liofilização é baseado na sublimação e tem o propósito de preservar a integridade, estrutura e atividades biológicas ou químicas dos fármacos.

### 3.4 Caracterização físico-química dos compostos:

O composto de inclusão, a mistura física e os materiais de partida utilizados foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e NOESY, estudo de solubilidade de fases e calorimetria de titulação isotérmica.

#### 3.4.1 Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho FTIR:

A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada a fim de detectar as interações entre o erlotinibe e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina expressas através da ocorrência de novas absorções, desaparecimento de bandas ou deslocamentos de bandas. A espectroscopia FTIR é uma técnica utilizada para caracterizar complexos de inclusão com CDs através da avaliação de interações intermoleculares fracas do tipo hóspede:hospedeiro.

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrômetro *Perkin Elmer, Spectrum GX*, entre  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , em intervalos de  $1\text{ cm}^{-1}$ , em pastilhas de KBr. As pastilhas foram obtidas por prensagem a partir de misturas de KBr (99).

#### 3.4.2 Caracterização por Análise Térmica:

A análise térmica foi utilizada com o objetivo de evidenciar alterações térmicas no composto de inclusão em relação aos materiais de partida e a mistura física. O composto de inclusão, a mistura física e os materiais de

---

partida utilizados foram caracterizados por análise termogravimétrica (TG), termogravimetria derivada (DTG) e análise térmica diferencial (DTA). As análises foram realizadas no equipamento SDT Q600 da *TA Instruments*. As amostras ( $\approx 5$  mg) foram aquecidas da temperatura ambiente ( $\approx 25$  °C) até 700 °C, em uma razão de aquecimento de  $10$  °C  $\text{min}^{-1}$ , em atmosfera de  $\text{N}_{2(g)}$  com vazão de  $100$  mL  $\text{min}^{-1}$ .

### 3.4.3 Caracterização por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear:

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos utilizando-se o espectrofotômetro *Bruker Avance DPX-400* (400 MHz). O solvente  $\text{DMSO-}d_6$  utilizado foi de pureza isotópica mínima de 99,5%. As amostras foram preparadas em tubos de RMN de 8,00 polegadas de comprimento e 5 mm de diâmetro externo.

Também foram utilizadas técnicas de ressonância magnética nuclear bidimensionais utilizando o Efeito nuclear *Overhauser* (NOESY) para detectar a existência de interações espaciais menores que  $5$  Å entre os hidrogênios dos erlotinibe e os hidrogênios da HP- $\beta$ -CD, conforme descrito na literatura (100, 101).

### 3.4.4 Estudo de solubilidade de fases:

Os estudos de solubilidade de fase foram realizados pelo método previamente descrito por Higuchi e Connors (75). Resumidamente, 1 mL de HCl (0,1 M), contendo várias concentrações de HP- $\beta$ -CD (0 - 0,0195 M), foram adicionados a uma quantidade excessiva de erlotinibe (3 mg) e agitados durante 4 dias num banho de água de temperatura constante de  $\approx 25$ °C. Após 4 dias, os ependorfs foram centrifugados a  $15.682xg$ , durante 15 min. Os sobrenadantes foram colhidos e a concentração de ERL foi determinada espectrofotometricamente (*Multiskan Spectrum* de UV/visível) a 342 nm. A constante de estabilidade por solubilidade em fase  $K_{S1:1}$  foi calculada de acordo com a seguinte equação, assumindo a estequiometria de 1:1:

$$K_{S1:1} = \text{slope}/S_0(1 - \text{slope})$$

$S_0$  é a solubilidade do erlotinibe na ausência de HP- $\beta$ -CD.

#### 3.4.5 Caracterização por calorimetria de titulação isotérmica:

Titulações calorimétricas foram realizadas em duplicata com um microcalorímetro VP-ITC (Microcal Company, Northampton, MA, EUA) a 25°C. O solvente utilizado em todos os experimentos foi uma solução aquosa de ácido acético a 10% v/v (pH  $\approx$  2). Cada experimento de titulação consistiu de 51 injeções sucessivas de uma solução de HP- $\beta$ -CD (60 mM) em ácido acético aquoso para a célula de reação carregada com 1,5 mL de uma solução de erlotinibe (4,0 mM) em ácido acético aquoso, com intervalos de tempo de 350 s. A primeira injeção de 1,0  $\mu$ L foi descartada para eliminar efeitos de difusão do material da seringa para a célula calorimétrica. As injeções subsequentes foram usadas em volumes constantes de 5,0  $\mu$ L de HP- $\beta$ -CD. O tempo de injeção foi de 2,0 s. A concentração de HP- $\beta$ -CD na célula calorimétrica variou de 0,0 - 8,57 mM e a concentração de ERL de 4,0 - 3,6 mM. Os dados foram analisados utilizando o modelo "*one site model*" estabelecido pelo *Microcal Origin 7.0* para ITC após a subtração do branco (titulação de HP- $\beta$ -CD em solução de ácido acético aquoso).

#### 3.5 Determinação da citotoxicidade em linhagens de células Caco-2:

Linhagens de células Caco-2 foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose, contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (100 UI/mL), L-glutamina (2 mM) e HEPES (25 mM), e incubadas em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. As células em crescimento exponencial foram semeadas (100  $\mu$ L) em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/mL em uma placa de 96 poços e cultivados por 72 h, seguido pela remoção do sobrenadante e inserção dos materiais (102).

Devido à baixa solubilidade apresentada pelo erlotinibe, os compostos foram solubilizados em meio de cultura contendo DMSO (< 1%). Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação das células na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) e do erlotinibe livre (100  $\mu$ L), nas

concentrações de 0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu\text{M}$ , foi avaliada a viabilidade das células Caco-2 pelo ensaio MTT. Após a remoção do sobrenadante e lavagem (1x PBS), foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio base sem vermelho de fenol em cada poço, seguido pela adição de 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) e incubação em estufa contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Após 2-4 h, a morfologia celular foi analisada por microscopia óptica invertida e os cristais de formazan foram dissolvidos em SDS (10%) em HCl (0,01 M), seguido por incubação. Após 4-18 h, a medida de densidade óptica foi realizada em 570 nm no espectrofotômetro UV-visível *multiskan spectrum* (103).

Em todos os experimentos, como grupo controle, foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu\text{M}$ ) e o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização dos compostos (Anexo 1 – Fig. 29). Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.6 Determinação da citotoxicidade em linhagens de células A431:

Linhagens de células A431 foram cultivadas em meio de cultura DMEM com alta concentração de glicose, contendo 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM), penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e HEPES (25 mM) incubado em estufa contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. As células em crescimento exponencial foram semeadas (100  $\mu\text{L}$ ) em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/mL em uma placa de 96 poços e cultivados por 24h, seguido pela remoção do sobrenadante e inserção dos materiais (102).

Devido à baixa solubilidade no meio de cultura, o erlotinibe foi solubilizado no meio de cultura contendo DMSO ( $\leq 0,1\%$ ). Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação das células na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) e do erlotinibe livre (100  $\mu\text{L}$ ), nas concentrações de 0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu\text{M}$ , foi avaliada a viabilidade das células A431 pelo ensaio MTT, conforme descrito anteriormente (103). Em todos os experimentos, como grupo controle, foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu\text{M}$ ) e o solvente (DMSO) nas

mesmas concentrações utilizadas para solubilização do ERL (Anexo 1 – Fig. 31). Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.7 Determinação da citotoxicidade em osteoblastos:

Osteoblastos foram isolados da calvária de ratos machos Wistar neonatos de 1 a 4 dias após aprovação do Comitê de Ética para o uso de animais em pesquisas da UFMG. Os animais foram sacrificados por overdose de anestésico e foi realizada uma incisão unindo os pavilhões auditivos, expondo a calota craniana. O osso da calvária foi removido imediatamente e colocado em uma solução tampão fosfato salina (PBS). O tecido ósseo foi cortado em pequenos fragmentos e digerido por 5 minutos em tripsina/EDTA, seguido de três digestões sequenciais com colagenase tipo II a 2% por 20 min cada. O sobrenadante resultante da primeira digestão com colagenase, por apresentar elevada proporção de fibroblastos, foi desprezado. Os outros dois sobrenadantes foram centrifugados por 10 min a 1400 rpm. As células resultantes foram ressuspensas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e incubado em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Após a terceira passagem no cultivo celular, foram semeados 100  $\mu$ L de osteoblastos em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/mL em uma placa de 96 poços e cultivados por 24 h.

Devido à baixa solubilidade no meio de cultura, o erlotinibe foi solubilizado no meio de cultura contendo DMSO ( $\leq 0,1\%$ ). Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação das células na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) e do erlotinibe livre (100  $\mu$ L), nas concentrações de 0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M, foi avaliada a viabilidade através do ensaio MTT, conforme descrito anteriormente (103). Em todos os experimentos, como grupo controle, foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M) e o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização do erlotinibe (Anexo 1 – Fig. 31). Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.8 Determinação do percentual de células Caco-2 em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose:

As células Caco-2 foram semeadas (500  $\mu$ L) em uma densidade de  $4 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 poços e cultivados por 72 h. Após 72 h o meio de cultura foi removido e as células foram expostas aos compostos.

Devido à baixa solubilidade apresentada pelo erlotinibe, o composto de inclusão, o erlotinibe livre e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina foram previamente solubilizados em DMSO (< 1 %). Após 48 h de incubação na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1), do erlotinibe livre e da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, nas concentrações de 0,3, 1,5, 7,5 e 37,5  $\mu$ M, as células Caco-2 foram removidas e centrifugadas a 1.300 rpm por 8 min. O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS (x 1) e ressuspensas em 50  $\mu$ L de tampão de ligação de anexina e incubadas com 1  $\mu$ L de iodeto de propídeo e 3  $\mu$ L de anexina V-FITC por 15 min à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, 200  $\mu$ L do tampão de ligação foram adicionados às células. As amostras foram analisadas por um citômetro de fluxo FACScan (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA*) dentro de 1 h após a coloração. Um total de 10.000 eventos foram avaliados para cada amostra. Os resultados foram interpretados no *software FlowJo* da seguinte forma: células que eram anexina V(-)/IP(-) (quadrante inferior esquerdo) foram consideradas vivas; anexina V(+)/IP(-) (quadrante inferior direito) foram consideradas apoptóticas precoce; anexina V(+)/IP(+) (quadrante superior direito) foram consideradas apoptóticas tardia/necróticas; e anexina V(-)/IP(+) (quadrante superior esquerdo) foram consideradas necróticas. Como grupo controle foram utilizadas células não-tratadas, o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização dos compostos, outro fármaco antitumoral (cloridrato de irinotecano) nas concentrações de 385,1, 128,4, 32,1, e 8  $\mu$ M, e peróxido de hidrogênio 1.000  $\mu$ M (Anexo 1 – Fig. 33). Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.9 Estudo *in vivo* – Preparação e implantação das esponjas:

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss com idade de 7 a 8 semanas, pesando aproximadamente 25-30 g, provenientes do Centro Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Os animais foram tratados de acordo com as orientações estabelecidas pelo Comitê de ética em experimentação animal (CEUA/UFMG, número 267/2014).

Discos de esponjas de poliéter-poliuretano com 4 mm de espessura e 12 mm de diâmetro foram implantados subcutaneamente nos camundongos para avaliar a angiogênese inflamatória. Para a inserção das esponjas os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 10  $\mu$ L/g de peso corporal da solução de ketamina/xilazina, e submetido à assepsia e à tricotomia. Em seguida, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele do animal, e assim o disco de esponja foi introduzido. Posteriormente, os animais foram monitorados para detectar quaisquer sinais de infecção no local da cirurgia, desconforto ou sofrimento. Foram utilizados 8 animais por grupo. Os grupos avaliados foram ERL, ERL:HP- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD e o veículo (DMSO 4%). A dose aplicada foi baseada na concentração de  $\approx$  2 mg/kg de ERL. Os animais receberam essa dose diariamente via gavagem durante 6 dias, sendo os animais sacrificados no 8º dia e as esponjas removidas para a avaliação da angiogênese inflamatória.

### 3.10 Determinação da quantidade de hemoglobina:

A dosagem do conteúdo de hemoglobina (Hb) quantifica indiretamente a neovascularização e tem sido utilizada como marcador de angiogênese. O teor da vascularização nas esponjas implantadas foi avaliado de acordo com o método de Drabkin (104-107). No 8º dia após a implantação das esponjas, os animais foram sacrificados e as esponjas foram pesadas e homogeneizadas em 2,0 mL do reagente de Drabkin e centrifugadas a 4°C a 1.200xg por 20 min. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22  $\mu$ m (Millipore) e colocados em placas com 96 poços. A leitura foi realizada por espectrofotometria a 540 nm e a concentração de hemoglobina determinada por comparação a uma curva de calibração padrão de hemoglobina. Os



resultados obtidos foram expressos em concentração de hemoglobina em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso úmido do implante.

### 3.11 Determinação das atividades mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG):

Para a determinação do acúmulo de neutrófilos, utilizou-se a atividade da mieloperoxidase (MPO). Inicialmente, o sedimento foi homogeneizado e ressuspendido em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M NaCl, 0,02 M  $\text{NaPO}_4$ , 0,015 M de NaEDTA), pH 5,4 e centrifugado a 12.000xg durante 10 min. Em seguida, foram retirados 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e adicionados 600  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato de sódio 0,05 M, pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). A atividade da enzima MPO no sobrenadante foi mensurada através da mudança de absorvância (densidade óptica; OD) a 450 nm utilizando 100  $\mu\text{L}$  de 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), preparada em DMSO em uma concentração final de 1,6 mM e 100  $\mu\text{L}$  de substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  na concentração final de 0,3 mM, dissolvida em tampão fosfato pH 5,4. A reação foi interrompida com a adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4 M) e quantificada colorimetricamente a 450 nm em leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em densidade óptica (OD)/mg de tecido úmido (104-107).

A quantificação de células mononucleares na esponja foi realizada avaliando-se a atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG), presente em altos níveis em lisossomas de macrófagos ativados. As esponjas foram homogeneizadas em solução de NaCl a 0,9% p/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, EUA) e centrifugadas (3.000xg, 10 min a 4°C). Amostras (100  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante resultante foram incubadas durante 10 min com 100  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo preparado em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M; pH 4,5) para se obter uma concentração final de 2,24 mM. A reação foi paralisada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). A hidrólise do substrato foi determinada por medição da absorção a 400 nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg de tecido úmido (104-107).

### 3.12 Análise dos dados:

Com relação ao experimento de Citometria foram realizados três experimentos e o n amostral em cada experimento foi de 3.

Para o cálculo do percentual de células viáveis através do ensaio MTT foi utilizado a seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Densidade ótica do grupo teste}}{\text{Média da densidade ótica do controle}} \times 100$$

Foram realizados três experimentos e o n amostral utilizado foi 6. Para calcular a concentração que inibe 50% da viabilidade celular ( $IC_{50}$ ), os resultados foram expressos como uma percentagem do controle (células incubadas somente com meio de cultura) e foram determinados graficamente a partir das curvas dose-resposta utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0.

Tabela 3: Classificação da citotoxicidade em função da viabilidade celular (108).

<b>Citotoxicidade</b>	<b>Viabilidade celular</b>
Não citotóxico	Maior que 90%
Ligeiramente citotóxico	60-90%
Moderadamente citotóxico	30-59%
Severamente citotóxico	Menor ou igual a 30%

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA e Tukey. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Para as análises dos dados *in vivo* foi utilizado o teste Anova e Newman-Keuls. Diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de P foram menores que 0,05.

#### 4. Resultados e discussão:

##### 4.1 Caracterização físico-química dos compostos:

O composto de inclusão, a mistura física e os materiais de partida utilizados foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e NOESY, estudo de solubilidade de fases e calorimetria de titulação isotérmica.

##### 4.1.1 Caracterização por Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho - FTIR:

A Figura 8 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF). Normalmente a espectroscopia de FTIR não é uma técnica muito útil para caracterizar os compostos de inclusão com CDs, uma vez que as interações hóspede:hospedeiro são baseadas em interações intermoleculares fracas (67, 70, 109-111), mas neste caso, pode-se ver fortes mudanças no espectro do composto de inclusão, o que sugere a interação molecular.

Analisando o espectro do ERL verifica-se uma banda larga entre 3350 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  relacionada a estiramentos simétricos e assimétricos de  $\nu_{\text{NH}}$ . Observa-se ainda, bandas pouco intensas entre 3078 e 3020  $\text{cm}^{-1}$  referentes a estiramentos  $\nu_{\text{C-H}}$  do anel aromático e uma banda de absorção intensa em 2750  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde ao estiramento de alcino  $\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$ . Em 1636  $\text{cm}^{-1}$ , observou-se uma banda intensa correspondente à vibração de estiramento  $\nu_{\text{C}=\text{N}}$  de anel pirimidínico. As bandas intensas em aproximadamente 1074 e 1024  $\text{cm}^{-1}$  referem-se ao estiramento  $\nu_{\text{C-O-C}}$ , as bandas entre 880 e 800  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas a  $\delta_{\text{C-H}}$  de compostos aromáticos e as bandas entre 798 e 778  $\text{cm}^{-1}$  referem-se a  $\delta_{\text{C-H}}$  e  $\delta_{\text{N-H}}$  do anel pirimidínico.

Enquanto as bandas identificadas no espectro de FTIR da HP- $\beta$ -CD foram consistentes com as bandas características previamente identificadas para essa molécula (109, 110), o espectro no infravermelho do composto de

inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) mostrou-se completamente diferente do erlotinibe livre (ERL) e da mistura física (MF). Analisando o espectro observa-se o alargamento da banda  $\nu_{\text{NH}}$  e desaparecimento da banda intensa em  $2750\text{ cm}^{-1}$  relacionada às frequências de estiramento  $\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$  de alcino do ERL. Observa-se ainda uma redução significativa de bandas referentes a estiramentos  $\nu_{\text{C-H}}$  do anel aromático na região entre  $3078$  e  $3020\text{ cm}^{-1}$  o que sugere uma possível interação hóspede:hospedeiro com o anel aromático do ERL. Também se observa uma redução significativa da banda em  $1636\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à vibração de estiramento  $\nu_{\text{C}=\text{N}}$  de anel pirimidínico. Essas observações reforçam a hipótese da inclusão do ERL em HP- $\beta$ -CD.

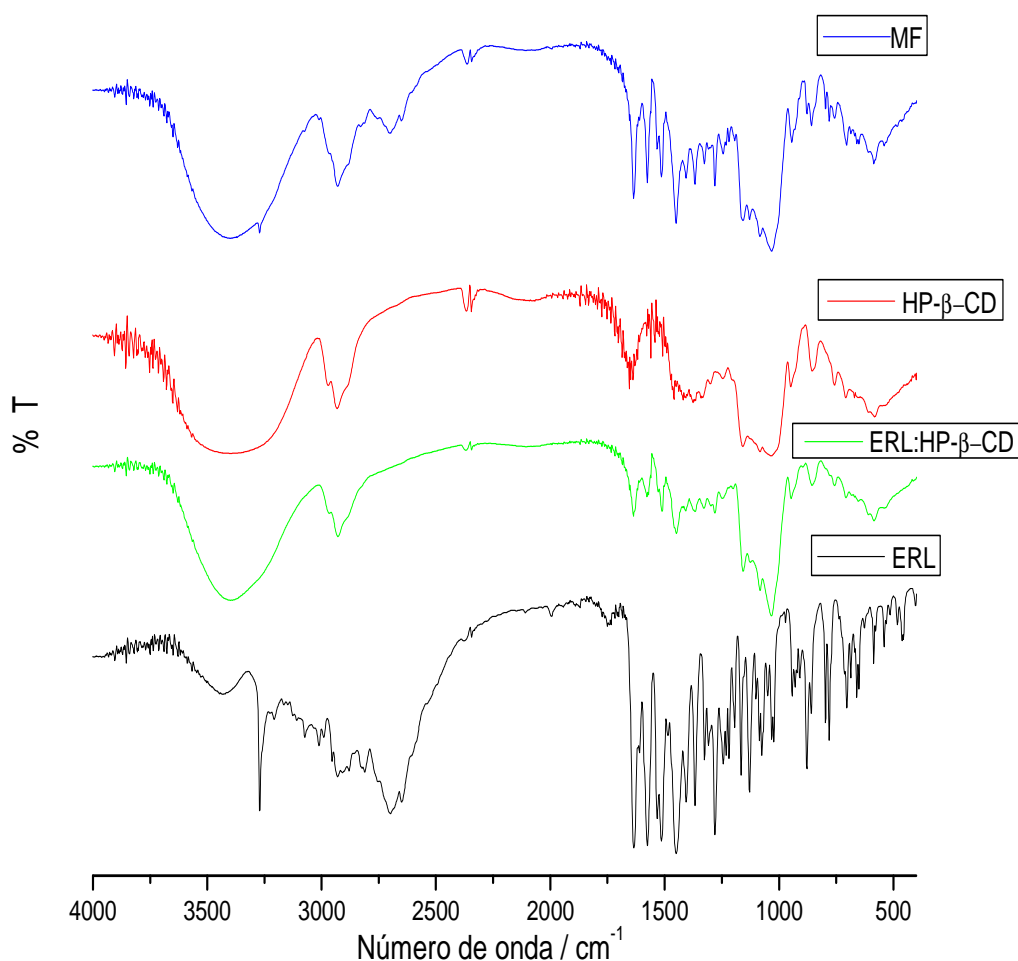


Fig. 8. Espectro de absorção na região do infravermelho em KBr do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão

erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF) entre 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Em contraste, não foram observadas interações entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD no espectro da MF. No espectro da MF foi possível observar a banda em 2750  $\text{cm}^{-1}$  relacionados às frequências de estiramento  $\nu_{\text{C}=\text{C}}$  de alcino e a banda em 1636  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à vibração de estiramento  $\nu_{\text{C}=\text{N}}$  de anel pirimidínico.

#### 4.1.2 Caracterização por Análise Térmica:

Nas Figuras 9 e 10 estão apresentadas as curvas de termodecomposição TG e DTA do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF). Analisando a curva TG do ERL, verifica-se uma estabilidade térmica até 180°C, seguida por dois eventos de perda de massa associados à termodecomposição da molécula, gerando um resíduo de 39%. A curva DTA apresenta um evento endotérmico em 227,2°C. Esse evento está associado a termodecomposição do fármaco como sugerido pela curva TG. Não foi observado o ponto de fusão do erlotinibe em torno de 233°C conforme relatado na literatura (112).

Na curva TG da HP- $\beta$ -CD, pode ser observado uma perda de 7% na faixa de 27,0 a 87,9 °C que pode ser atribuída à saída de 5 moléculas de água presentes no interior da cavidade ou das moléculas de água livre da HP- $\beta$ -CD. Em seguida, observa-se um patamar de estabilidade térmica de 87,9 até 205 °C. A partir de 205 °C verifica-se a sua termodecomposição até a geração de um resíduo de 24%. O perfil de decomposição térmica da HP- $\beta$ -CD observado na amostra está de acordo com o perfil relatado na literatura (110, 111).

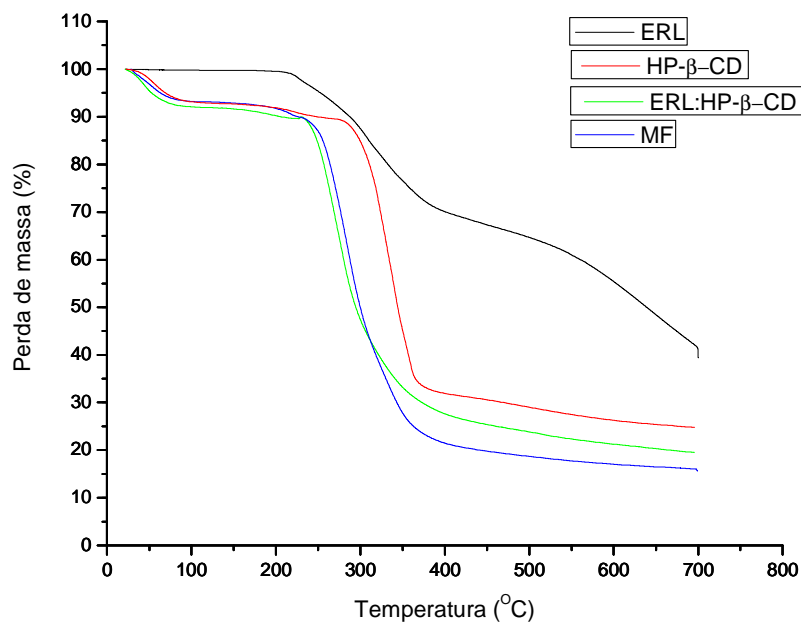


Fig. 9. Curvas TG do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF).

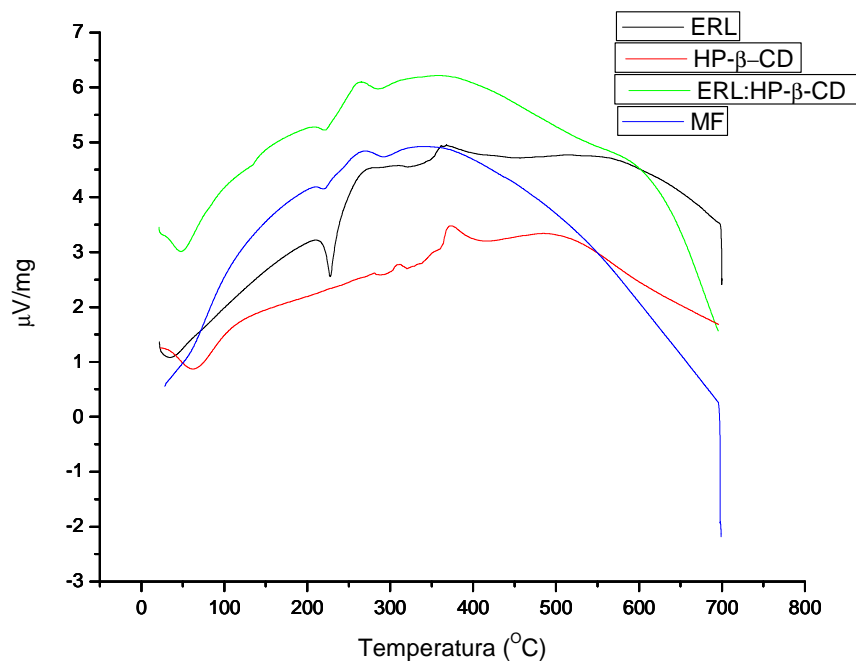


Fig. 10. Curvas DTA do erlotinibe (ERL), da hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e da mistura física entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD (MF).

Ao analisar as curvas TG e DTA do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD), mostradas nas Figuras 9 e 10 é possível observar uma clara mudança de perfil quando comparadas às curvas do ERL e da HP- $\beta$ -CD, uma vez que o composto de inclusão apresenta uma perda de massa de 8% de 22 °C até 100 °C, que foi associado a desidratação, e este foi seguido por outro evento de termodecomposição que resultou na geração de um resíduo de 20%, diferentemente do fármaco puro (ERL). Além disso, o composto de inclusão é termicamente menos estável que a HP- $\beta$ -CD. Observa-se ainda a formação de mais resíduo (20%) do composto de inclusão quando comparado à mistura física (15%), sugerindo a interação hóspede:hospedeiro no estado sólido.

#### 4.1.3 Caracterização por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear - *RMN 2D $^1H$ - $^1H$ NOESY*:

O experimento bidimensional NOESY é uma importante técnica para demonstrar a formação de compostos de inclusão com CDs, porque é possível monitorar interações espaciais em torno de 5 Å (67, 70, 101).

A Figura 11 e 12 apresentam o mapa de contornos 2D-NOESY e a expansão da região correspondente aos hidrogênios, da região dos anéis aromáticos do erlotinibe. Analisando o mapa de contornos supracitado na região em torno de  $\delta$  3,7–3,9 ppm da HP- $\beta$ -CD com a região em torno de anéis aromáticos de  $\delta$  7,2 e 8,4 ppm do erlotinibe é possível observar a presença de manchas de correlação indicativas de acoplamento dipolar entre os hidrogênios do anel aromático do erlotinibe e dos hidrogênios da HP- $\beta$ -CD, sugerindo a interação efetiva do fármaco com a cavidade da ciclodextrina. O mapa de contorno 2D-NOESY (Fig. 11), mostrou correlações cruzadas entre os picos hidrogênios 4 e 8 do anel aromático do erlotinibe (na região de  $\delta \approx 7,2$ -8,4) com os hidrogênios H3 e H5 da HP- $\beta$ -CD (Fig. 12).

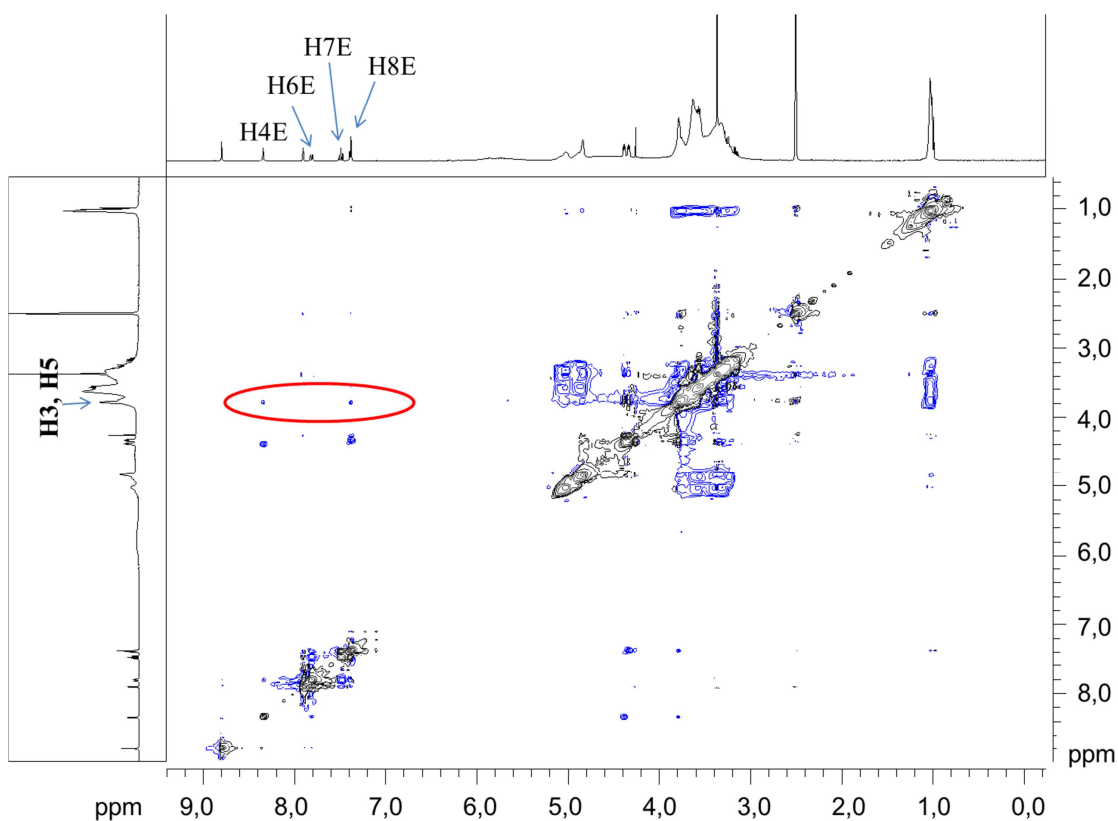


Fig. 11. Mapa de contornos NOESY do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (DMSO- $d_6$ , 400MHz).

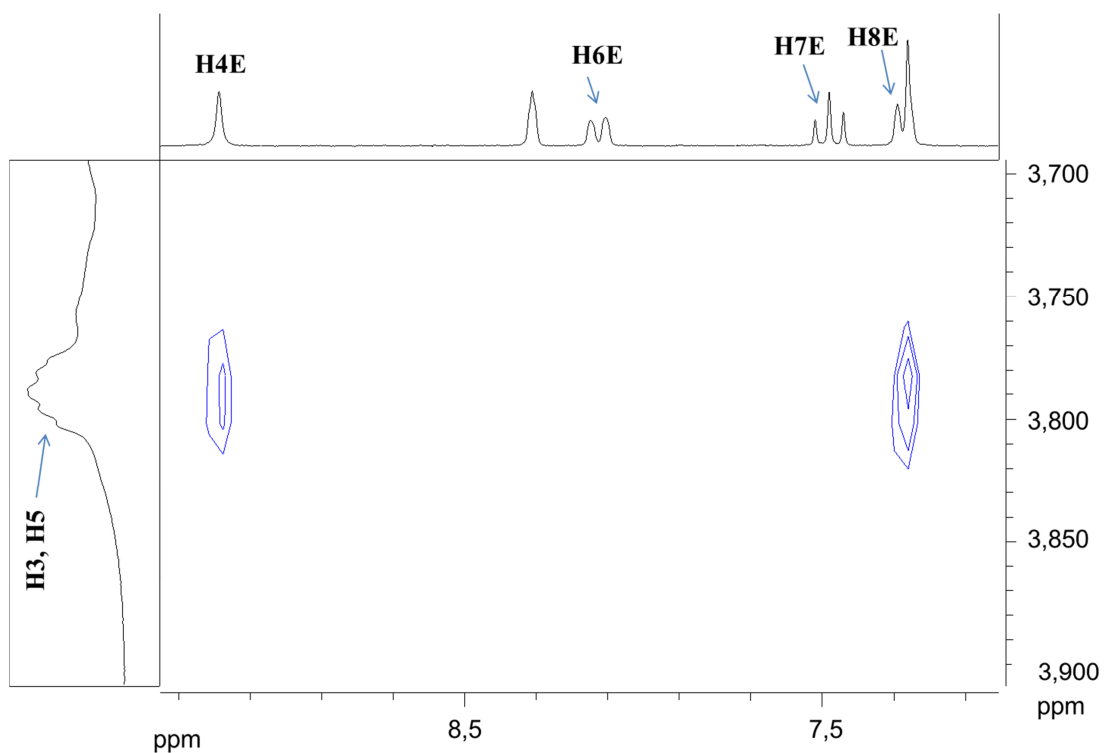


Fig. 12. Seção expandida entre f1:  $\delta$  7,2 e 8,4 e f2:  $\delta$  3,70 e 3,9 ppm do Mapa de contornos NOESY do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (DMSO- $d_6$ , 400MHz).



Com base nos resultados do RMN 2D-NOESY é hipotetizado que a inclusão do ERL na HP- $\beta$ -CD ocorre conforme ilustrado na Figura 13.

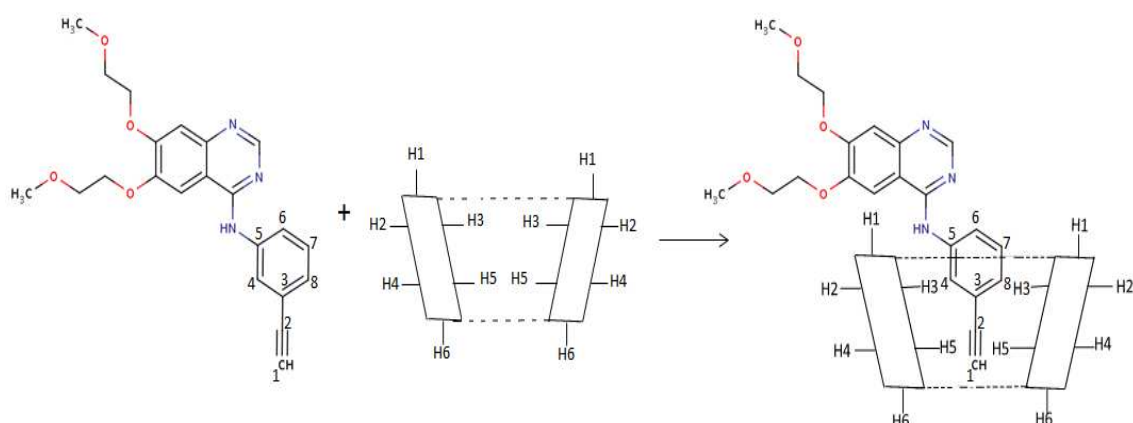


Fig. 13. Modelo de inclusão molecular proposto do ERL dentro da cavidade da HP- $\beta$ -CD baseado nos resultados de RMN 2D-NOESY.

#### 4.1.4 Estudo de solubilidade de fases:

O diagrama de solubilidade de fase é uma técnica muito utilizada para demonstrar as alterações na solubilidade de fármacos quando esses interagem com CDs. Além disso, essa técnica é amplamente utilizada para determinar a constante de formação hóspede:hospedeiro em solução (110, 113).

Analisando-se os perfis de solubilidade de fase do ERL e da HP- $\beta$ -CD (Fig. 14) é possível observar um aumento na solubilidade do ERL no sistema devido à interação molecular com a HP- $\beta$ -CD. O diagrama ainda mostra que a solubilidade do ERL aumenta linearmente em função da concentração da HP- $\beta$ -CD. O ERL formou complexos solúveis com a HP- $\beta$ -CD em HCl (0,1 M) mostrando um típico diagramas de solubilidade do tipo  $A_L$  (75), em que a constante de formação do composto de inclusão foi  $K_{S1:1} = 426 \pm 49$  e o valor de  $S_0$  foi  $178,9 \mu\text{M}$  (Fig. 14). O valor da  $K_s$  está na maioria das vezes entre 50 e  $2.000 \text{ M}^{-1}$ , com um valor médio de  $490 \text{ M}^{-1}$  (73). Um valor de  $K_s$  entre 200 e  $5.000 \text{ M}^{-1}$  é considerado como o mais adequado para a melhoria na solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (75, 114).

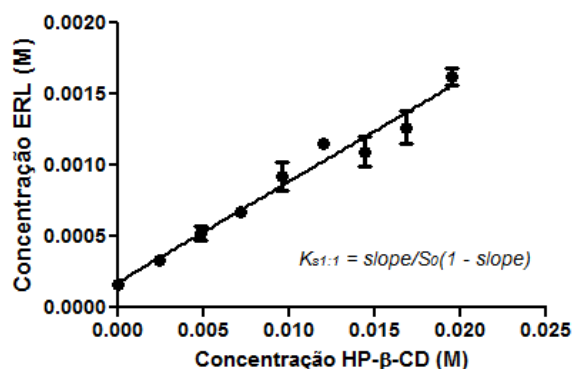


Fig. 14. Diagrama de solubilidade de fases do composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD a 25°C.

#### 4.1.5 Caracterização por calorimetria de titulação isotérmica:

A estequiometria ( $N$ ) do composto em solução, bem como os seus parâmetros termodinâmicos de interação (entalpia  $\Delta H^\circ$ , entropia  $T\Delta S^\circ$ , a constante de equilíbrio  $K_{eq}$  e energia livre de Gibbs  $\Delta G^\circ$ ) foram determinados por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

A Figura 15 mostra o experimento realizado a 25°C, no qual foi utilizado o modelo matemático denominado *isoterma de Wiseman* para fazer o ajuste não-linear dos pontos das curvas calorimétricas e determinar os parâmetros termodinâmicos da interação (115).

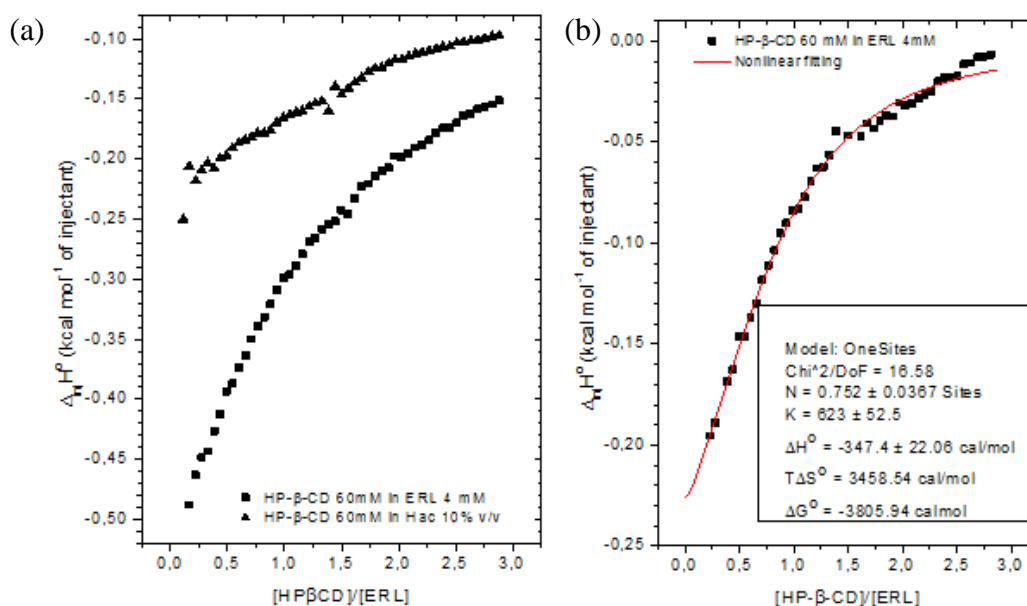
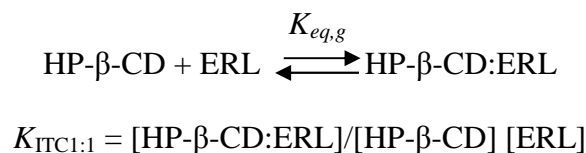


Fig. 15. Curvas calorimétricas (ITC) para (a) HP- $\beta$ -CD 60,0 mM em solução aquosa de ácido acético a 10% v/v (triângulo preenchido) e HP- $\beta$ -CD 60,0 mM em solução aquosa de ERL 4 mM (quadrado preenchido).

em ERL 4,0 mM (quadrado preenchido); (b) após a subtração da curva de titulação do branco e ajuste não-linear por *Wiseman Isotherm* (linha de preenchimento).

O ajuste sigmóide (Fig. 15b) mostrou um ponto de equivalência na proporção molar de aproximadamente  $N = 0,75$ , sugerindo a ocorrência de uma estequiometria de 1:1 (116). Entretanto, não necessariamente exclui a existência de outras estequiometrias do composto de inclusão em condições de equilíbrio químico.

Com base na estequiometria de 1:1, a constante de equilíbrio calculada com base no experimento de ITC,  $K_{ITC1:1}$ , referindo-se à formação do composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD pode ser descrita como:



Analisando-se os dados da Figura 15, pode-se observar que a interação global entre a HP- $\beta$ -CD e o ERL é ligeiramente exotérmica, acompanhada por um grande aumento de entropia, levando a uma constante de equilíbrio moderada ( $K_{ITC1:1} = 623 \pm 53$ ), se comparada a outros sistemas hóspedes:hospedeiros (117). O valor da constante obtida no experimento de ITC está próximo do valor encontrado no experimento de solubilidade de fase.

Mudanças de entalpia podem ser atribuídas às ligações das moléculas de água ricas em entalpia liberadas da cavidade de CD em conjunto com as moléculas de água a granel (116), e pela formação simultânea de interações de van der Waals entre o anel aromático do ERL e a cavidade da HP- $\beta$ -CD. A variação positiva de entropia foi atribuída à elevada dessolvatação das moléculas com consequente ganho no grau de liberdade de translação e rotação das moléculas de água (118).

#### 4.2 Teste de citotoxicidade em células Caco-2:

Foram realizados testes de citotoxicidade dos compostos em células de linhagem de carcinoma de cólon humano Caco-2.

Após 24, 48, 72 e 96 h (Fig. 16) de incubação das células na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e do erlotinibe livre (ERL), nas concentrações de 0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M, foi avaliada a viabilidade das células Caco-2 pelo ensaio MTT. Como grupo controle foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M) e o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização dos compostos (Anexo 1 – Fig. 29). O percentual de viabilidade dos compostos apresentados na Figura 16 foi calculado com base nos seus respectivos controles de DMSO (considerados 100% viáveis).

Também foi realizado um estudo de citotoxicidade nas células Caco-2 com um composto de ERL e  $\beta$ -CD, na razão molar de (1:1). Como grupos controle foram utilizados células não-tratadas,  $\beta$ -ciclodextrina e o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização do ERL (Anexo 1 – Fig. 30).

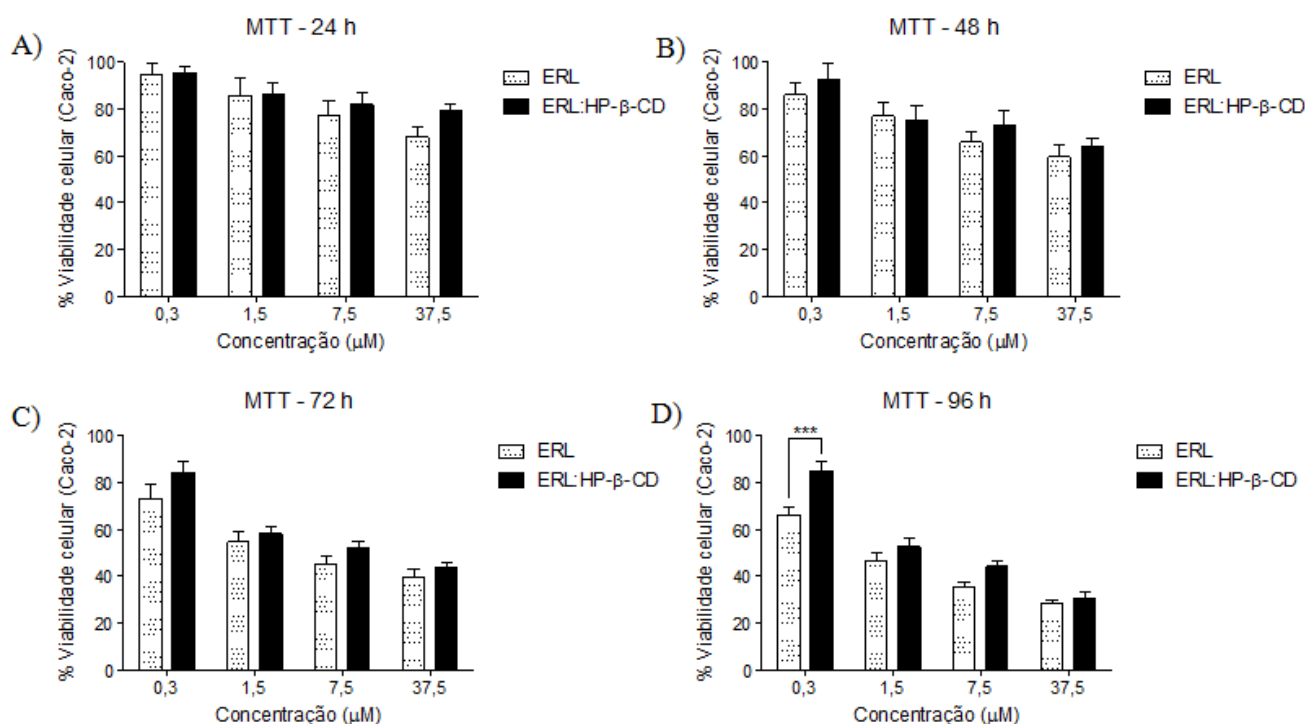


Fig. 16. Teste de citotoxicidade, através do ensaio MTT, em células Caco-2 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações. \*\*\* p < 0,001.

Os resultados de MTT, apresentados na Figura 16, mostram que o ERL e o composto de inclusão atuam de forma dose e tempo-dependentes, apresentando maior citotoxicidade nas maiores concentrações avaliadas e no maior tempo de incubação com o fármaco.

A partir da análise dos dados também pode-se concluir que o ERL e o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD apresentam citotoxicidade semelhante na linhagem de Caco-2.

Também foi determinada a concentração necessária para inibir o crescimento das células Caco-2 em 50% ( $IC_{50}$ ) nos diferentes tempos avaliados (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade citotóxica dos compostos sobre a célula tumoral Caco-2 (ensaio MTT).

Tempo	$IC_{50}^a$ ( $\mu$ M) Caco-2 <sup>b</sup>	
	Erlotinibe	Erlotinibe:HP- $\beta$ -CD
72 h	2,9	11,6
96 h	1,1	2,9

<sup>a</sup>  $IC_{50}$  concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, conforme determinado pela curva dose-resposta.

<sup>b</sup> Células de carcinoma de cólon humano.

As  $IC_{50}$  para os tempos de 24 e 48 h de ação do ERL e do composto de inclusão não foram determinadas porque na mais alta concentração testada (37,5  $\mu$ M) não foi observada 50% de inibição. Concentrações mais altas não foram usadas devido à grande precipitação do ERL no meio de cultura.

Alguns estudos avaliaram o efeito do ERL livre sobre a proliferação de células tumorais Caco-2.

Kaulfuss *et al.* (31) avaliaram o efeito do ERL (0,01; 0,1; 1,0 e 10,0  $\mu$ g/mL) sobre a proliferação de células Caco-2 após 24, 48 e 72 h. Os resultados mostram que o ERL foi capaz de inibir o crescimento celular de forma dose e tempo-dependentes. A redução na viabilidade celular quando comparada ao controle (células sem tratamento) somente foi significativa na concentração de 10,0  $\mu$ g/mL ( $\approx$  23,3  $\mu$ M) após 48 e 72 h. O efeito do ERL, aqui

apresentado, sobre as células Caco-2 também se apresentou dose e tempo-dependentes e com pequena citotoxicidade no tempo de 24 h.

Lemos *et al.* (20) avaliaram o efeito do ácido fólico sobre a expressão de uma proteína que causa resistência ao ERL. Para avaliar esse efeito, utilizaram-se modelos de células Caco-2. Os dados mostram que a depleção do ácido fólico, pode reduzir os efeitos do ERL, por mecanismos dependentes ou independentes da proteína avaliada. Os dados de IC<sub>50</sub> do erlotinibe após 72 h de contato sobre as células Caco-2 apresentaram valores que variaram de aproximadamente 0,4 µM a 1,0 µM. Esses valores estão abaixo dos valores aqui apresentados (2,9 µM), talvez devido ao fato do ácido fólico ter contribuído para essa redução (Tabela 4).

Bijnsdorp *et al.* (119) também avaliaram a citotoxicidade do ERL sobre células tumorais Caco-2. O ensaio utilizado foi da sulforrodamina B que é utilizada para a determinação da densidade de células, baseando-se na medição do teor de proteína celular. O ERL foi capaz de inibir a proliferação das células Caco-2, apresentando IC<sub>50</sub> de 0,3 µM após 72 h. Os dados aqui apresentados, juntamente com os dados apresentados por Bijnsdorp *et al.* (119) mostram a efetividade do ERL sobre as células Caco-2 (Tabela 4).

Estudos utilizando outros compostos de inclusão em linhagens celulares tumorais apresentaram resultados semelhantes ao presente estudo, ou seja, molécula livre e o composto de inclusão apresentaram citotoxicidades semelhantes. Nadzri *et al.* (120) avaliaram o efeito da inclusão de zerumbona (molécula obtida de extrato de planta) em HP-β-CD sobre as células tumorais HepG2 (ensaio de MTT). O composto de inclusão apresentou o mesmo efeito que a molécula livre.

Qiu *et al.* (109) avaliaram o efeito da inclusão de um composto natural (barbigerona) em HP-β-CD sobre 2 linhagens tumorais (HCT116 e HepG2) (ensaio de MTT). A citotoxicidade do composto de inclusão foi similar ao da molécula livre.

Șoica *et al.* (121) avaliaram o efeito da inclusão de betulina (terpeno) em uma γ-CD modificada sobre uma linhagem tumoral de melanoma - B164A5 (ensaio de MTT). A citotoxicidade do composto de inclusão foi similar ao da molécula livre.

---

Apesar do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) não ser mais citotóxico que a molécula livre (ERL), a HP- $\beta$ -CD foi capaz de aumentar a solubilidade do fármaco, o que pode favorecer no desenvolvimento de novas formulações para o tratamento de carcinomas que superexpressam o EGFR. Estes resultados sugerem que a HP- $\beta$ -CD pode ser utilizada como carreadora de agentes antitumorais insolúveis em água.

#### 4.3 Teste de citotoxicidade em células A431:

Foram realizados testes de citotoxicidade dos compostos em linhagem celulares de carcinoma epidermóide humano - A431.

Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação das células na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e do erlotinibe livre (ERL), nas concentrações de 0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M, foi avaliada a viabilidade das células A431 pelo ensaio MTT. Como grupos controle foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M) e o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização do ERL (Anexo 1 – Fig. 31). O percentual de viabilidade dos compostos apresentados na Figura 17 foi calculado com base nas células não-tratadas (consideradas 100% viáveis).

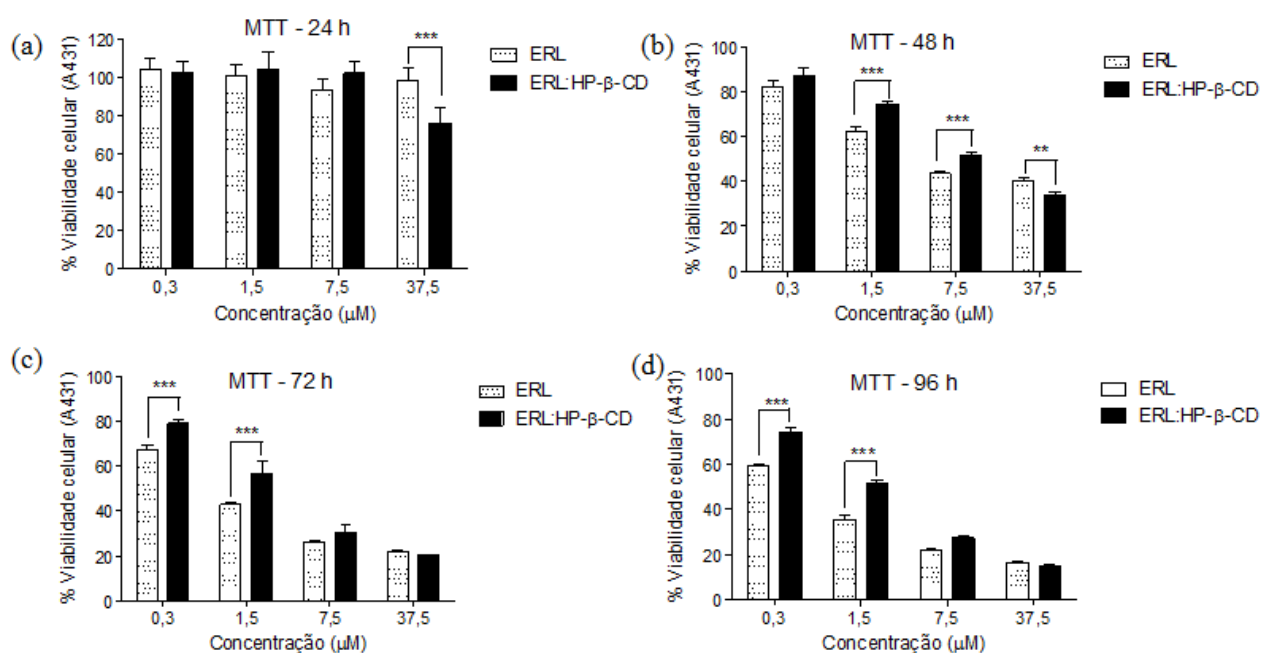


Fig. 17. Teste de citotoxicidade, através do ensaio MTT, em células A431 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do

composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A partir da análise da Figura 17 (a), (b), (c) e (d) pode-se concluir que o ERL e o composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) agem sobre as células A431 de forma dose e tempo-dependentes. Percebe-se a partir dos dados que a citotoxicidade do ERL é superior ao composto de inclusão nas menores concentrações. Entretanto, na mais alta concentração esse efeito se inverte, provavelmente devido ao fato da HP- $\beta$ -CD aumentar a solubilidade e a disponibilidade da molécula.

O ERL atua inibindo a proliferação celular, através da inibição da progressão do ciclo celular, prevenindo a transição das células da fase G1 para a fase S do ciclo celular (37).

A concentração necessária para inibir o crescimento das células A431 em 50% também foi determinada nos diferentes tempos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade citotóxica dos compostos sobre a célula tumoral A431 (ensaio MTT).

Tempo	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M) A431 <sup>b</sup>	
	Erlotinibe	Erlotinibe:HP- $\beta$ -CD
48 h	5,5	8,8
72 h	1,1	2,4
96 h	0,7	1,7

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50%, conforme determinado pela curva dose-resposta.

<sup>b</sup> Células de carcinoma epidermóide.

As IC<sub>50</sub> para os tempos de 24 h de ação do ERL e do composto de inclusão não foram determinadas porque na mais alta concentração testada (37,5  $\mu$ M) não foi observada 50% de inibição. Concentrações mais altas não foram usadas devido à grande precipitação do ERL no meio de cultura.

Os dados do ensaio de MTT mostraram que o tratamento com ERL (1,5  $\mu$ M) durante 72 h, causou uma redução da viabilidade celular > 50%. Estes dados de citotoxicidade do presente estudo (Fig. 7) estão de acordo com os dados descritos na literatura por Ling *et al.* (37) e Yamasaki *et al.* (38). De



acordo com Ling *et al.* (37) o tratamento das células A431 com 2  $\mu\text{M}$  de ERL durante 72 h causou uma redução na viabilidade celular superior a 50%. De acordo com Yamasaki *et al.* (38) o valor da  $\text{IC}_{50}$  para o ERL após 72 h foi de 1,53  $\mu\text{M}$ . No presente estudo, os valores das  $\text{IC}_{50}$  para o ERL nas células A431, após 72 e 96 h, foram respectivamente, 1,1 e 0,7  $\mu\text{M}$ . Estudo prévio também mostra um valor de  $\text{IC}_{50}$  de 1,21  $\mu\text{M}$  para o ERL (40). Além disso, o valor da  $\text{IC}_{50}$  obtido após o tratamento de 8 dias com ERL foi de 0,3  $\mu\text{M}$  (33). Essa diferença pode ser devido ao longo período de tratamento em comparação com o presente estudo que durou no máximo 4 dias.

Estudos anteriores investigaram o efeito da inclusão de moléculas que exibem atividade antitumoral sobre a proliferação de células A431. Por exemplo, quando HP- $\gamma$ -CD foi investigada em relação à atividade antitumoral do ácido betulínico em células A431, a HP- $\gamma$ -CD não aumentou a atividade antitumoral da droga, no entanto, aumentou a dissolução do ácido betulínico no meio de cultura (122). Quando a HP- $\beta$ -CD foi avaliada no presente estudo, a melhoria da dissolução do ERL no meio de cultura, também foi observado. A maior citotoxicidade associada com o composto de ERL:HP- $\beta$ -CD em comparação com o fármaco livre na concentração mais elevada (37,5  $\mu\text{M}$ ) pode ser devido a uma melhor dissolução das moléculas no meio de cultura celular. As CDs têm sido demonstradas por aumentarem a solubilidade aquosa de drogas e o seu transporte para a membrana celular, proporcionando assim, uma maior citotoxicidade para os compostos de inclusão quando incubadas com células tumorais (67). As CDs atuam removendo colesterol da membrana plasmática levando a modificações na permeabilidade da membrana, alterando assim, a sinalização e o transporte de várias moléculas para as células. Os estudos também demonstraram que o aumento na permeabilidade da membrana citoplasmática é dependente da concentração da CD (123, 124). Além disso, as CDs podem solubilizar alguns lípides específicos das membranas biológicas através da formação de compostos de inclusão, conduzindo a um aumento na permeabilidade da membrana e o transporte de fármacos (125).

---

#### 4.4 Teste de citotoxicidade em osteoblastos:

Foram realizados testes de citotoxicidade dos compostos em linhagem celular normal (osteoblastos).

Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação das células na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) e do erlotinibe livre (ERL), nas concentrações de 0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M, foi avaliada a viabilidade dos osteoblastos através do ensaio MTT. Como grupos controle foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3; 1,5; 7,5 e 37,5  $\mu$ M) e o solvente (DMSO) nas mesmas concentrações utilizadas para solubilização do ERL (Anexo 1 – Fig. 32). O percentual de viabilidade dos compostos apresentados na Figura 18 foi calculado com base nas células não-tratadas (consideradas 100% viáveis).

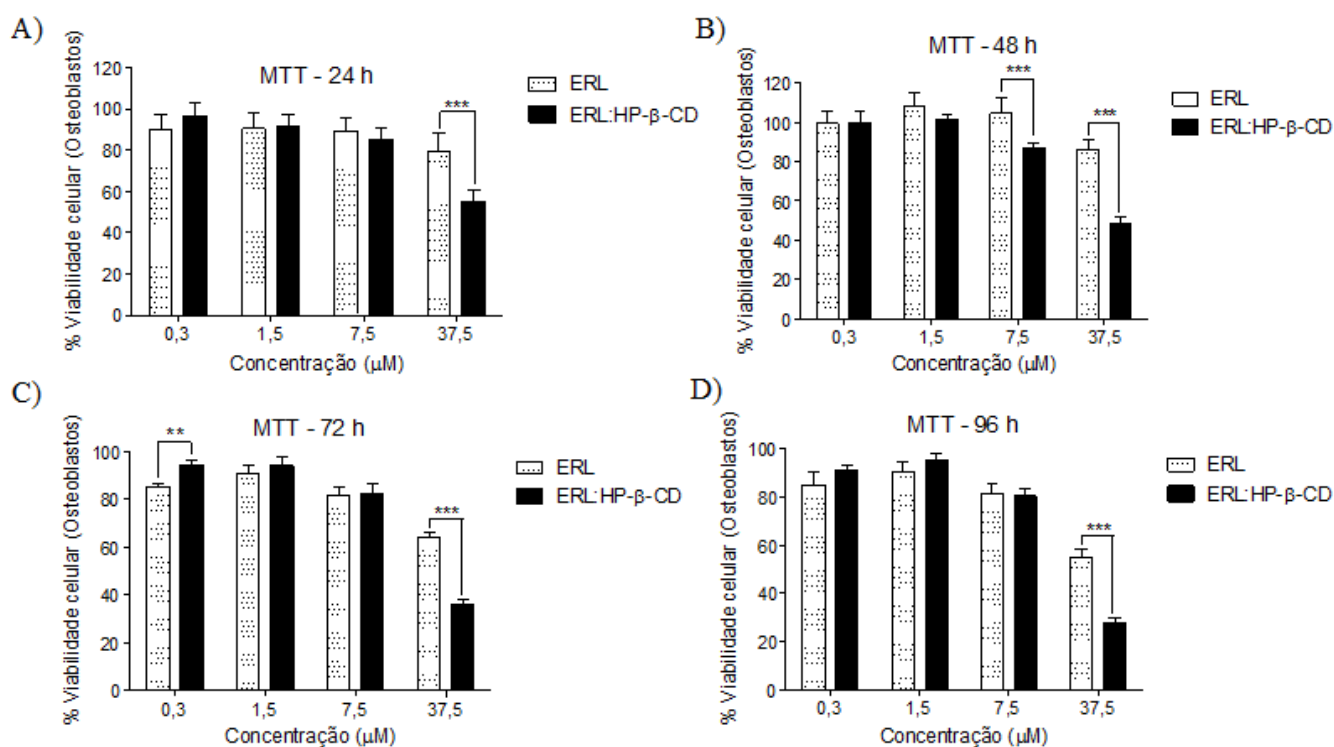


Fig. 18. Teste de citotoxicidade, através do ensaio MTT, em osteoblastos após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (ERL:HP- $\beta$ -CD) em diversas concentrações. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

Os osteoblastos são células do tecido ósseo, que expressam o EGFR, que quando ativado, estimula a proliferação celular (26). Os resultados de MTT,

apresentados na Figura 18, demonstram uma maior citotoxicidade do composto de inclusão (ERL:HP- $\beta$ -CD) na maior concentração avaliada, isso se deve provavelmente devido ao fato da HP- $\beta$ -CD aumentar a solubilidade e a disponibilidade da molécula. Observa-se ainda que tanto o erlotinibe livre como o composto de inclusão mostraram ser dose e tempo-dependentes.

A literatura carece de dados sobre a atividade do ERL sobre os osteoblastos. Entretanto, sabe-se que os compostos inibem a proliferação celular de forma diferente, dependendo da linhagem celular (109, 122). O efeito do ERL aqui apresentando também apresentou atividade diferente dependendo da linhagem celular avaliada, sendo menos citotóxico para os osteoblastos em relação às células tumorais (Caco-2 e A431).

Além disso, Björkelund *et al.* (126) mostraram que os inibidores de tirosina quinase afeta a cinética de interação entre o EGF e o EGFR, e essa alteração é diferente dependendo do fármaco e da célula avaliada. Os inibidores de tirosina quinase inibem o crescimento celular de forma diferente dependendo da linhagem celular, corroborando com os dados aqui apresentados.

#### 4.5 Determinação do percentual de células Caco-2 em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose:

Foram realizados testes de Citometria de fluxo (anexina V-FITC/IP) dos compostos em linhagem tumoral de Caco-2 para determinação do percentual de células em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose. Devido à baixa solubilidade apresentada pelo erlotinibe, os compostos foram solubilizados em DMSO (< 1%).

Após 48 h de incubação na presença do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina e do erlotinibe livre nas concentrações de 0,3, 1,5, 7,5 e 37,5  $\mu$ M foi realizada a marcação com anexina V-FITC e IP. As amostras foram analisadas por Citometria e os dados estão apresentados na Figura 19. Como grupo controle foram utilizadas células não-tratadas, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (0,3, 1,5, 7,5 e 37,5  $\mu$ M), o solvente (DMSO), outro fármaco antitumoral (cloridrato de irinotecano) nas concentrações de 385,1, 128,4, 32,1, e 8  $\mu$ M, e o peróxido de hidrogênio 1000  $\mu$ M (Anexo 1 – Fig. 33).

---

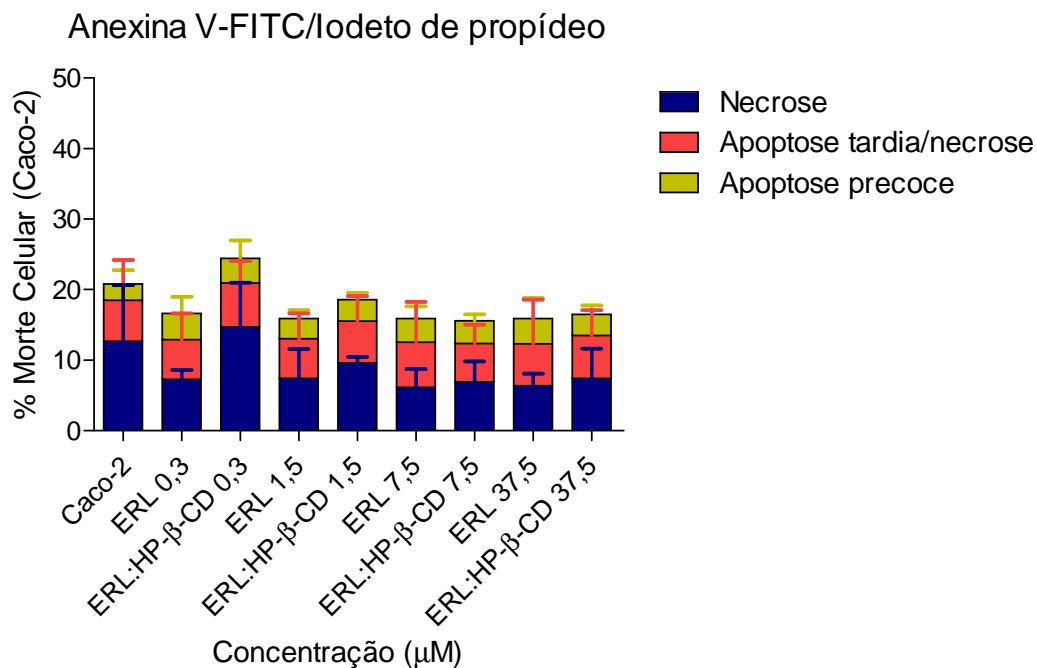


Fig. 19. Tipo de morte celular em Caco-2 após 48 h na presença do erlotinibe livre (ERL) e do composto de inclusão erlotinibe:hidroxipropil-β-ciclodextrina (ERL:HP-β-CD) em diversas concentrações.

Os resultados obtidos através do ensaio de anexina V-FITC/IP, apresentados na Figura 19, demonstram que o erlotinibe livre e o composto de inclusão não foram capazes de aumentar o percentual de morte celular e nem o percentual de células apoptóticas.

Apesar do presente estudo não mostrar aumento no percentual de morte celular dos compostos testes, Kaulfuss *et al.* (31) mostraram que o erlotinibe foi capaz de aumentar a taxa de apoptose de células Caco-2. Além disso, o erlotinibe se comportou de forma dose dependente e o aumento na taxa de apoptose foi relacionado com a ativação das caspase-3/caspase-7. Segundo Bijnsdorp *et al.* (119), os inibidores de EGFR têm sido mostrados para estimular a indução de apoptose em vários tipos de células. No entanto, em linhagens tumorais de câncer de cólon (Caco-2), o erlotinibe não induziu a morte celular, conforme demonstrado através da análise do ciclo celular. A ausência de morte celular é suportada pela ausência de ativação de caspases após o tratamento com erlotinibe. O erlotinibe parece atuar mais no ciclo celular, prendendo as células na fase  $G_0/G_1$  do que induzindo a apoptose (119).

Alguns autores mostram que o erlotinibe foi capaz de estimular a indução de apoptose em vários tipos de células. Kim *et al.* (33) avaliaram o efeito do erlotinibe sobre as células A431. O erlotinibe (0,3  $\mu\text{M}$ ) após 2 h de contato sobre A431 foi capaz de aumentar o percentual de células apoptóticas. Segundo Ling *et al.* (127) a indução de apoptose pelo erlotinibe está relacionada com a ativação de caspases, e comporta-se de forma dose e tempo-dependente. Ao avaliar o efeito do erlotinibe (0,1  $\mu\text{M}$ ) sobre a indução de apoptose através da marcação com anexina V-FITC/IP utilizando a técnica de Citometria, por 24 h sobre linhagem de carcinoma pulmonar, obteve um aumento no percentual de células em apoptose tardia/necrose para 23% e um aumento no percentual de células em apoptose precoce para 6%. Lu *et al.* (128) também mostraram que o erlotinibe em altas concentrações (50  $\mu\text{M}$ ) após 48 h de ação, foi capaz de aumentar significativamente a taxa de células apoptóticas.

Entretanto, outros estudos mostraram um pequeno aumento ou ausência de efeito do erlotinibe sobre a indução de apoptose. Segundo Giovannetti *et al.* (129) o erlotinibe foi capaz de aumentar o percentual de apoptose para 8,0 e 6,5 em diferentes linhagens de células de câncer de pulmão de células não pequenas. Emlet *et al.* (130) através de estudos multiparamétricos de Citometria de fluxo mostraram que o erlotinibe não foi capaz de aumentar a apoptose substancialmente. Além disso, os efeitos inibitórios no crescimento celular podem ser devido à parada no ciclo celular em vez de apoptose. Li *et al.* (131) e Zhang *et al.* (132) também mostraram que o erlotinibe não foi capaz de aumentar o percentual de células apoptóticas.

Alguns estudos na literatura explicam que o fato de algumas células apresentarem resistência ao erlotinibe e não entrarem em apoptose se deve a presença de mutações no EGFR que pode estar associado à ativação persistente da via Akt (133). Entretanto, Orzáez *et al.* (134) avaliaram por Citometria (anexina V-FITC/IP) o efeito do erlotinibe sobre linhagens tumorais sensíveis e resistentes ao erlotinibe, obtendo pouco efeito da molécula sobre o percentual de células apoptóticas e de morte celular.

---

#### 4.6 Estudo *in vivo* - Determinação da quantidade de hemoglobina (Hb) e das atividades da mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG):

Os implantes das esponjas foram considerados bem tolerados pelos camundongos no presente estudo. Por exemplo, não foram identificados sinais de infecção ou rejeição no local do implante durante o período de incubação de 8 dias. Os exames *in situ* das matrizes de esponjas também mostraram vascularização visível e integração dos implantes com os tecidos do hospedeiro. Estudos prévios mostram que a detecção dos níveis de hemoglobina (Hb) nos implantes é um índice bem validado de neovascularização e/ou um marcador indireto da angiogênese (104, 107). A angiogênese é um importante requisito para o crescimento de tumores e metástases (46, 104, 107) e, em 2004, a *Food and Drug Administration* (FDA) declarou que as terapias antiangiogênicas deveriam ser consideradas como uma modalidade de tratamento do câncer (135). No presente estudo, o teor de Hb das matrizes de esponjas implantadas nos grupos tratados com ERL:HP- $\beta$ -CD e ERL foi menor em comparação com os grupos de HP- $\beta$ -CD e DMSO, sendo essa redução superior a 50% em relação ao veículo (DMSO) (Fig. 20).

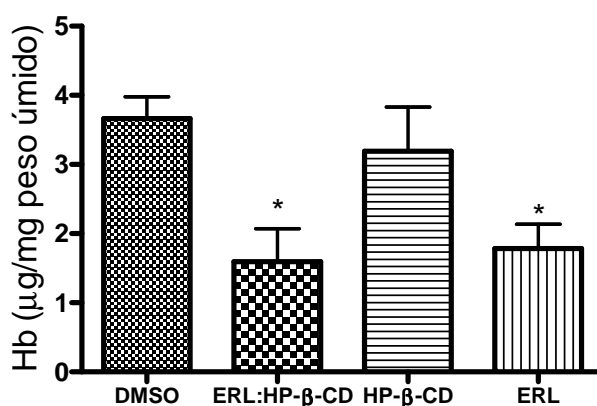


Fig. 20. Teor de hemoglobina (Hb) dos implantes nos grupos tratados com ERL, HP- $\beta$ -CD, ERL:HP- $\beta$ -CD e DMSO 4% (veículo). \*  $p < 0,05$ .

Os resultados apresentados na Figura 20 são consistentes com os efeitos anti-angiogênicos relatados na literatura para o ERL (46), e também indicam que o composto de inclusão manteve a atividade anti-angiogênica da molécula (136). Segundo a literatura, os efeitos anti-angiogênicos

apresentados pelo ERL se devem a redução na expressão de genes pro-angiogênicos, redução na proliferação celular e densidade vascular (46).

A atividade anti-inflamatória tem sido associada com a terapia anti-angiogênica, mediada pela inibição da produção de NAG e MPO. Além disso, a atividade anti-inflamatória pode contribuir para a eficácia do tratamento contra o câncer. A MPO é um componente inflamatório que contribui para a carcinogênese via ativação de pró-carcinógenos para formar intermediários genotóxicos, e através da potencialização de xenobióticos carcinogênicos (137). NAG é outro componente inflamatório cuja expressão tem sido encontrada por estar significativamente mais elevada nos tecidos tumorais e poder promover metástases (138).

O componente inflamatório do tecido fibrovascular induzido pela implantação subcutânea de uma matriz de esponja pode ser alterado em resposta à administração de certos fármacos. Para avaliar os potenciais efeitos do composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD no recrutamento/ativação de neutrófilos e macrófagos, foram analisadas a atividade MPO e a atividade NAG (Fig. 21). A especificidade da atividade dessas enzimas inflamatórias para a avaliação das populações de células inflamatórias é suportada por outras publicações (104, 105).

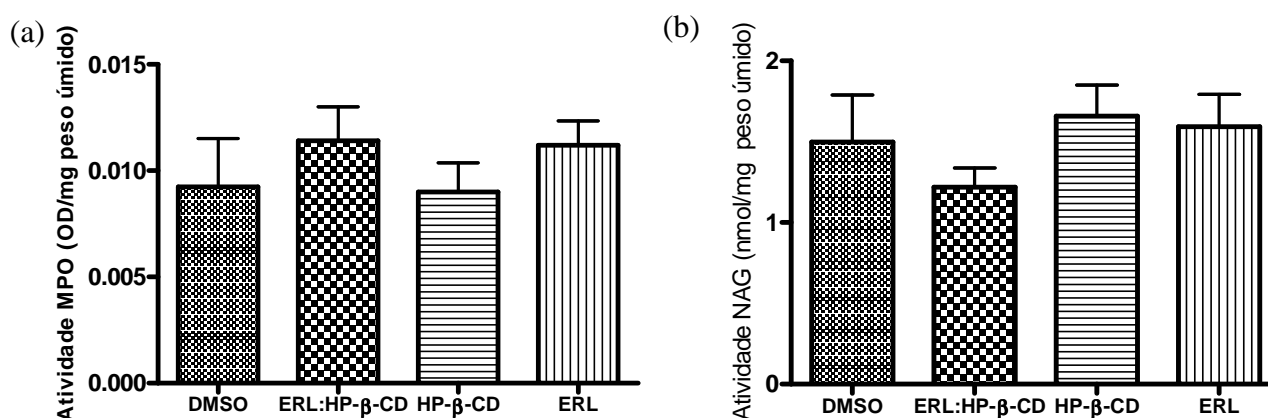


Fig. 21 Níveis de (a) neutrófilos e (b) acumulação de monócitos/macrófagos de acordo com os níveis de atividade de MPO e NAG, respectivamente, que foram detectados nas matrizes das esponjas dos grupos tratados [ERL, HP- $\beta$ -CD, ERL:HP- $\beta$ -CD, e o grupo de controle (DMSO 4%)].

A partir da análise dos dados de atividade de MPO e NAG pode-se concluir que não houve diferenças nos níveis de atividade dessas enzimas detectadas entre os grupos avaliados (Fig. 21), excluindo assim um efeito anti-inflamatório desses compostos neste sistema experimental *in vivo*. Entretanto, o ERL e o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD não estimulam a inflamação, o que é um resultado positivo para uma potencial aplicação do composto de inclusão para o tratamento do câncer. Além disso, de acordo com Yano *et al.* (139), a prednisolona livre tem a mesma atividade de MPO da prednisolona incluídas em  $\alpha$ -CD.

Os resultados *in vitro* e *in vivo* do presente estudo demonstram que o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD apresentou atividade antitumoral, através da expressiva citotoxicidade nas células tumorais (A431 e Caco-2) e atividade anti-angiogênica, o que sugere o seu potencial uso para o desenvolvimento de formulações para o tratamento do câncer.

---



## 5. Conclusões e perspectivas futuras:

A caracterização físico-química mostrou que a formação do composto de inclusão entre o ERL e a HP- $\beta$ -CD é preferencialmente na razão molar de 1:1, com aumento na solubilidade. O composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD apresentou maior citotoxicidade que o ERL livre na maior concentração avaliada (37,5  $\mu$ M) nas células A431 e osteoblastos, o que pode ser explicado pelo aumento na solubilidade. Além disso, foi observado uma maior citotoxicidade do ERL e do composto ERL:HP- $\beta$ -CD nas células tumorais (A431 e Caco-2) em relação à célula normal (osteoblastos). O ERL e o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD não foram capazes de aumentar a porcentagem de morte celular por apoptose. O ERL e o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD também apresentaram atividade anti-angiogênica através de uma redução no teor de hemoglobina acima de 50%. Por fim, pode-se concluir que o composto de inclusão ERL:HP- $\beta$ -CD por ser mais solúvel, pode aumentar a disponibilidade do fármaco livre no sítio alvo.

Como perspectivas futuras, poderão ser estudadas novas estratégias de preparação de formulações com o composto de inclusão de forma a obtermos melhores resultados. Fazem-se necessários testes com soluções em diferentes pH e usar o processo de *spray-dryer* para tentarmos melhorar os resultados. Novos experimentos *in vivo* poderão ser conduzidos para avaliar o efeito do composto de inclusão em modelos tumorais, incluindo experimentos de farmacocinética, biodistribuição *in vivo* e eficácia.

---

**CAPÍTULO II: Avaliação *in vitro* da citotoxicidade da hipertermia associada à cisplatina em linhagens celulares de carcinoma de mama, colo do útero e pulmão**

1. Introdução e relevância:

O câncer é uma doença complexa caracterizada pela rápida proliferação das células neoplásicas podendo atingir qualquer tecido. Dentre os diversos tipos de cânceres, gostaríamos de destacar três dos quatro principais cânceres que acometem a população feminina, o câncer de mama, o câncer do colo do útero e o câncer de pulmão (140).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres, respondendo por cerca de 21% dos casos novos a cada ano. Apesar dos avanços terapêuticos, o câncer de mama ainda tem uma alta taxa de mortalidade, provavelmente devido ao fato da doença ser diagnosticada em estágios avançados. Segundo dados do INCA a estimativa de novos casos de câncer de mama para o ano de 2014 é de 57.120 (Tabela 6). O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas para o ano de 2012 (140).

Tabela 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 no sexo feminino, exceto pele não melanoma (140).

<b>Localização primária</b>	<b>Casos novos</b>	<b>%</b>
Mama Feminina	57.120	20,8%
Cólon e Reto	17.530	6,4%
Colo do Útero	15.590	5,7%
Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Glândula Tireóide	8.050	2,9%
Estômago	7.520	2,7%
Corpo do Útero	5.900	2,2%
Ovário	5.680	2,1%
Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	4.320	1,6%

Neste cenário, têm surgido diversas terapias dirigidas contra alvos moleculares específicos. Entretanto, um subgrupo específico de câncer de

mama desperta especial atenção, por não apresentar tratamento direcionado, o triplo-negativo. Nesse grupo de tumores, as células são caracterizadas por não apresentam em sua superfície a expressão de receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). O comportamento clínico do câncer de mama triplo-negativo é classicamente mais agressivo do que os demais tumores de mama e representa cerca de 10-15% de todos os cânceres de mama (141, 142). Muitos autores sugerem que existe uma forte associação entre os cânceres de mama triplo-negativos e a deficiência do gene *Breast cancer 1, early onset (BRCA1)*, como exemplo pode-se citar as linhagens celulares humanas HCC-1937 (143, 144) e MDA-MB-436 (144, 145) (Tabela 7).

*BRCA1* é um gene supressor de tumor, que atua como mediador na via de reparação de danos ao DNA e participa na manutenção da integridade genômica das células. O controle dos mecanismos de reparo de danos ao DNA por *BRCA1* é de grande interesse no estudo de moléculas antitumorais que agem danificando o DNA, tal como a cisplatina. Estudos mostram que a cisplatina apresenta alta taxa de resposta em pacientes com câncer de mama que apresentam mutações no gene *BRCA1* (143, 145). Outras características moleculares frequentemente encontradas nos tumores triplo-negativos são a presença de mutação no gene supressor de tumores *p53* (142, 146, 147) e a expressão do EGFR (Tabela 7) (148). A expressão do EGFR nos tumores triplo-negativos está associada com mau prognóstico (149).

Tabela 7. Características genéticas de 4 linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativos (144).

<b>Linhagem celular</b>	<b><i>p53</i></b>	<b><i>BRCA1</i></b>	<b>Imunoistoquímica</b>
HCC-1937	Mutado	Mutado	RE(-), RP(-), HER-2(-), EGFR(+)
MDA-MB-231	Mutado	Normal	RE(-), RP(-), HER-2(-), EGFR(+)
MDA-MB-436	Mutado	Mutado	RE(-), RP(-), HER-2(-), EGFR(+)
MDA-MB-468	Mutado	Normal	RE(-), RP(-), HER-2(-), EGFR(+)

Outro tipo de câncer que apresenta alta incidência no sexo feminino é o câncer do colo do útero, também chamado de cervical, que é o câncer mais comum entre as mulheres nos países em desenvolvimento e o segundo câncer mais comum em mulheres em todo o mundo (150), com uma incidência anual

em torno de 530.000 casos. A história natural desse tipo de câncer tem sido amplamente estudada, e sabe-se que está intimamente relacionado à presença do papilomavírus humano (HPV) (151). Dentre as diversas linhagens celulares do câncer do colo do útero há duas linhagens HPV (+) amplamente estudadas, que apresentam pobre prognóstico, denominadas SiHa (152) e ME-180 (153).

O câncer de pulmão é o tumor maligno mais comum, apresentando um aumento de 2% na taxa de incidência anual. A última estimativa mundial apontou uma incidência de 1,82 milhões de casos novos de câncer de pulmão para o ano de 2012 (140). Existem diversos tipos de câncer de pulmão, entretanto o grupo mais comum é o carcinoma de células não-pequenas que representam cerca de 85-90% dos casos (154). Como exemplo de linhagens celulares de carcinoma de células não-pequenas pode-se citar as células A549 e H460, que são respectivamente subtipos histológicos de adenocarcinoma e de carcinoma de células grandes (155-160).

Independentemente da origem tumoral, as modalidades básicas de tratamento do câncer consiste na cirurgia (remoção do tumor), radioterapia e quimioterapia. Em muitos casos, é necessário combinar essas modalidades de tratamento. A quimioterapia é uma das principais opções de tratamento do câncer, especialmente para pacientes com tumores irresssecáveis (161, 162).

A maioria das células cancerosas tem a propriedade de proliferarem rapidamente, todavia elas são heterogêneas e diversas. Nas últimas décadas, um número crescente de agentes antineoplásicos tem sido proposto. Dentre eles, podem-se citar os complexos de íons metálicos, tais como a platina (163-165). Fármacos à base de platina têm desempenhado um papel fundamental entre os agentes anticancerígenos à base de metal. Estima-se que 50-70% dos pacientes com câncer são tratados com fármacos à base de platina(II) (158). Dentre as moléculas a base de platina, a cisplatina continua a ser a mais amplamente utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo mama, colo do útero e pulmão (153, 166, 167).

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II, cDDP) é um fármaco que possui um íon central de platina(II) coordenado a dois cloretos e dois grupos amônia (Figura 22) (168).

---

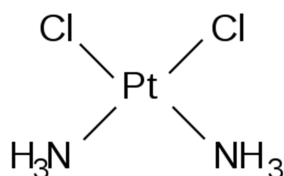


Fig. 22. Estrutura química da cisplatina.

Ao atingir a parte interna da célula por difusão ou transporte ativo, a cisplatina torna-se ativada, através da rápida troca dos íons cloretos por água (Figura 23), uma vez que a concentração dos íons cloreto no citoplasma (0,004 M) está substancialmente mais baixa que aquela encontrada no plasma sanguíneo (0,103 M), além da alta concentração de moléculas de água no citoplasma. Então, as espécies hidrolisadas atingem alguns alvos celulares, como os centros nucleofílicos de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (169).

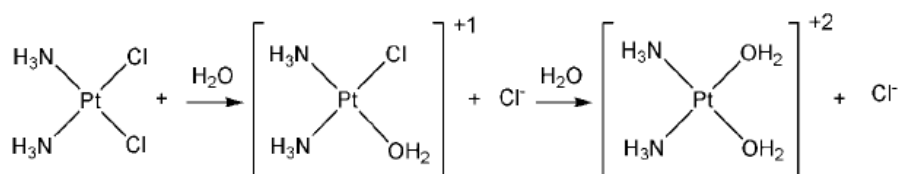


Fig. 23. Representação esquemática da reação de hidrólise da cisplatina.

Ao se ligar ao DNA a cisplatina forma complexos platina-DNA, também denominados de adutos, que envolvem principalmente os átomos de nitrogênio das bases nitrogenadas do DNA, mais especificamente os átomos N7 das bases purinas (guanina e adenina, especialmente guanina). Vários tipos de adutos podem ser formados envolvendo coordenações interfitas e intrafita (Figura 24). Devido à formação das ligações cruzadas intrafita e interfitas, o DNA danificado torna-se incapaz de replicar-se (169). Alguns estudos definem como sendo o mais importante o aduto formado em coordenação intrafita (170). A geometria *cis* do complexo platina-DNA, que diz respeito às posições dos ligantes amônia, está relacionada com a citotoxicidade, por isso complexos do tipo *trans* não apresentam atividade antitumoral (169).

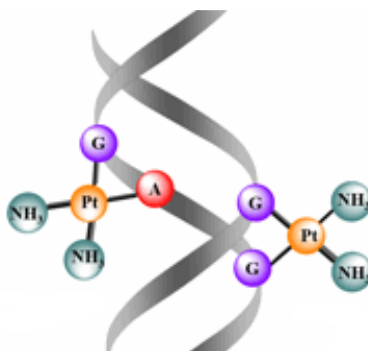


Fig. 24. Formação de aduto platina-DNA intrafito e interfito (162).

Os adutos platina-DNA interferem na duplicação do DNA através do bloqueio da enzima DNA polimerase e inibição na transcrição do RNA, resultando no bloqueio do ciclo celular e ativação das vias de apoptose (162).

Infelizmente, o uso da cisplatina durante a quimioterapia pode resultar no desenvolvimento de resistência, intrínseca ou adquirida, assim como toxicidade (171).

A citotoxicidade apresentada pela cisplatina é atribuída principalmente à sua capacidade de se ligar a molécula de DNA, causando-lhe danos, levando a célula a apoptose. Os principais mecanismos que contribuem para a resistência à cisplatina são a redução na sua absorção celular, aumento do seu efluxo através da membrana celular, aumento na capacidade de reparação dos adutos platina-DNA e a tolerância aumentada do DNA (172).

Devido à falta de especificidade para as células tumorais, ela geralmente exibe toxicidade nas células normais, especialmente nos tecidos de rápida proliferação. Os principais efeitos colaterais frequentemente associados à cisplatina são a nefrotoxicidade, a neurotoxicidade, a ototoxicidade, a hepatotoxicidade e a toxicidade gastrointestinal (163). Efeitos colaterais adicionais, tais como aumento da pressão arterial, mielossupressão, neutropenia, anemia e toxicidade renal, também foram relatados (159, 173).

Estratégias amplamente utilizadas para potencializar os efeitos citotóxicos de moléculas antitumorais com o objetivo de reduzir a dose aplicada e os efeitos colaterais são as associações da quimioterapia com a hipertermia (146, 174, 175).

Um dos primeiros registros da aplicação da hipertermia no câncer foi no século XIX, em que se observou a regressão completa de um sarcoma de face

após episódios de erisipela acompanhados de quadros febris. Da mesma forma, Coley em 1893 observou que a indução de quadros febris, após a inoculação de bactérias, poderia estar relacionada com a regressão do tumor (176, 177).

Vários estudos têm mostrado um efeito positivo da hipertermia sobre as células tumorais, isso se deve ao fato das células tumorais serem mais sensíveis ao aumento da temperatura em relação às células normais (146, 174, 175, 178). Devido às condições específicas intracelulares das células cancerosas, tais como hipóxia, altas concentrações de ácido e insuficiência de nutrientes fazem com que as células cancerosas sejam menos capazes de lidar com o estresse do calor em relação às células saudáveis (166, 179).

Uma leve hipertermia pode causar danos letais na célula tumoral, além de induzir a apoptose. Hipertermia leve pode ser definida como o tratamento do câncer com um aumento na temperatura do tecido a 40-43°C, podendo ser aplicada conjuntamente com a radioterapia ou quimioterapia (175). O excesso de calor na região tumoral aumenta o fluxo sanguíneo que permite o aumento da oxigenação do tumor e a disponibilidade do quimioterápico, o que é, provavelmente, um dos principais mecanismos do sinergismo (174, 175, 178, 180).

Diante disso, o presente trabalho procurou avaliar o efeito da hipertermia associada à quimioterapia sobre linhagens celulares de câncer de mama triplo-negativo com- e sem- mutação no gene *BRCA1* (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e HCC-1937), câncer de colo do útero (ME-180 e SiHa) e câncer de pulmão (A549 e H460). Para isso foi utilizado como quimioterápico a cDDP, e os ensaios utilizados para a avaliação da associação foi os ensaios de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) e ensaio citotóxico de fosfatase ácida (APH).

---

## 2. Objetivos:

### 2.1 Objetivo geral:

- Avaliar a citotoxicidade da hipertermia associada à cisplatina em linhagens de câncer de mama, colo do útero e pulmão.

### 2.2 Objetivo específico:

- Avaliar o efeito citotóxico do aquecimento por 1h a 42°C ou 43°C sozinho ou associado à cisplatina em 4 linhagens triplo-negativas de carcinoma de mama, sendo 2 linhagens com mutação no gene *BRCA1* e 2 linhagens sem essa mutação, 2 linhagens de carcinoma de colo do útero e 2 linhagens de carcinoma de pulmão.
-

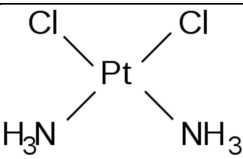


### 3. Materiais e Métodos:

#### 3.1 Materiais:

A cisplatina, o substrato de fosfatase, o etossulfato de fenazina e a solução de hidróxido de sódio 1 M foram obtidos da Sigma-Aldrich. O soro fetal bovino, a tripsina-EDTA e os meios de culturas *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F-12 Ham* 1:1, RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) e  $\alpha$ -MEM (alpha-minimal essential) foram obtidos da Gibco. O reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) foi obtido da Promega.

**Tabela 8: Características da cisplatina**

<b>Código</b>	cDDP
<b>Estrutura molecular</b>	
<b>Fórmula molecular</b>	Cl <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> Pt
<b>Massa molecular média</b>	300,05 g.mol <sup>-1</sup>
<b>Solubilidade (H<sub>2</sub>O; 25 °C)</b>	2.530 mg/L
<b>Ponto de fusão</b>	270 °C
<b>Origem</b>	Sigma Aldrich
<b>Lote</b>	-
<b>Nome IUPAC</b>	<i>Dichloroplatinumdiamine</i>

#### 3.2 Cultura de células:

As células de câncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e HCC-1937), câncer do colo do útero (SiHa e ME-180), e câncer de pulmão (A549 e H460) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, USA). As células MDA-MB-231, MDA-MB-436 e MDA-MB-468 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F-12*

*Ham* 1:1. As células HCC-1937, A549 e H460 foram cultivadas em meio RPMI-1640 e as células SiHa e ME-180 foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM (*alpha-minimal essential*). Todos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 Ensaio de citotoxicidade:

A avaliação da citotoxicidade da cisplatina (cDDP) nas células de câncer foi realizada através do ensaio *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium* (MTS) nas células de câncer de colo do útero, SiHa e ME-180, e câncer de pulmão, A549 e H460, e através do ensaio citotóxico de fosfatase ácida (APH) nas células de câncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468 e HCC-1937.

O efeito sobre a viabilidade celular foi expresso através da curva dose-resposta calculada através do percentual de células viáveis detectadas no grupo tratado versus a viabilidade celular das células incubadas apenas com meio de cultura nas diferentes temperaturas utilizadas.

As células em crescimento exponencial foram semeadas em placas de 96 poços (5 x 10<sup>3</sup> células/poço) e incubadas por 24h. As diferentes linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações de cDDP (0,002 - 666,44  $\mu$ M).

Para avaliar o efeito da temperatura sobre as linhagens celulares as placas foram incubadas em estufas a 5% de CO<sub>2</sub> em 3 diferentes temperaturas (37°C, 42°C e 43°C). O tempo de incubação na estufa nas temperaturas de 42°C e 43°C foi de 1h, seguido pela incubação a 37°C. A temperatura foi medida em tempo real utilizando o equipamento *FOT lab Kit – Fluoroptic – Thermometry* (Luxtron). O equipamento apresenta uma precisão de  $\pm$  0,5°C. Foram realizadas 6 replicatas de cada concentração em cada experimento (3 ou mais experimentos independentes). Depois de 48 e 72h de incubação, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTS nas células de câncer de colo do útero e pulmão, e através do ensaio APH nas células de câncer de mama. O ensaio de MTS consiste na redução dos sais tetrazólio para os cristais de formazan. Brevemente, 20  $\mu$ L de MTS (0,33 mg/mL) foram

adicionados para cada poço. Após 1h, a medida da densidade óptica foi obtida a 490 nm (*Multiskan Spectrum UV/visible*) (181). O ensaio APH consiste na transformação de p-nitrofenil fosfato (PNPP) para p-nitrofenol. Brevemente, 100 µL de tampão de reação PNPP (2 mg/mL) foram adicionados para cada poço. Após 2h de incubação foram adicionados 10 µL de NaOH (1 M) para cada poço para desenvolvimento da coloração. A medida da densidade óptica foi obtida a 405 nm (*Multiskan Spectrum UV/visible*) (182). Os dados foram expressos na curva dose-resposta como média  $\pm$  desvio padrão para cada temperatura (37°C, 42°C e 43°C). A concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) foi determinada através da curva dose-resposta (181).

---

#### 4. Resultados e discussão:

##### 4.1 Ensaio de citotoxicidade por MTS:

O ensaio por MTS foi utilizado para avaliar o efeito da hipertermia associada à cisplatina (cDDP) em linhagens de câncer de colo do útero (ME-180 e SiHa) e câncer de pulmão (A549 e H460). A cDDP é o principal agente quimioterápico para o tratamento do câncer do colo do útero, mas sua toxicidade é um problema-chave associada com a sua aplicação clínica (175). Sendo assim, a associação da cDDP com a hipertermia visa melhorar a eficácia da molécula, reduzindo a dose aplicada e conseqüentemente os efeitos colaterais.

O MTS na presença de metossulfato de fenazina produz o formazan nas células viáveis que tem uma absorvância máxima entre 490-500 nm. O ensaio de MTS é frequentemente descrito como um ensaio de MTT de “um só passo”, o que oferece a conveniência da adição do reagente diretamente na cultura de células, sem os passos intermitentes necessários no ensaio MTT. No entanto, isto faz com que a conveniência do ensaio de MTS seja susceptível a interferências colorimétricas quando se utiliza compostos coloridos (181).

A Hipertermia é uma proposta de tratamento de câncer onde as células do tumor são afetadas pela elevação da temperatura local. Esse tratamento pode ser feito em conjunto a outros tipos de tratamento como a quimioterapia, inclusive podendo potencializar os resultados dessa técnica. Entretanto, o emprego da hipertermia deve ser utilizado com critério, uma vez, que certos tipos celulares são resistentes ao aumento na temperatura (180).

A avaliação do efeito da hipertermia (1h a 42°C ou 43°C) associada à cDDP nas células de carcinoma de colo do útero, SiHa e ME-180, após 48 e 72h de ação do quimioterápico, estão expressos na Figura 25.

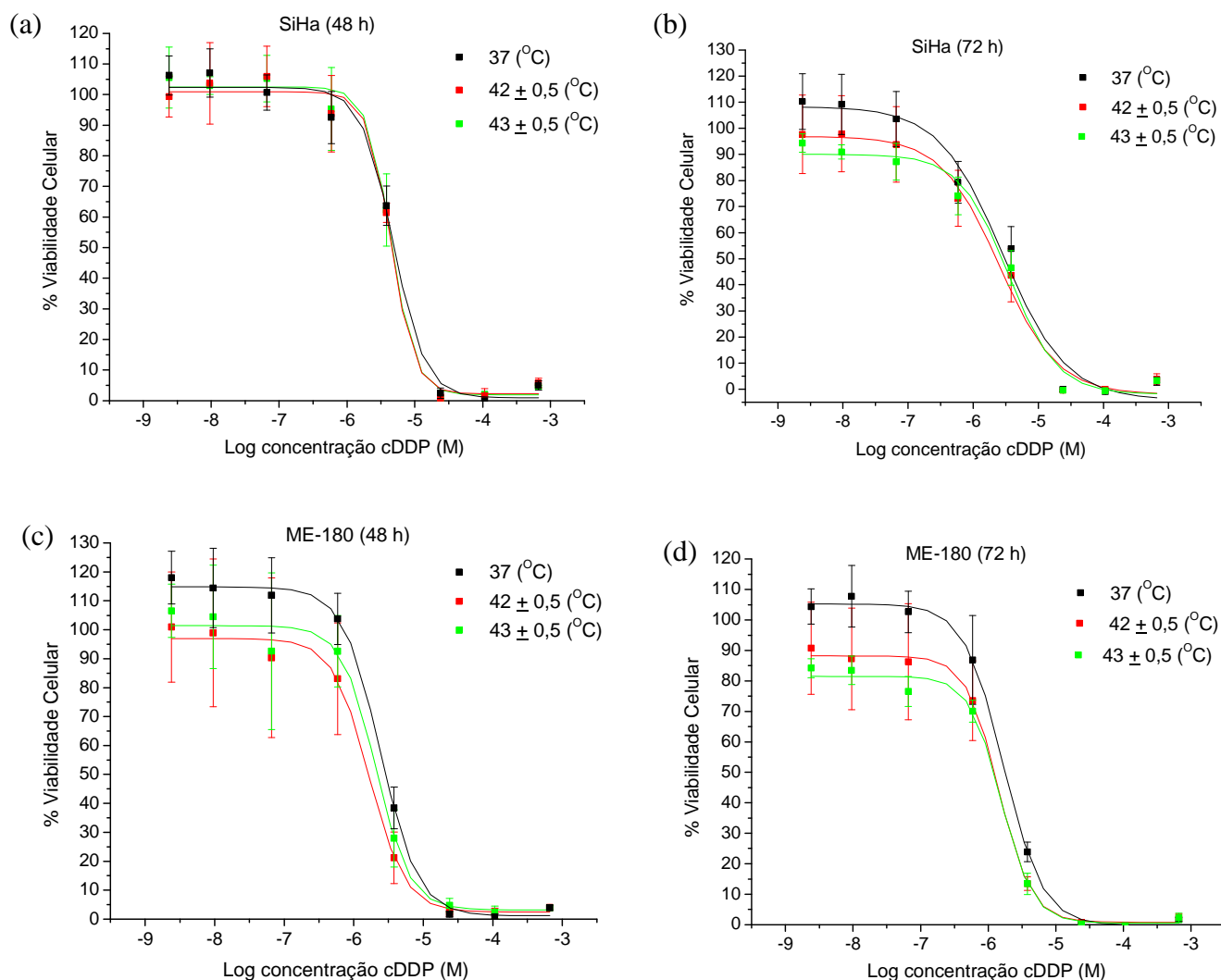


Fig. 25. Percentual de viabilidade das células de carcinoma de colo do útero, (a, b) SiHa e (c, d) ME-180, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio MTS).

A partir da análise da Figura 25a pode-se concluir que a hipertermia não apresentou efeito citotóxico sobre a linhagem celular SiHa após 1h de aquecimento a 42°C ou 43°C, seguido por incubação a 37°C por um tempo total de 48h (1h a 42°C ou 43°C + 47h a 37°C). Com relação ao tempo total de 72h (Figura 25b), percebe-se um pequeno efeito da hipertermia sobre a viabilidade celular, sendo que na temperatura de 43°C a citotoxicidade sobre a célula SiHa foi maior em relação à temperatura de 42°C. Dados da literatura mostram que a hipertermia por 1-4h a 41°C não apresentou citotoxicidade nas

células SiHa. Entretanto, a hipertermia por 1-4h a 43°C reduziu drasticamente a viabilidade dessas células (174). Com relação às células ME-180 (Figura 25c e d), a hipertermia apresentou um pequeno efeito citotóxico sobre sua viabilidade, sendo esse efeito mais pronunciado após 72h de ação da cDDP com o aquecimento por 1h a 43°C.

O efeito da hipertermia sobre o valor de IC<sub>50</sub> da cDDP nas células SiHa e ME-180 estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de IC<sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens SiHa e ME-180 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).

Temperatura/tempo	cDDP IC <sub>50</sub> (µM)			
	SiHa		ME-180	
	48h	72h	48h	72h
37°C	5,71 ± 0,81	4,20 ± 1,39	2,87 ± 0,59	1,76 ± 0,40
42°C	6,21 ± 0,62	4,30 ± 0,68	1,77 ± 0,55	1,56 ± 0,52
43°C	6,05 ± 1,02	4,16 ± 1,65	2,04 ± 0,52	1,67 ± 0,33

A partir da análise dos valores de IC<sub>50</sub> nas células de câncer de colo do útero, SiHa e ME-180, pode-se concluir que a hipertermia não interferiu no valor da IC<sub>50</sub> da cDDP (Tabela 9). A literatura mostra que a associação da cisplatina com a hipertermia leva ao aumento na citotoxicidade do fármaco (174). Esse efeito pode ser explicado devido ao fato da hipertermia agir inibindo a reparação de danos nas fitas de DNA, sendo esse efeito melhor observado através do ensaio clonogênico, que avalia a capacidade das células de formarem clones após determinado tratamento. Também é possível concluir que a cDDP age sobre as células SiHa e ME-180 de forma dose e tempo-dependente, com a menor viabilidade nas maiores concentrações e com IC<sub>50</sub> menor após 72h de ação da molécula em relação ao tempo de 48h (Figura 25 e Tabela 9). Os dados de IC<sub>50</sub> apresentados na Tabela 9 para a célula SiHa são condizentes com os dados reportados na literatura para os tempos de 48h (8,92 ± 1,23 µM (161)) e 72h (1,5 ± 1,2 µM (172)). Entretanto, os valores de IC<sub>50</sub> da cDDP disponíveis na literatura para a célula ME-180 nos tempos de 48h (33,5 ± 1,0 µM (183)) e 72h (6,5 µM (153)) são superiores aos dados aqui apresentados (Tabela 9). Além disso, segundo Dou *et al.* (2014), a cDDP apresentou um efeito sinérgico com a hipertermia nas células ME-180 (175).

A partir da análise da atividade da cDDP em linhagens de câncer de colo do útero, pode-se concluir que a hipertermia apresentou uma pequena citotoxicidade sobre essas células, sendo o efeito maior após 1h de aquecimento a 43°C seguido pela incubação por 71h a 37°C. Além disso, pode-se concluir que a hipertermia agiu como um adicional na redução da viabilidade celular.

Dados da literatura mostraram um efeito sinérgico entre a hipertermia e a cDDP, no qual o aquecimento do tecido a 41-45°C foi demonstrado ser eficaz no tratamento do câncer de pulmão, quando usado em conjunto com a quimioterapia (178).

A avaliação do efeito da hipertermia (1h a 42°C ou 43°C) associada à cDDP nas células de carcinoma de pulmão, A549 e H460, após 48 e 72h de ação do quimioterápico, estão expressos na Figura 26.

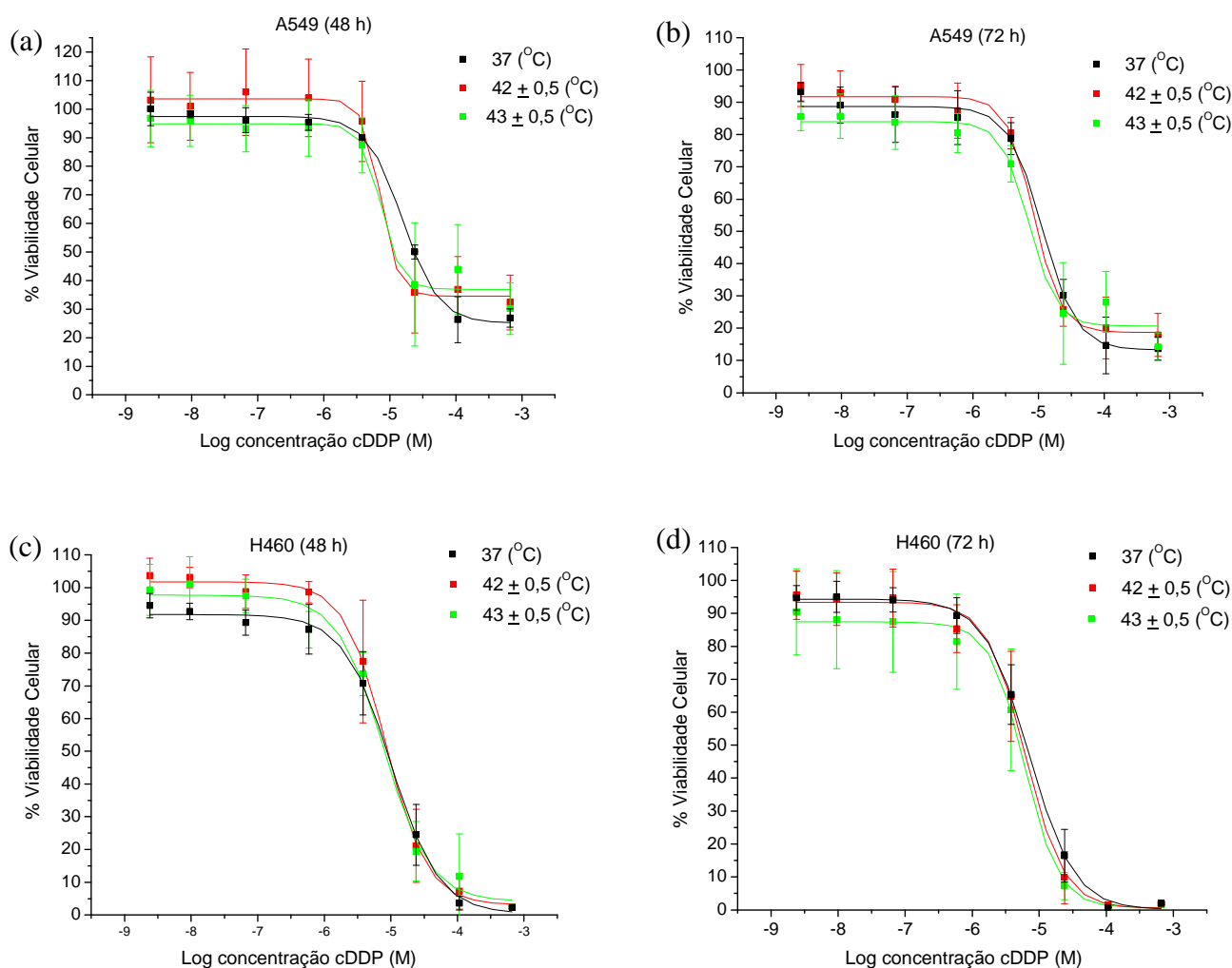


Fig. 26. Percentual de viabilidade das células de carcinoma de pulmão, (a, b) A549 e (c, d) H460, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à

37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio MTS).

A partir da análise da Figura 26 pode-se concluir que a hipertermia não apresentou efeito citotóxico sobre as linhagens de câncer de pulmão, A549 e H460.

Dados da literatura, mostraram que a célula A549 foi resistente ao aquecimento à temperatura de 40°C por 3 dias (180). Além disso, essa linhagem celular não foi sensível a hipertermia a 42°C por 1h, apresentando sensibilidade a hipertermia somente na temperatura de 45°C após um aquecimento por 40 min e 1h (184).

Com relação ao efeito da hipertermia sobre a atividade da cDDP nas células A549 e H460, os dados de IC<sub>50</sub> estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de IC<sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens A549 e H460 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).

Temperatura/tempo	cDDP IC <sub>50</sub> (µM)			
	A549		H460	
	48h	72h	48h	72h
37°C	23,97 ± 2,57	11,36 ± 1,52	9,02 ± 3,36	6,96 ± 2,05
42°C	15,72 ± 6,57	10,87 ± 1,19	9,02 ± 5,16	6,44 ± 1,95
43°C	20,05 ± 10,36	15,83 ± 13,37	8,81 ± 3,74	6,35 ± 2,30

Os valores de IC<sub>50</sub> da cDDP a 37°C expressos na Tabela 10 são condizentes com os dados reportados na literatura para a célula A549 nos tempos de 48h (19,85 ± 1,49 µM (163); 32,0 ± 3,2 µM (155); 25,3 ± 3,1 µM (164); 27,2 µM (185); e 22,98 µM (156)) e 72h (15,38 ± 0,58 µM (163); 6,82 ± 2,56 µM (157); 9,87 ± 2,40 µM (186); e 9,3 ± 3,0 µM (158, 165, 187)), e para a célula H460 (8,7 µM (188); e 6,1 ± 2,1 µM (159)). Também é possível concluir que a cDDP age sobre as células A549 e H460 de forma dose e tempo-dependente (184).

A partir da análise dos valores de IC<sub>50</sub> nas células A549 e H460, pode-se concluir que a hipertermia não interferiu na atividade da cDDP (Tabela 10). Entretanto, segundo Kruse *et al.* (2014), quando a cDDP foi administrada em



conjunto com a hipertermia, um aumento no efeito citotóxico nas células A549 foi observado em comparação com a cisplatina ou a hipertermia isoladamente (178).

A partir da análise da atividade da cDDP em linhagens de câncer de pulmão, A549 e H460, pode-se concluir que as células avaliadas foram resistentes a hipertermia (1h a 42°C ou 43°C), não apresentando efeito citotóxico sobre as mesmas. Além disso, pode-se concluir que a hipertermia não interferiu na atividade do fármaco.

#### 4.2 Ensaio de citotoxicidade por APH:

Esse ensaio trata-se de um ensaio de citotoxicidade que determina a viabilidade celular via atividade de enzimas fosfatases presentes no citosol. Nesse ensaio o p-nitrofenil fosfato é transformado em p-nitrofenol que apresenta uma coloração amarela, que pode ser determinada utilizando um espectrofotômetro UV-visível no comprimento de onda de 405 nm (189).

Muitos autores sugerem que existe uma associação sinérgica entre a hipertermia e fármacos à base de platina no tratamento do câncer de mama triplo-negativo (146, 190, 191). Diante disso, o presente trabalho procurou avaliar essa associação em 4 linhagens de mama triplo-negativos, sendo 2 com mutações no gene *BRCA1*.

O efeito da hipertermia (1h a 42°C ou 43°C) associada à cDDP avaliado através do ensaio APH nas células de câncer de mama triplo-negativo sem mutação no gene *BRCA1*, MDA-MB-231 e MDA-MB-468, após 48 e 72 h de ação do quimioterápico, estão expressos na Figura 27.

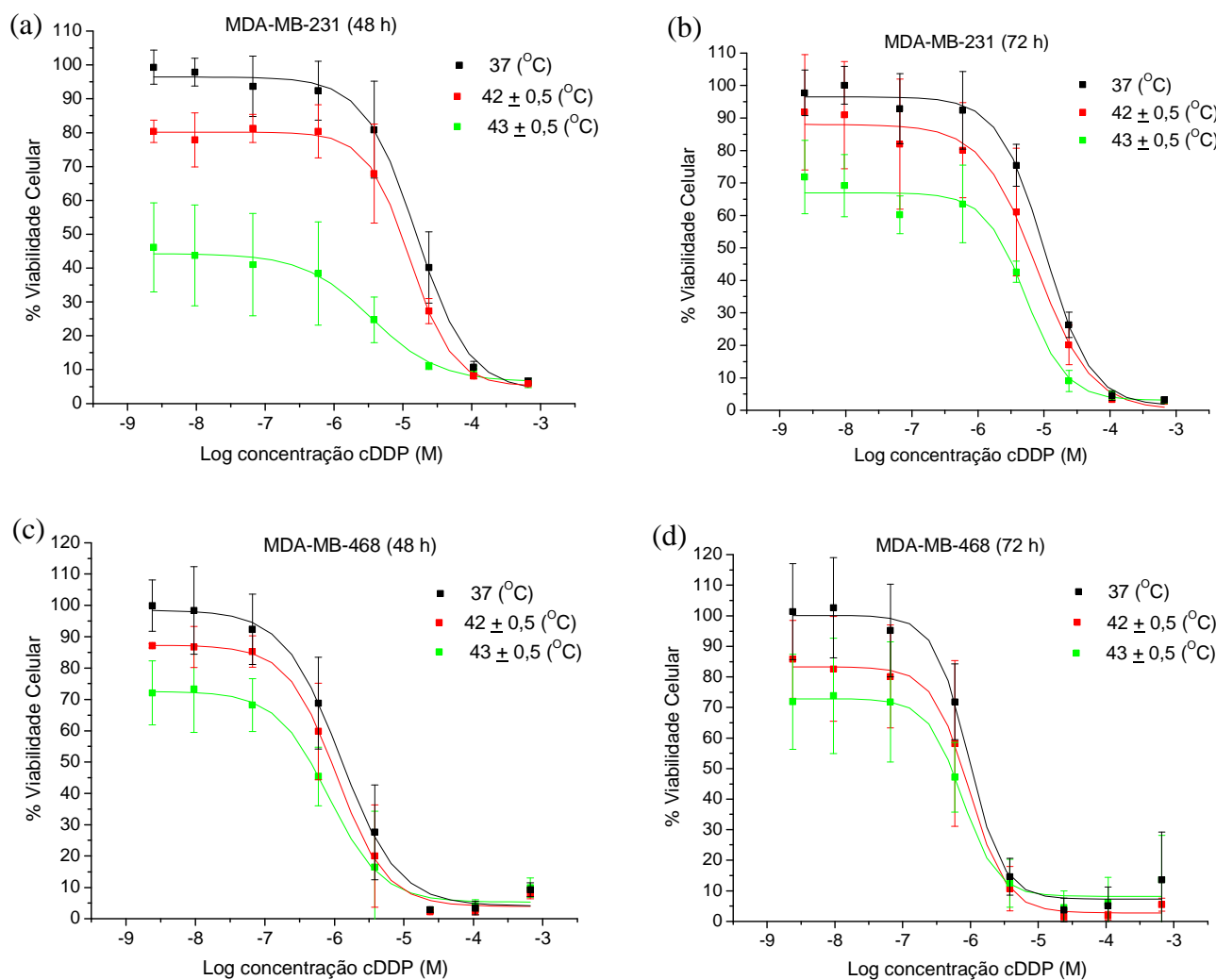


Fig. 27. Percentual de viabilidade das células de carcinoma de mama, (a, b) MDA-MB-231 e (c, d) MDA-MB-468, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio APH).

A partir da análise da Figura 27 pode-se concluir que a hipertermia teve um efeito expressivo sobre a viabilidade da célula MDA-MB-231 e MDA-MB-468, sendo esse efeito mais evidente na temperatura de 43°C em relação à temperatura de 42°C.

A vantagem da hipertermia em relação à quimioterapia, é que ela tem poucos efeitos colaterais. O efeito é causado pelo dano físico e, sendo as células normais mais resistentes ao aumento da temperatura, torna esse tipo de tratamento mais seletivo. A lógica da hipertermia é baseada no efeito da

morte celular direta em temperaturas acima de 42,5°C, e este efeito é aumentado por aquecimentos repetidos (190).

O aquecimento a 42°C durante 1h seguido por incubação a 37°C por 47h foi pouco tóxico para as células cancerosas MDA-MB-231, corroborando com os dados aqui apresentados. Segundo a literatura, o aquecimento a 42°C reduziu 35% à sobrevivência das células MDA-MB-231 avaliadas através do ensaio clonogênico (146). Além disso, o aquecimento a 45°C por 1h resultou na morte de praticamente total as células MDA-MB-231 (190).

Estudos mostram que a hipertermia por si só apresenta certa citotoxicidade nas células MDA-MB-468. Além disso, a temperatura e o tempo de aquecimento pode influenciar o grau de citotoxicidade. O aquecimento por 30 min a 45°C mata praticamente todas as células. Entretanto, a citotoxicidade causada pelo aquecimento por 30 min a 43°C é muito inferior em comparação ao aquecimento a 45°C (191).

O efeito da hipertermia (1h a 42°C ou 43°C) sobre o valor da IC<sub>50</sub> da cDDP nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11: Valores de IC<sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).

Temperatura/tempo	cDDP IC <sub>50</sub> (µM)			
	MDA-MB-231		MDA-MB-468	
	48h	72h	48h	72h
37°C	16,29 ± 6,98	9,83 ± 1,36	1,45 ± 0,58	1,19 ± 0,33
42°C	11,91 ± 4,25	6,80 ± 2,33	1,60 ± 1,03	1,16 ± 0,64
43°C	5,22 ± 3,11	5,44 ± 1,99	1,74 ± 1,33	1,07 ± 0,16

Os valores de IC<sub>50</sub> da cDDP a 37°C expressos na Tabela 11 são condizentes com os dados reportados na literatura para a célula MDA-MB-231 nos tempos de 48h (21,9 ± 2,3 µM (192)) e 72 h (7,33 ± 0,56 µM (157)); e 6,5 ± 2,4 µM (165, 187)), e para a célula MDA-MB-468 nos tempos de 48h (0,32 µM (193); e 5,82 ± 0,07 µM (171)) e 72h (0,99 ± 0,06 µM (168, 173)).

A partir da análise dos valores de IC<sub>50</sub> nas células MDA-MB-468, pode-se concluir que a hipertermia não interferiu no valor de IC<sub>50</sub> da cDDP (Tabela

11). Entretanto, o mesmo não ocorreu para a célula MDA-MB-231, em que se observa um efeito sinérgico entre o calor e a cDDP. A hipertermia pode ter induzido um aumento na permeabilidade da membrana celular, resultando no aumento da captação da cisplatina pelas células cancerosas. Portanto, o número de ligações cruzadas de cisplatina-DNA pode também ter sido aumentado. Além disso, a inibição da resistência celular à cisplatina foi observada quando combinada com a hipertermia (178, 191).

Estudos *in vivo* mostram que a hipertermia aumenta o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, o que permite uma maior absorção de fármacos e melhor oxigenação do tecido tumoral. Além disso, em altas temperaturas (41°C-43°C) as células neoplásicas podem tornar-se mais quimiossensíveis, fato que ocorre especialmente com os agentes alquilantes, tal como a cDDP (174).

A eficácia da hipertermia por si só não é suficiente para substituir qualquer um dos padrões de quimioterapia correntes, mas os seus efeitos são suficientes para melhorar os efeitos tóxicos de muitos agentes quimioterápicos. Portanto, a combinação da hipertermia com a cisplatina, pode reduzir a dosagem eficaz da cisplatina, por conseguinte, diminuir os efeitos colaterais do quimioterápico (174, 175). Também é possível concluir que a cDDP age sobre as células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 de forma dose e tempo-dependente.

O efeito da hipertermia associada à cDDP avaliado através do ensaio APH nas células de carcinoma de mama com mutação no gene *BRCA1*, MDA-MB-436 e HCC-1937, após 48 e 72h de ação do quimioterápico, estão expressos na Figura 28.

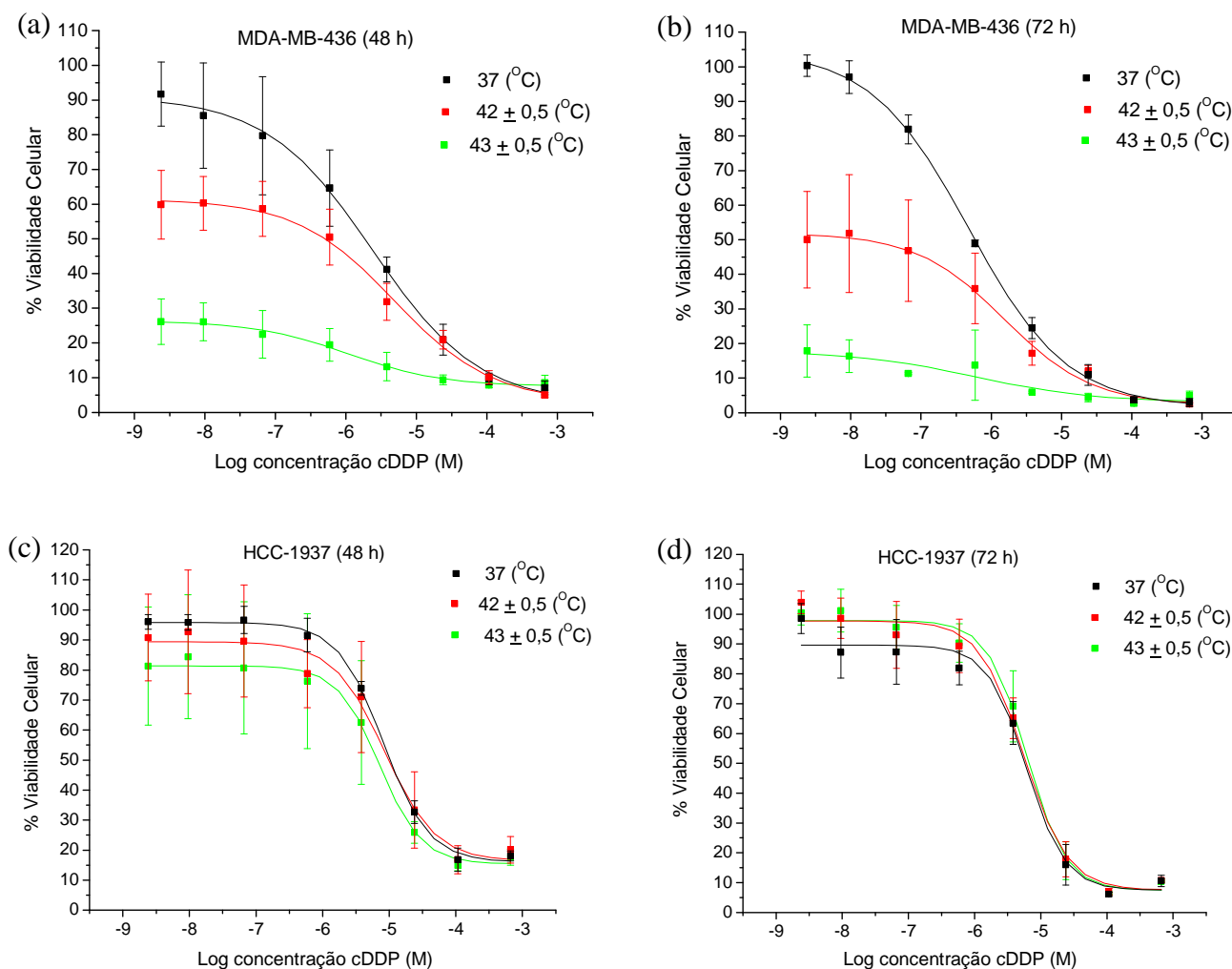


Fig. 28. Percentual de viabilidade das células de carcinoma de mama, (a, b) MDA-MB-436 e (c, d) HCC-1937, após tratamento com cisplatina (cDDP) por 48 e 72h à 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C) (Ensaio APH).

A partir da análise da Figura 28 pode-se concluir que a hipertermia não teve efeito sobre a viabilidade da célula HCC-1937. Entretanto, o mesmo não ocorreu com a célula MDA-MB-436, em que a hipertermia matou praticamente quase todas as células após o aquecimento por 1h a temperatura de 43°C. A hipertermia atua aumentando a energia térmica no interior da célula ocasionando a desnaturação de proteínas (191).

O efeito da hipertermia sobre os valores de  $IC_{50}$  da cDDP na célula MDA-MB-436 e HCC-1937, estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de IC<sub>50</sub> da cDDP após 48 e 72h nas linhagens MDA-MB-436 e HCC-1937 a 37°C e sob hipertermia (1h a 42°C ou 43°C, seguido de 47 e 71h a 37°C).

Temperatura/tempo	cDDP IC <sub>50</sub> (µM)			
	MDA-MB-436		HCC-1937	
	48h	72h	48h	72h
37°C	2,06 ± 0,61	0,74 ± 0,45	11,11 ± 1,00	6,56 ± 1,77
42°C	5,44 ± 2,16	1,81 ± 0,36	12,39 ± 4,64	6,59 ± 1,26
43°C	3,95 ± 3,74	0,98 ± 0,71	14,07 ± 7,39	7,11 ± 1,44

Os valores de IC<sub>50</sub> da cDDP a 37°C expressos na Tabela 12 para a célula MDA-MB-436 são condizentes com os dados reportados na literatura (1,8 ± 0,5 (167)). Entretanto, os dados de IC<sub>50</sub> da cDDP para a linhagem celular HCC-1937 reportados na literatura são bastantes discrepantes dos dados aqui apresentados, sendo 30-40 µM para o tempo de 48h (143) e 22,1 ± 3,1 µM para o tempo de 72h (167).

A partir da análise dos dados de IC<sub>50</sub> observa-se que a hipertermia não interferiu no valor de IC<sub>50</sub> da cDDP na linhagem celular HCC-1937. Entretanto, para a célula MDA-MB-436 observa-se um efeito adicional entre o calor e a cDDP. A hipertermia teve um efeito maior no valor de IC<sub>50</sub> para essa célula na temperatura de 42°C, isso ocorre provavelmente devido ao fato da própria hipertermia ocasionar a morte de quase todas as células na temperatura de 43°C. Também é possível concluir que a cDDP age sobre as células MDA-MB-436 e HCC-1937 de forma dose e tempo-dependente.

Os efeitos biofísicos da hipertermia sobre as células tumorais incluem alterações de complexos multimoleculares, do citoesqueleto (178), além de alterações nos complexos enzimáticos responsáveis pela síntese e reparação do DNA (146, 174, 191). Soma-se a todas estas considerações um efeito sinérgico entre o calor e algumas drogas, tais como a cisplatina (174, 175).

Apesar da hipertermia ser uma técnica antiga, e mostrar bons efeitos em determinadas linhagens celulares, seu uso na clínica ainda é restrito principalmente devido à dificuldade em se determinar a temperatura dentro do tumor durante o tratamento. Obter a temperatura dentro de tumores sólidos de

forma não invasiva é uma tecnologia ainda não alcançada, o que tira a atratividade do procedimento perante outros métodos disponíveis (194).

Sendo assim, esse estudo indica a necessidade de uma abordagem mais racional para o uso da hipertermia no tratamento do câncer, tendo em conta que os subgrupos diferem e reconhecendo que a resposta pode não ser sempre idêntica, mesmo dentro dos subgrupos. Como pode ser observado a partir dos dados apresentados, existem outros fatores além da mutação no gene *BRCA1* que podem influenciar na atividade da cisplatina, sendo necessários novos estudos de modo a melhor compreender a biologia do câncer.

---

## 5. Conclusões e perspectivas futuras:

A Hipertermia é uma proposta de tratamento do câncer onde as células do tumor são afetadas pela elevação da temperatura local, podendo ser associada com a quimioterapia, potencializando os efeitos dessa técnica. Entretanto, o emprego da hipertermia deve ser utilizado com critério, uma vez, que certos tipos celulares (A549, H460 e HCC-1937) foram resistentes ao aumento na temperatura. A partir da análise dos dados pode-se concluir que para determinadas linhagens celulares (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, ME-180 e SiHa), observou-se um efeito somatório entre a hipertermia e a cDDP, sendo que a citotoxicidade apresentada pela hipertermia foi maior na temperatura de 43°C em relação a temperatura de 42°C. Além disso, a hipertermia agiu interferindo no valor de IC<sub>50</sub> das células MDA-MB-231 e MDA-MB-436. Esse fator provavelmente não está relacionado a presença/ausência de mutação na gene *BRCA1*, uma vez, que a célula MDA-MB-436 apresenta mutação nesse gene e a célula MDA-MB-231 não apresenta. Apesar da hipertermia ser uma técnica antiga, e mostrar bons resultados, seu uso na clínica ainda é restrito devido à dificuldade em se determinar a temperatura dentro do corpo do paciente durante o tratamento. Apesar da dificuldade de se determinar a real temperatura na região tumoral, o uso da hipertermia apresenta a grande vantagem dos tecidos saudáveis terem uma tolerância muito maior ao calor em relação ao tumor, além de ser uma técnica não invasiva, justificando assim, na maioria das vezes a sua utilização.

Como perspectivas futuras poderão ser conduzidos estudos *in vivo* para avaliar o efeito da hipertermia e da cDDP em modelos tumorais, incluindo experimentos de farmacocinética, biodistribuição *in vivo* e eficácia. Posteriormente, desenvolver uma formulação à base de cDDP para aplicação em carcinoma sensíveis a hipertermia.

---



## Referências:

1. Weinberg RA. A biologia do câncer: Editora Artmed; 2008. 864p. ISBN:9788536313481.
  2. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*. 2000;21(6):167-223.
  3. Santos IC. Análise das proteínas EGFR e p-Akt como fatores preditivos a resposta terapêutica à quimioterapia e radioterapia combinada ao erlotinibe em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, localmente avançado. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
  4. Krok KL, Lichtenstein GR. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2004;20(1):43-8.
  5. Garzino-Demo P, Dell'Acqua A, Dalmaso P, Fasolis M, Maggiore G, Ramieri G, et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2006;34(6):344-50.
  6. Castro RFM, Dezotti MSG, Azevedo LR, Aquilante AG, Xavier CRG. Atenção odontológica aos pacientes oncológicos antes, durante e depois do tratamento antineoplásico. *Revista de Odontologia da UNICID*. 2002;14:63-74.
  7. Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh KW. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*. 2012;9(3):193-9.
  8. Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2009;48(3):239-44.
  9. Chen LK, Liang Y, Yang QY, Xu F, Zhou NN, Xu GC, et al. Triplet Platinum-based Combination Sequential Chemotherapy Improves Survival Outcome and Quality of Life of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(5):1863-7.
  10. Rieger JM, Zalmanowitz JG, Wolfaardt JF. Functional outcomes after organ preservation treatment in head and neck cancer: a critical review of the literature. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2006;35(7):581-7.
  11. Choong N, Vokes E. Expanding role of the medical oncologist in the management of head and neck cancer. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2008;58(1):32-53.
  12. Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Experimental Biology and Medicine*. 2010;235(8):907-20.
  13. Choong NW, Cohen EEW. Epidermal growth factor receptor directed therapy in head and neck cancer. *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 2006;57(1):25-43.
  14. Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, et al. The EGFR Ligands Amphiregulin and Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Promote Peritoneal Carcinomatosis in CXCR4-Expressing Gastric Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(11):3619-30.
-

15. Foley J, Nickerson NK, Nam S, Allen KT, Gilmore JL, Nephew KP, et al. EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2010;21(9):951-60.
  16. Sharafinski ME, Ferris RL, Ferrone S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*. 2010;32(10):1412-21.
  17. Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Experimental Cell Research*. 2003;284(1):2-13.
  18. Zhang XH, Diaz MR, Yee D. Fulvestrant regulates epidermal growth factor (EGF) family ligands to activate EGF receptor (EGFR) signaling in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2013;139(2):351-60.
  19. Grunwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(12):851-67.
  20. Lemos C, Kathmann I, Giovannetti E, Calhau C, Jansen G, Peters GJ. Impact of cellular folate status and epidermal growth factor receptor expression on BCRP/ABCG2-mediated resistance to gefitinib and erlotinib. *British Journal of Cancer*. 2009;100(7):1120-7.
  21. Soulieres D, Senzer NN, Vokes EE, Hidalgo M, Agarwala SS, Siu LL. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(1):77-85.
  22. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Kim YJ, Kim JH, et al. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2015;112(1):103-11.
  23. Lochner N, Pittner F, Wirth M, Gabor F. Wheat germ agglutinin binds to the epidermal growth factor receptor of artificial Caco-2 membranes as detected by silver nanoparticle enhanced fluorescence. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(5):833-9.
  24. Kralj S, Rojnik M, Kos J, Makovec D. Targeting EGFR-overexpressed A431 cells with EGF-labeled silica-coated magnetic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. 2013;15(5):11.
  25. Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, Clayton A, Bowen T, Phillips AO, et al. Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF-beta 1)-stimulated Fibroblast to Myofibroblast Differentiation Is Mediated by Hyaluronan (HA)-facilitated Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and CD44 Co-localization in Lipid Rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(21):14824-38.
  26. Schneider MR, Sibilina M, Erben RG. The EGFR network in bone biology and pathology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009;20(10):517-24.
  27. Auricchio A, Didomenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A. Epidermal growth-factor induces protein-tyrosine phosphorylation and association of p190 with ras-GTP-ase activating protein in Caco-2 cells. *Febs Letters*. 1994;353(1):16-20.
  28. Murthy S, Mathur SN, Field FJ. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta inhibit apolipoprotein B secretion in CaCo-2 cells via the epidermal growth factor receptor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(13):9222-9.
-

29. Aggarwal S, Bhargava A, Rao RR. Erk1/2 delays the assembly of tight junction (TJ) in undifferentiated caco-2 cell monolayers, while it mediates the EGF-induced protection of TJ from oxidative stress in differentiated cell monolayers. *Gastroenterology*. 2007;132(4):A538-A.
  30. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated *in vitro* by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *The Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(1):15-23.
  31. Kaulfuss S, Burfeind P, Gaedcke J, Scharf JG. Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2009;8(4):821-33.
  32. Zhang YM, Li X, Xu XM, Luo WJ. Construction of a high-EGFR expression cell line and its biological properties comparing with A431 cell. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(30):4674-80.
  33. Kim JC, Ali MA, Nandi A, Mukhopadhyay P, Choy H, Cao C, et al. Correlation of HER1/EGFR expression and degree of radiosensitizing effect of the HER1/EGFR-tyrosine kinase inhibitor erlotinib. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 2005;42(6):358-65.
  34. Hama-Inaba H, Choi KH, Wang B, Haginoya K, Yamada T, Hayata I, et al. Fas-independent apoptosis induced by UVC in p53-mutated human epithelial tumor A431 cells through activation of caspase-8 and JNK/SAPK. *Journal of Radiation Research*. 2001;42(2):201-15.
  35. Thongrakard V, Titone R, Follo C, Morani F, Suksamrarn A, Tencomnao T, et al. Turmeric Toxicity in A431 Epidermoid Cancer Cells Associates with Autophagy Degradation of Anti-apoptotic and Anti-autophagic p53 Mutant. *Phytotherapy Research*. 2014;28(12):1761-9.
  36. Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J. Growth-stimulation of A431 cells by epidermal growth-factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth-factor by an anti-receptor monoclonal-antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1983;80(5):1337-41.
  37. Ling YH, Li TH, Yuan ZQ, Haigentz M, Weber TK, Perez-Soler R. Erlotinib, an effective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27(KIP1) up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Molecular Pharmacology*. 2007;72(2):248-58.
  38. Yamasaki F, Zhang DW, Bartholomeusz C, Sudo T, Hortobagyi GN, Kurisu K, et al. Sensitivity of breast cancer cells to erlotinib depends on cyclin-dependent kinase 2 activity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(8):2168-77.
  39. Li DD, Fang F, Li JR, Du QR, Sun J, Gong HB, et al. Discovery of 6-substituted 4-anilinoquinazolines with dioxygenated rings as novel EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012;22(18):5870-5.
  40. Bliesath J, Huser N, Omori M, Bunag D, Proffitt C, Streiner N, et al. Combined inhibition of EGFR and CK2 augments the attenuation of PI3K-Akt-mTOR signaling and the killing of cancer cells. *Cancer Letters*. 2012;322(1):113-8.
-

41. Kim SM, Jung JU, Ryu JS, Jin JW, Yang HJ, Ko K, et al. Effects of gangliosides on the differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts by modulating epidermal growth factor receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;371(4):866-71.
  42. Laflamme C, Curt S, Rouabhia M. Epidermal growth factor and bone morphogenetic proteins upregulate osteoblast proliferation and osteoblastic markers and inhibit bone nodule formation. *Archives of Oral Biology*. 2010;55(9):689-701.
  43. Sibilila M, Wagner B, Hoebertz A, Elliott C, Marino S, Jochum W, et al. Mice humanised for the EGF receptor display hypomorphic phenotypes in skin, bone and heart. *Development*. 2003;130(19):4515-25.
  44. Chan S, Wong R. Expression of Epidermal Growth Factor in Transgenic Mice Causes Growth Retardation. *The journal of biological chemistry*. 2000. p. 38693–8.
  45. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F. Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*. 2009;28:S32-S7.
  46. Mahller YY, Vaikunth SS, Currier MA, Miller SJ, Ripberger MC, Hsu YH, et al. Oncolytic HSV and erlotinib inhibit tumor growth and angiogenesis in a novel malignant peripheral nerve sheath tumor xenograft model. *Molecular Therapy*. 2007;15(2):279-86.
  47. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada clinical trials group. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(15):1960-6.
  48. Thomas SM, Grandis JR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treatment Reviews*. 2004;30(3):255-68.
  49. Li J, Zhao M, He P, Hidalgo M, Baker SD. Differential metabolism of gefitinib and erlotinib by human cytochrome P450 enzymes. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(12):3731-7.
  50. Saba NF, Hurwitz SJ, Kono SA, Yang CS, Zhao Y, Chen ZJ, et al. Chemoprevention of Head and Neck Cancer with Celecoxib and Erlotinib: Results of a Phase Ib and Pharmacokinetic. *Cancer Prevention Research*. 2014;7(3):283-91.
  51. Lopes LC, Barberato-Filho S, Costa AC, Osório-de-Castro CGS. Uso racional de medicamentos antineoplásicos e ações judiciais no Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública*. 2010;44:620-8.
  52. Cohen EEW, Halpern AB, Kasza K, Kocherginsky M, Williams R, Vokes EE. Factors associated with clinical benefit from epidermal growth factor receptor inhibitors in recurrent and metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*. 2009;45(10):E155-E60.
  53. Herchenhorn D, Dias FL, Viegas CMP, Federico MH, Araujo CMM, Small I, et al. Phase I/II study of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2010;78(3):696-702.
-

54. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(7):645-66.
  55. Uekama K. Pharmaceutical application of cyclodextrins as multi-functional drug carriers. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2004;124(12):909-35.
  56. Bekers O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 1991;17(11):1503-49.
  57. Otero-Espinar FJ, Torres-Labandeira JJ, Alvarez-Lorenzo C, Blanco-Mendez J. Cyclodextrins in drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2010;20(4):289-301.
  58. Uekama K. Cyclodextrins in drug delivery system - Preface. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999;36(1):1-2.
  59. Venturini CDG, Nicolini J, Machado C, Machado VG. Properties and recent applications of cyclodextrins. *Quimica Nova*. 2008;31(2):360-8.
  60. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):1743-53.
  61. Liu L, Guo QX. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2002;42(1-2):1-14.
  62. Loftsson T, Masson M, Brewster ME. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;93(5):1091-9.
  63. Yap KL, Liu X, Thenmozhiyal JC, Ho PC. Characterization of the 13-cis-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;25(1):49-56.
  64. Khan AR, Forgo P, Stine KJ, D'Souza VT. Methods for selective modifications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):1977-96.
  65. Gould S, Scott RC. 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(10):1451-9.
  66. Hirayama F, Uekama K. Methods of investigating and preparing inclusion compounds. *Cyclodextrins and their Industrial uses*. Duchêne, D Editions de Santé, Paris. 1987:133-72.
  67. Iacovino R, Caso JV, Rapuano F, Russo A, Isidori M, Lavorgna M, et al. Physicochemical Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation of Hydroxymethylferrocene:beta-Cyclodextrin Inclusion Complex. *Molecules*. 2012;17(5):6056-70.
  68. Schneider HJ, Hacket F, Rudiger V, Ikeda H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):1755-85.
  69. Hedges AR. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):2035-44.
  70. Suárez DF, Consuegra J, Trajano VC, Gontijo SML, Guimarães PPG, Cortés ME, et al. Structural and thermodynamic characterization of doxycycline/ $\beta$ -cyclodextrin
-

supramolecular complex and its bacterial membrane interactions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;118(0):194-201.

71. Takahashi AI. Obtenção e caracterização de complexos binários e ternários de sinvastatina e ciclodextrinas. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

72. Calderini A, Pessine FBT. Synthesis and characterization of inclusion complex of the vasodilator drug minoxidil with beta-cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2008;60(3-4):369-77.

73. Connors KA. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Reviews*. 1997;97(5):1325-57.

74. Connors KA. Measurement of cyclodextrin complex stability constants. *Comprehensive supramolecular chemistry (part II)*. 1996;3:205-41.

75. Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and instrumentation*. 1965;4:117-212.

76. Haq I. Isothermal titration calorimetry in the study of DNA-drug interactions. *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. 1998:41-61.

77. Nielsen TT, Amiel C, Duroux L, Larsen KL, Stade LW, Wimmer R, et al. Formation of nanoparticles by cooperative inclusion between (S)-camptothecin-modified dextrans and beta-cyclodextrin polymers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2015;11:147-54.

78. Grosseohme NE, Spuches AM, Wilcox DE. Application of isothermal titration calorimetry in bioinorganic chemistry. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2010;15(8):1183-91.

79. Roselin LS, Lin MS, Lin PH, Chang Y, Chen WY. Recent trends and some applications of isothermal titration calorimetry in biotechnology. *Biotechnology Journal*. 2010;5(1):85-98.

80. Olsen SN. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. *Thermochimica Acta*. 2006;448(1):12-8.

81. Valet G. Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2003;17(3):213-22.

82. Marczak A, Denel-Bobrowska M, Rogalska A, Lukawska M, Oszczapowicz I. Cytotoxicity and induction of apoptosis by formamidinodoxorubicins in comparison to doxorubicin in human ovarian adenocarcinoma cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015;39(1):369-83.

83. Szabo S, Deng X, Xiong X, Sandor Z, Kim JH. New and Old Concepts of Cell Death and Tissue Injury: Necrosis, Apoptosis and Necroptosis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014;59(8):1663-4.

84. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis - its significance in cancer and cancer-therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-26.

85. Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007;53:335-46.

86. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.

87. Hail N, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*. 2006;11(6):889-904.
  88. Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncology*. 2001;2(1):33-42.
  89. Liao XB, Tang SQ, Thrasher JB, Griebing TL, Li BY. Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2005;4(4):505-15.
  90. Lahorte CMM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, Van de Wiele C, Dierckx RA, Slegers G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2004;31(6):887-919.
  91. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-mediated programmed necrosis - A highly regulated way to die. *Cell Cycle*. 2007;6(21):2612-9.
  92. Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*. 2008;44(3):235-40.
  93. Moss SE, Morgan RO. The annexins. *Genome Biology*. 2004;5(4):8.
  94. Mochizuki T, Kuge Y, Zhao SJ, Tsukamoto E, Hosokawa M, Strauss HW, et al. Detection of apoptotic tumor response *in vivo* after a single dose of chemotherapy with Tc-99m-annexin V. *Journal of Nuclear Medicine*. 2003;44(1):92-7.
  95. Pec MK, Aguirre A, Moser-Thier K, Fernandez JJ, Souto ML, Dorta J, et al. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. *Biochemical Pharmacology*. 2003;65(9):1451-61.
  96. Gontijo SML, Gomes ADM, Gala-Garcia A, Sinisterra RD, Cortes ME. Evaluation of antimicrobial activity and cell viability of *Aloe vera* sponges. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2013;16(1):10.
  97. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays*. Assay Guidance Manual [internet]. 2013.
  98. Cortes ME, Sinisterra RD, Avila-Campos MJ, Tortamano N, Rocha RG. The chlorhexidine: beta-cyclodextrin inclusion compound: Preparation, characterization and microbiological evaluation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2001;40(4):297-302.
  99. Goulart Guimaraes PP, Oliveira SR, Rodrigues GdC, Lacerda Gontijo SM, Lula IS, Cortes ME, et al. Development of Sulfadiazine-Decorated PLGA Nanoparticles Loaded with 5-Fluorouracil and Cell Viability. *Molecules*. 2015;20(1):879-99.
  100. Bax A, Davis DG. Practical aspects of two-dimensional transverse noe spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance*. 1985;63(1):207-13.
  101. Denadai AML, Santoro MM, Da Silva LH, Viana AT, Santos RAS, Sinisterra RD. Self-assembly characterization of the beta-cyclodextrin and hydrochlorothiazide system: NMR, phase solubility, ITC and QELS. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2006;55(1-2):41-9.
  102. Nkabyo YS, Go YM, Ziegler TR, Jones DP. Extracellular cysteine/cystine redox regulates the p44/p42 MAPK pathway by metalloproteinase-dependent epidermal
-

growth factor receptor signaling. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(1):G70-G8.

103. Luo QO, Gu YH, Zheng W, Wu XX, Gong FY, Gu LY, et al. Erlotinib inhibits T-cell-mediated immune response via down-regulation of the c-Raf/ERK cascade and Akt signaling pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2011;251(2):130-6.

104. Mendes JB, Rocha MA, Araujo FA, Moura SAL, Ferreira M, Andrade SP. Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice. *Microvascular Research*. 2009;78(3):265-71.

105. Castro PR, Marques SM, Campos PP, Cardoso CC, Sampaio FP, Ferreira M, et al. Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvascular Research*. 2012;84(1):9-15.

106. Marques SM, Campos PP, Castro PR, Cardoso CC, Ferreira M, Andrade SP. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. *Microvascular Research*. 2011;82(3):246-52.

107. Teixeira AS, Araujo FA, Ferreira M, Barcelos LS, Teixeira MM, Andrade SP. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. *Life Sciences*. 2006;78(14):1637-45.

108. Sjogren G, Sletten G, Dahl JE. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 2000;84(2):229-36.

109. Qiu N, Cheng X, Wang GC, Wang WW, Wen JL, Zhang YK, et al. Inclusion complex of barbigerone with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Preparation and *in vitro* evaluation. *Carbohydrate Polymers*. 2014;101:623-30.

110. Garnero C, Zoppi A, Genovese D, Longhi M. Studies on trimethoprim:hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: aggregate and complex formation. *Carbohydrate Research*. 2010;345(17):2550-6.

111. Passos JJ, De Sousa FB, Mundim IM, Bonfim RR, Melo R, Viana AF, et al. *In vivo* evaluation of the highly soluble oral beta-cyclodextrin-Sertraline supramolecular complexes. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012;436(1-2):478-85.

112. Tien YC, Su CS, Lien LH, Chen YP. Recrystallization of erlotinib hydrochloride and fulvestrant using supercritical antisolvent process. *Journal of Supercritical Fluids*. 2010;55(1):292-9.

113. Lee YHP, Sathigari S, Lin YJJ, Ravis WR, Chadha G, Parsons DL, et al. Gefitinib-cyclodextrin inclusion complexes: physico-chemical characterization and dissolution studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2009;35(9):1113-20.

114. Patel RP, Patel MM. Preparation and Evaluation of Inclusion Complex of the Lipid Lowering Drug Lovastatin with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;6(1):25-36.

115. Turnbull WB, Daranas AH. On the value of  $c$ : Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(48):14859-66.

116. de Paula WX, Denadai AML, Santoro MM, Braga ANG, Santos RAS, Sinisterra RD. Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl-beta-CD: ESI mass-spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titration calorimetry



and anti-hypertensive studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;404(1-2):116-23.

117. Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 1998;98(5):1875-917.

118. Rekharsky M, Inoue Y, Tobey S, Metzger A, Anslyn E. Ion-pairing molecular recognition in water: Aggregation at low concentrations that is entropy-driven. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(50):14959-67.

119. Bijnsdorp IV, Kruyt FAE, Fukushima M, Smid K, Gokoel S, Peters GJ. Molecular mechanism underlying the synergistic interaction between trifluorothymidine and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in human colorectal cancer cell lines. *Cancer Science*. 2010;101(2):440-7.

120. Nadzri NM, Abdul AB, Sukari MA, Abdelwahab SI, Eid EEM, Mohan S, et al. Inclusion Complex of Zerumbone with Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin Induces Apoptosis in Liver Hepatocellular HepG2 Cells via Caspase 8/BID Cleavage Switch and Modulating Bcl2/Bax Ratio. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013:16.

121. Soica C, Dehelean C, Danciu C, Wang HM, Wenz G, Ambrus R, et al. Betulin Complex in gamma-Cyclodextrin Derivatives: Properties and Antineoplastic Activities in *In Vitro* and *In Vivo* Tumor Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(11):14992-5011.

122. Dehelean CA, Soica C, Peev C, Ciurlea S, Feflea S, Kasa P. A pharmacotoxicological evaluation of betulinic acid mixed with hydroxypropilgamma cyclodextrin on *in vitro* and *in vivo* models. *Farmacia*. 2011;59(1):51-9.

123. Hovgaard L. Drug-delivery studies in Caco-2 monolayers .4. absorption enhancer effects of cyclodextrins. *Pharmaceutical Research*. 1995;12(9):1328-32.

124. Irie T, Uekama K. Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1999;36(1):101-23.

125. Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J. Differential-effects of alpha-cyclodextrins, beta-cyclodextrins and gamma-cyclodextrins on human-erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1989;186(1-2):17-22.

126. Björkelund H, Gedda L, Malmqvist M, Andersson K. Resolving the EGF-EGFR interaction characteristics through a multiple-temperature, multiple-inhibitor, real-time interaction analysis approach. *Molecular and Clinical Oncology*. 2013;1(2):343-52.

127. Ling YH, Lin RP, Perez-Soler R. Erlotinib induces mitochondrial-mediated apoptosis in human H3255 non-small-cell lung cancer cells with epidermal growth factor receptor(L858R) mutation through mitochondrial oxidative phosphorylation-dependent activation of BAX and BAK. *Molecular Pharmacology*. 2008;74(3):793-806.

128. Lu YY, Jing DD, Xu M, Wu K, Wang XP. Anti-tumor activity of erlotinib in the BxPC-3 pancreatic cancer cell line. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(35):5403-11.

129. Giovannetti E, Lemos C, Tekle C, Smid K, Nannizzi S, Rodriguez JA, et al. Molecular mechanisms underlying the synergistic interaction of erlotinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with the multitargeted antifolate pemetrexed in non-small-cell lung cancer cells. *Molecular Pharmacology*. 2008;73(4):1290-300.

---

130. Emler DR, Brown KA, Kociban DL, Pollice AA, Smith CA, Ong BBL, et al. Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(10):2664-74.
131. Li TH, Ling YH, Goldman ID, Perez-Soler R. Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(11):3413-22.
132. Zhang HH, Yuan TZ, Li J, Liang Y, Huang LJ, Ye JC, et al. Erlotinib: An enhancer of radiation therapy in nasopharyngeal carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2013;6(4):1062-6.
133. Okamoto K, Okamoto I, Hatashita E, Kuwata K, Yamaguchi H, Kita A, et al. Overcoming Erlotinib Resistance in EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Targeting Survivin. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012;11(1):204-13.
134. Orzaez M, Guevara T, Sancho M, Perez-Paya E. Intrinsic caspase-8 activation mediates sensitization of erlotinib-resistant tumor cells to erlotinib/cell-cycle inhibitors combination treatment. *Cell Death & Disease*. 2012;3:9.
135. Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *Apmis*. 2004;112(7-8):496-507.
136. Kim JH, Lee SK, Ki MH, Choi WK, Ahn SK, Shin HJ, et al. Development of parenteral formulation for a novel angiogenesis inhibitor, CKD-732 through complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;272(1-2):79-89.
137. Ding G, Liu F, Feng C, Xu J, Ding Q. Association Between the Myeloperoxidase Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Prostate Cancer: A Case-Control Study in a Chinese Population. *Actas Urologicas Espanolas*. 2013;37(2):79-82.
138. Tucker SM, Pierce RJ, Price RG. Characterization of human n-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue-damage in disease. *Clinica Chimica Acta*. 1980;102(1):29-40.
139. Yano H, Hirayama F, Arima H, Uekama K. Prednisolone-appended alpha-cyclodextrin: Alleviation of systemic adverse effect of prednisolone after intracolonic administration in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;90(12):2103-12.
140. INCA. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).
141. Anders CK, Carey LA. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 2009;9:S73-S81.
142. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*. 2010;32(1-2):35-48.
143. Tassone P, Tagliaferri P, Perricelli A, Blotta S, Quaresima B, Martelli ML, et al. BRCA I expression modulates chemosensitivity of BRCA I-defective HCC1937 human breast cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2003;88(8):1285-91.
144. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models
-

for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(7):2750-67.

145. Johnson N, Johnson SF, Yao W, Li YC, Choi YE, Bernhardt AJ, et al. Stabilization of mutant BRCA1 protein confers PARP inhibitor and platinum resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(42):17041-6.

146. Lee H, Park HJ, Park CS, Oh ET, Choi BH, Williams B, et al. Response of Breast Cancer Cells and Cancer Stem Cells to Metformin and Hyperthermia Alone or Combined. *Plos One*. 2014;9(2):11.

147. Hollestelle A, Nagel JHA, Smid M, Lam S, Elstrodt F, Wasielewski M, et al. Distinct gene mutation profiles among luminal-type and basal-type breast cancer cell lines. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;121(1):53-64.

148. Song H, Hedayati M, Hobbs RF, Shao C, Bruchertseifer F, Morgenstern A, et al. Targeting Aberrant DNA Double-Strand Break Repair in Triple-Negative Breast Cancer with Alpha-Particle Emitter Radiolabeled Anti-EGFR Antibody. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013;12(10):2043-54.

149. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(5):1368-76.

150. Wright TC, Kuhn L. Alternative approaches to cervical cancer screening for developing countries. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2012;26(2):197-208.

151. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2015;65(2):87-108.

152. Meissner JD. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *Journal of General Virology*. 1999;80:1725-33.

153. Casagrande N, De Paoli M, Celegato M, Borghese C, Mongiat M, Colombatti A, et al. Preclinical evaluation of a new liposomal formulation of cisplatin, lipoplatin, to treat cisplatin-resistant cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2013;131(3):744-52.

154. Reck M, Popat S, Reinmuth N, De Ruyscher D, Kerr KM, Peters S, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014;25:27-39.

155. Chang TT, More SV, Lu N, Jhuo JW, Chen YC, Jao SC, et al. Polyfluorinated bipyridine cisplatin manipulates cytotoxicity through the induction of S-G(2)/M arrest and partial intercalation mechanism. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011;19(16):4887-94.

156. Xue R, Han N, Ye C, Wang LH, Yang JY, Wang Y, et al. The cytotoxic activities of cardiac glycosides from *Streptocaulon juvenas* and the structure-activity relationships. *Fitoterapia*. 2014;98:228-33.

157. Chen WB, Deng ZH, Chen KY, Dou DL, Song FB, Li LY, et al. Synthesis and *in vitro* anticancer activity evaluation of novel bioreversible phosphate inositol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;93:172-81.

---

158. Albert J, Bosque R, Crespo M, Garcia G, Granell J, Lopez C, et al. Cyclopalladated primary amines: A preliminary study of antiproliferative activity through apoptosis induction. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;84:530-6.
159. Liu MY, Xiao L, Chen GH, Wang YX, Xiong WX, Li F, et al. Oral JS-38, a metabolite from *Xenorhabdus* sp., has both anti-tumor activity and the ability to elevate peripheral neutrophils. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2014;12(10):768-76.
160. Andriani F, Perego P, Carenini N, Sozzi G, Roz L. Increased sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines after FHIT gene transfer. *Neoplasia*. 2006;8(1):9-17.
161. Chen YJ, Cheng YJ, Hung AC, Wu YC, Hou MF, Tyan YC, et al. The synthetic flavonoid WYC02-9 inhibits cervical cancer cell migration/invasion and angiogenesis via MAPK14 signaling. *Gynecologic Oncology*. 2013;131(3):734-43.
162. Boulikas T, Pantos A, Bellis E, Christofis P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy*. 2007;5:537-83.
163. Qiu L, Lv GC, Guo LB, Chen LP, Luo SN, Zou MF, et al. Synthesis, crystal structure and antitumor effect of a novel copper(II) complex bearing zoledronic acid derivative. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;89:42-50.
164. Liu YC, Chen ZF, Song XY, Peng Y, Qin QP, Liang H. Synthesis, crystal structure, cytotoxicity and DNA interaction of 5,7-dibromo-8-quinolinolato-lanthanides. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;59:168-75.
165. Quirante J, Ruiz D, Gonzalez A, Lopez C, Cascante M, Cortes R, et al. Platinum(II) and palladium(II) complexes with (N,N') and (C,N,N')(-) ligands derived from pyrazole as anticancer and antimalarial agents: Synthesis, characterization and *in vitro* activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2011;105(12):1720-8.
166. Galluzzi L, Vitale I, Senovilla L, Olaussen KA, Pinna G, Eisenberg T, et al. Prognostic Impact of Vitamin B6 Metabolism in Lung Cancer. *Cell Reports*. 2012;2(2):257-69.
167. Wang BL, Qian H, Yiu SM, Sun JW, Zhu GY. Platinated benzonaphthyridone is a stronger inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and a more potent anticancer agent than is the parent inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;71:366-73.
168. Gupta A, Mandal SK, Leblanc V, Descoteaux C, Asselin E, Berube G. Synthesis and cytotoxic activity of benzopyran-based platinum(II) complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(14):3982-7.
169. Fontes APS, deAlmeida SG, Nader LD. Platinum complexes in cancer chemotherapy. *Quimica Nova*. 1997;20(4):398-406.
170. Siddik ZH. Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: DNA-Interactive Alkylating Agents and Antitumour Platinum-Based Drugs. *The Cancer Handbook 1st Edition*. 2002:1-16.
171. Anitha P, Chitrapriya N, Jang YJ, Viswanathamurthi P. Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity of new ruthenium(II) complexes of thiosemicarbazone/semicarbazone bearing 9,10-phenanthrenequinone. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*. 2013;129:17-26.
-

172. Chen SJ, Kuo CC, Pan HY, Tsou TC, Yeh SC, Chang JY. Mechanistic basis of a combination D-penicillamine and platinum drugs synergistically inhibits tumor growth in oxaliplatin-resistant human cervical cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*. 2015;95(1):28-37.
173. Descoteaux C, Leblanc V, Belanger G, Parent S, Asselin E, Berube G. Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum(II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta. *Steroids*. 2008;73(11):1077-89.
174. Bergs JWJ, Haveman J, Ten Cate R, Medema JP, Franken NAP, Van Bree C. Effect of 41 degrees C and 43 degrees C on cisplatin radiosensitization in two human carcinoma cell lines with different sensitivities for cisplatin. *Oncology Reports*. 2007;18(1):219-26.
175. Dou YN, Zheng JZ, Foltz WD, Weersink R, Chaudary N, Jaffray DA, et al. Heat-activated thermosensitive liposomal cisplatin (HTLC) results in effective growth delay of cervical carcinoma in mice. *Journal of Controlled Release*. 2014;178:69-78.
176. Cann SAH, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*. 2003;79(938):672-80.
177. Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proceeding of the Royal Society of Medicine*. 1910;3(Surg Sect):1-48.
178. Kruse AM, Meenach SA, Anderson KW, Hilt JZ. Synthesis and characterization of CREKA-conjugated iron oxide nanoparticles for hyperthermia applications. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(6):2622-9.
179. Tseng CL, Chang KC, Yeh MC, Yang KC, Tang TP, Lin FH. Development of a dual-functional Pt-Fe-HAP magnetic nanoparticles application for chemo-hyperthermia treatment of cancer. *Ceramics International*. 2014;40(4):5117-27.
180. Kalamida D, Karagounis IV, Mitrakas A, Kalamida S, Giatromanolaki A, Koukourakis MI. Fever-Range Hyperthermia vs. Hypothermia Effect on Cancer Cell Viability, Proliferation and HSP90 Expression. *Plos One*. 2015;10(1):12.
181. Lei Y, Li B, Tong SY, Qi L, Hu XH, Cui YB, et al. miR-101 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor C That Inhibits Migration and Invasion and Enhances Cisplatin Chemosensitivity of Bladder Cancer Cells. *Plos One*. 2015;10(2):14.
182. Hilchie AL, Doucette CD, Pinto DM, Patrzykat A, Douglas S, Hoskin DW. Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. *Breast Cancer Research*. 2011;13(5):16.
183. Jaividhya P, Dhivya R, Akbarsha MA, Palaniandavar M. Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper(II) phenolate complexes: The role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;114:94-105.
184. Cameron RB, Hou DM. Intraoperative hyperthermic chemotherapy perfusion for malignant pleural mesothelioma: An *in vitro* evaluation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2013;145(2):496-504.
-

185. Wang Z, Shi XH, Wang J, Zhou TA, Xu YZ, Huang TT, et al. Synthesis, structure-activity relationships and preliminary antitumor evaluation of benzothiazole-2-thiol derivatives as novel apoptosis inducers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011;21(4):1097-101.
186. Hossain MI, Switalska M, Peng W, Takashima M, Wang N, Kaiser M, et al. Design, synthesis, and *in vitro* cancer cell growth inhibition evaluation and antimalarial testing of trioxanes installed in cyclic 2-enoate substructures. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;69:294-309.
187. Talancon D, Lopez C, Font-Bardia M, Calvet T, Quirante J, Calvis C, et al. Diastereomerically pure platinum(II) complexes as antitumoral agents. The influence of the mode of binding (187N)(-) of (1S,2R) - (eta(5)-C5H5) Fe{(eta(5)-C5H4) - CH=N - CH(Me) - CH(OH) - C6H5) and the arrangement of the auxiliary ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2013;118:1-12.
188. Zhao LF, Li X, Zhang LD, Ye TH, Zhu YX, Wei YQ, et al. Novel small molecules as apoptosis inducers: Synthesis, preliminary structure-activity relationships, and *in vitro* biological evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013;23(8):2293-7.
189. Katsumiti A, Gilliland D, Arostegui I, Cajaraville MP. Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 2014;153:39-52.
190. Ito A, Kuga Y, Honda H, Kikkawa H, Horiuchi A, Watanabe Y, et al. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Letters*. 2004;212(2):167-75.
191. Alvarez-Berrios MP, Castillo A, Rinaldi C, Torres-Lugo M. Magnetic fluid hyperthermia enhances cytotoxicity of bortezomib in sensitive and resistant cancer cell lines. *International Journal of Nanomedicine*. 2014;9:145-53.
192. Savic A, Filipovic L, Arandelovic S, Dojcinovic B, Radulovic S, Sabo TJ, et al. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum(II) iodido complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;82:372-84.
193. Fortin S, Brasseur K, Morin N, Asselin E, Berube G. New platinum(II) complexes conjugated at position 7 alpha of 17 beta-acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: Design, synthesis, structure activity relationships and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013;68:433-43.
194. Van der Zee J, Peer-Valstar JN, Rietveld PJM, de Graaf-Strukowska L, van Rhoon GC. Practical limitations of interstitial thermometry during deep hyperthermia. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 1998;40(5):1205-12.
-

## Anexo 1

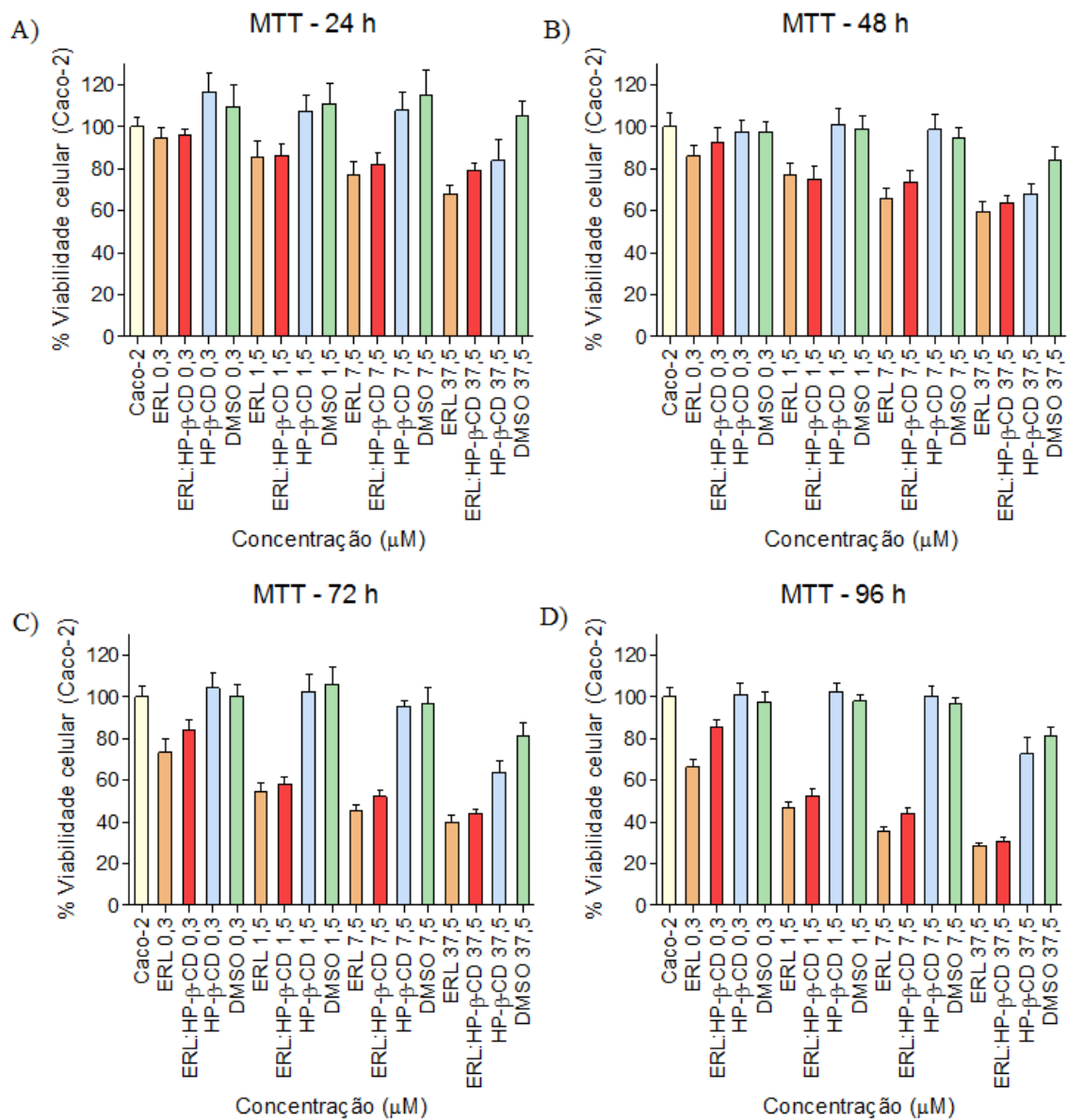


Fig. 29. Teste de citotoxicidade em células Caco-2 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL), da hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), do composto de inclusão (ERL:HP-β-CD) e do DMSO (37,5=0,81%v/v; 7,5=0,162%v/v; 1,5=0,0324%v/v; 0,3=0,00648%v/v) em diversas concentrações.

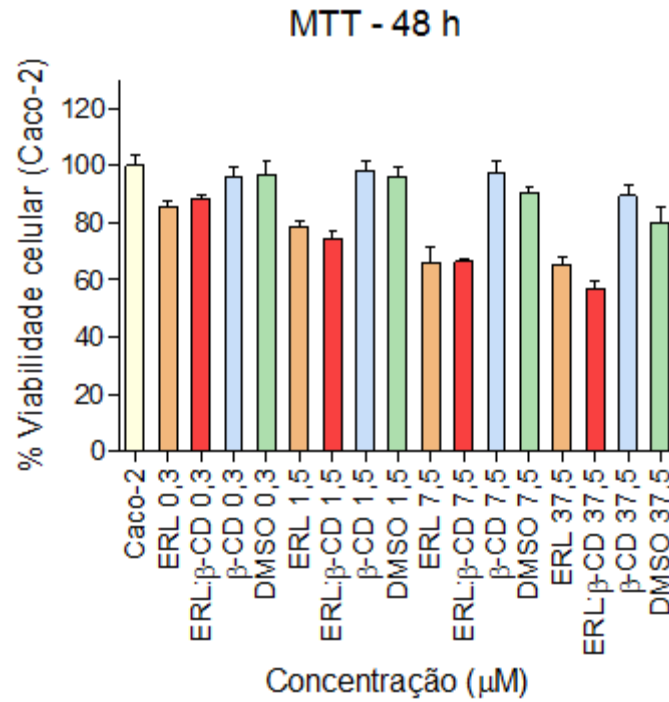


Fig. 30. Teste de citotoxicidade em células Caco-2 após 48 h na presença do erlotinibe livre (ERL), da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), do composto de inclusão (ERL: $\beta$ -CD) e do DMSO (37,5=0,81%v/v; 7,5=0,162%v/v; 1,5=0,0324%v/v; 0,3=0,00648%v/v) em diversas concentrações.



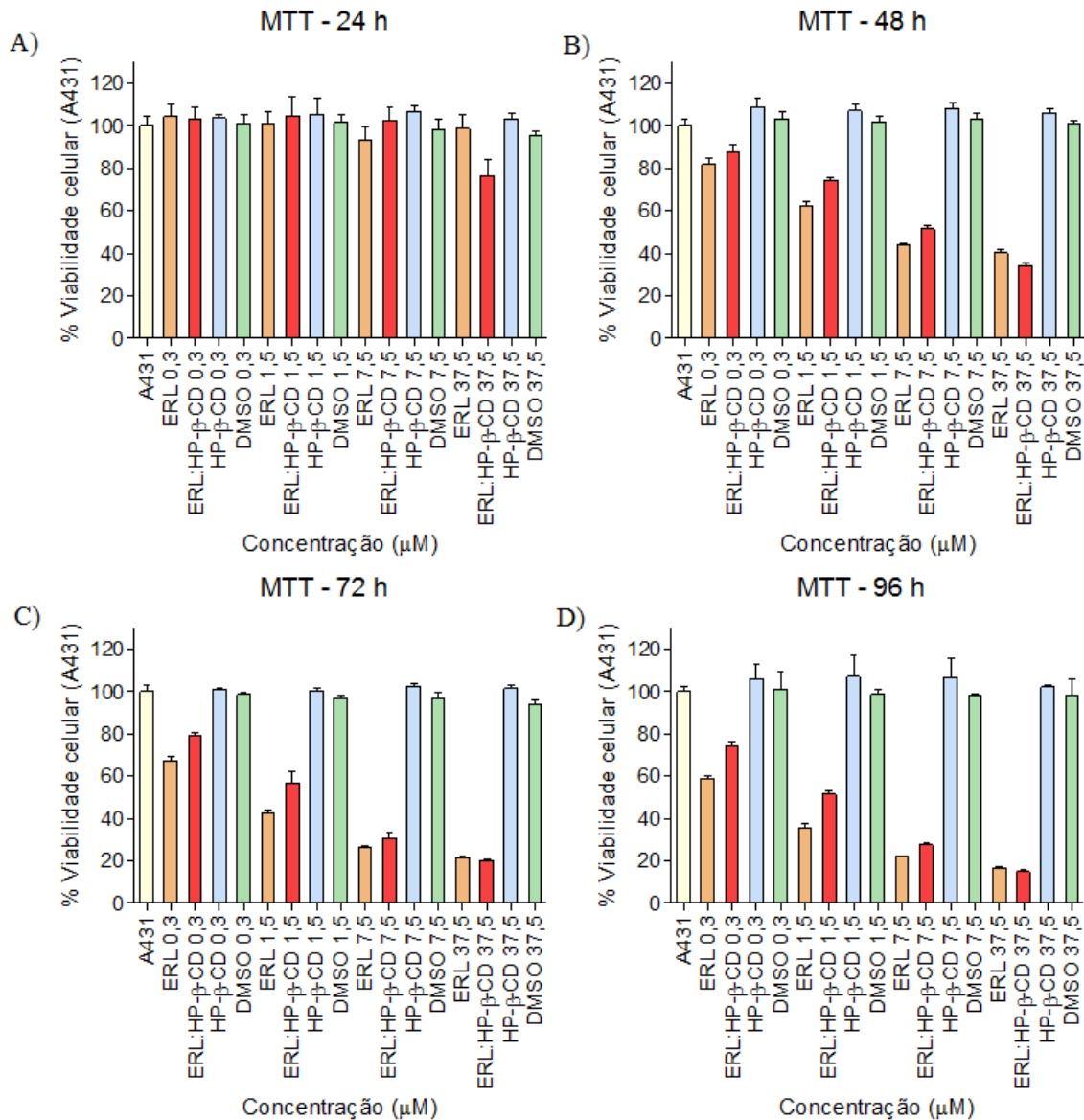


Fig. 31. Teste de citotoxicidade em células A431 após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL), da hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), do composto de inclusão (ERL:HP-β-CD) e do DMSO (37,5=0,1%v/v; 7,5=0,02%v/v; 1,5=0,004%v/v; 0,3=0,0008%v/v) em diversas concentrações.

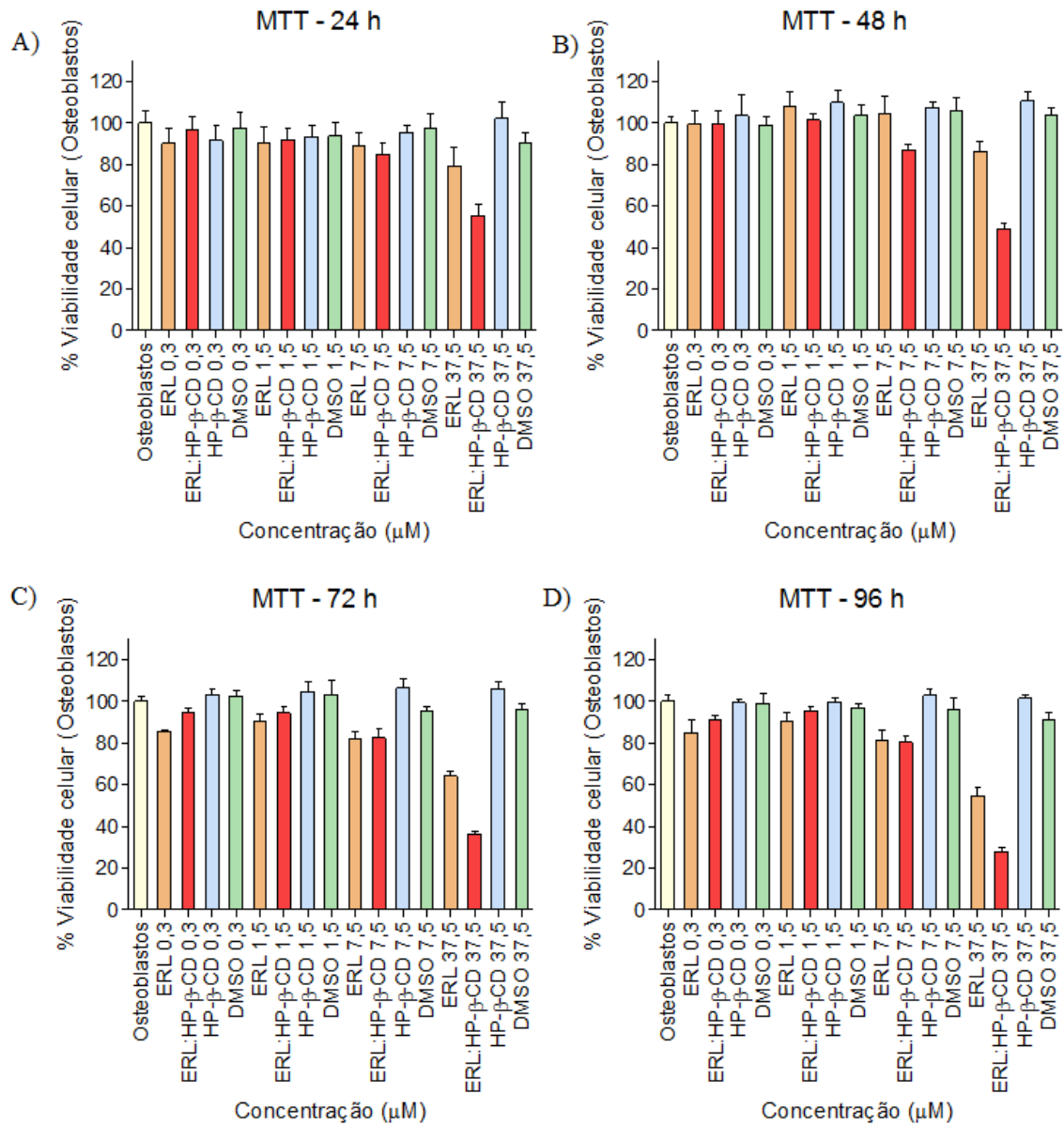


Fig. 32. Teste de citotoxicidade em osteoblastos após 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) h na presença do erlotinibe livre (ERL), da hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), do composto de inclusão (ERL:HP-β-CD) e do DMSO (37,5=0,1%v/v; 7,5=0,02%v/v; 1,5=0,004%v/v; 0,3=0,0008%v/v) em diversas concentrações.

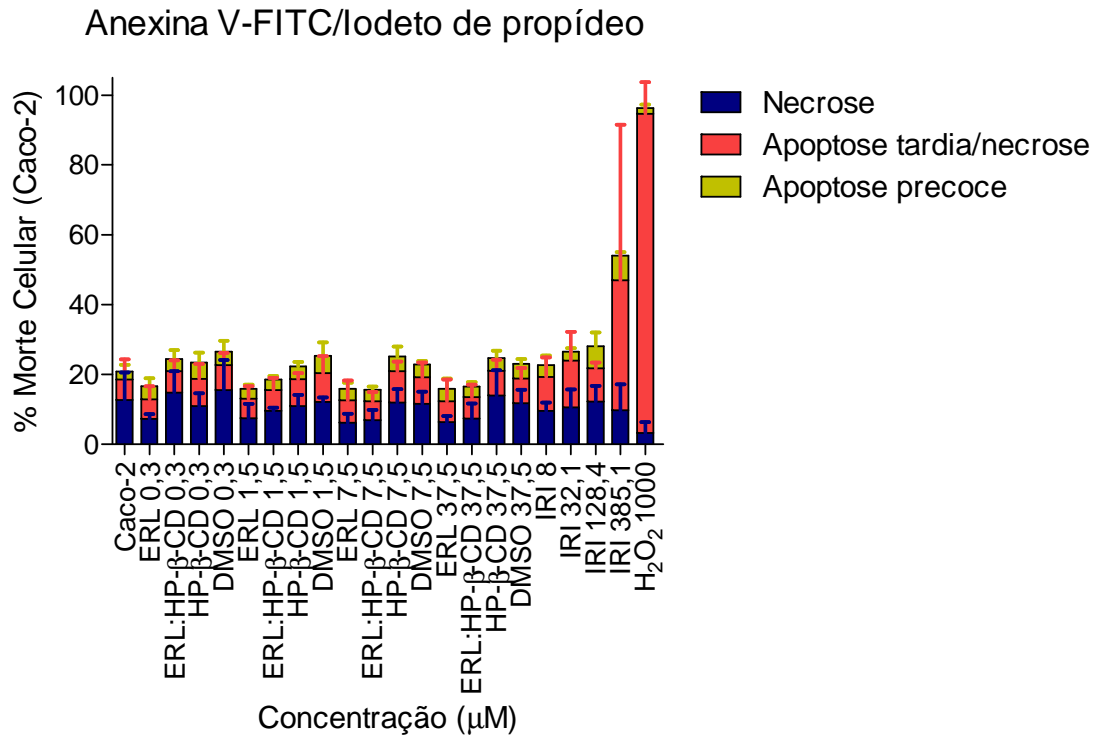


Fig. 33. Tipo de morte celular em Caco-2 após 48 h na presença do erlotinibe livre (ERL), do composto de inclusão (ERL:HP-β-CD), da hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), do DMSO (37,5=0,81%v/v; 7,5=0,162%v/v; 1,5=0,0324%v/v; 0,3=0,00648%v/v), do irinotecano (IRI) e do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

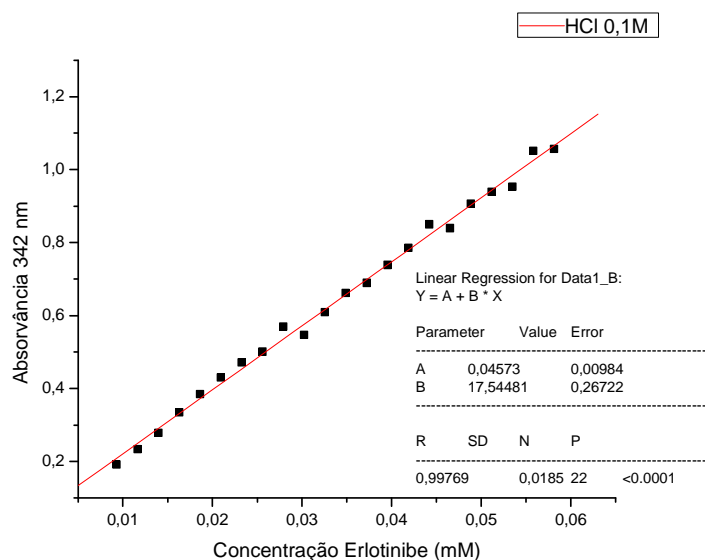


Fig. 34. Curva de calibração do ERL em HCl 0,1 M.

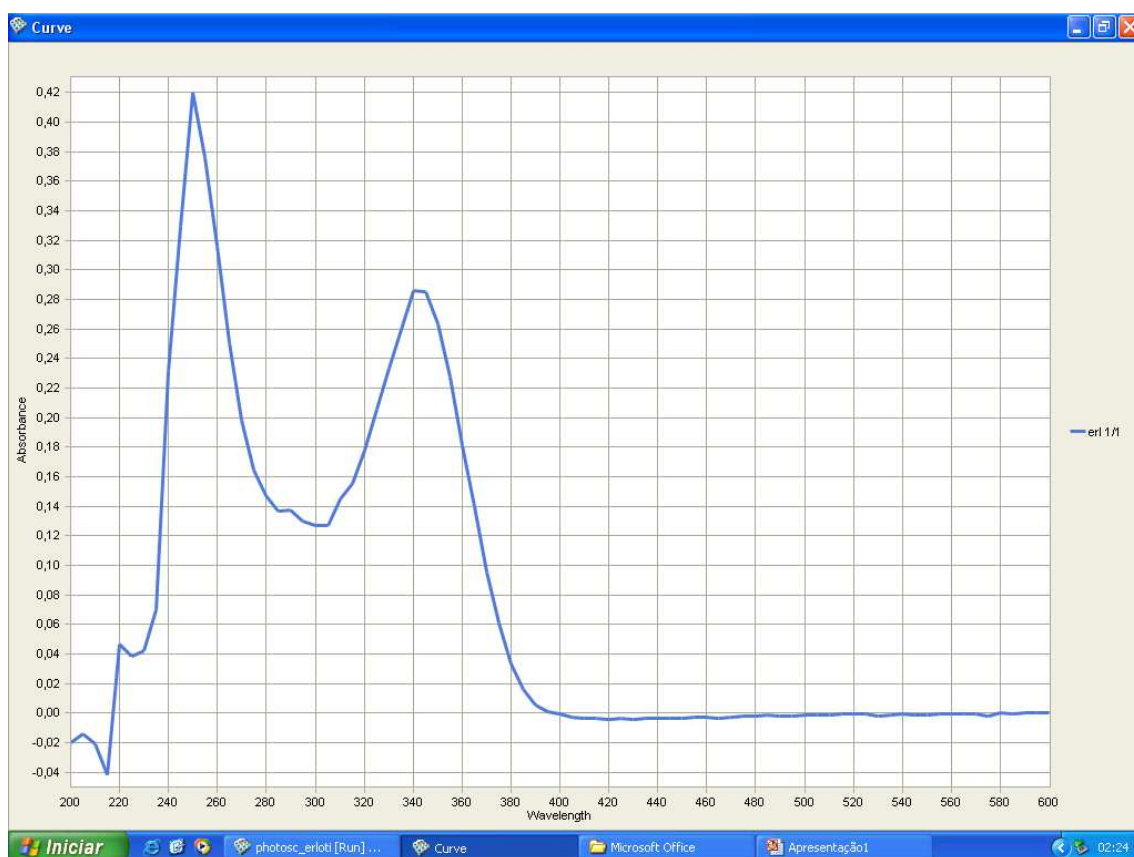


Fig. 35. Varredura do ERL no espectrofotômetro UV-visível.

## Anexo 2



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**CEUA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 267 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Ensaio pré-clínico de compostos com atividade anti-inflamatória, anti-angiogênica e anti-fibrogênica no modelo de implante de esponja”, que tem como responsável Silvia Passos Andrade, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 23/10/2014. Este certificado expira-se em 23/10/2019.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 267 / 2014, related to the Project entitled “Preclinical trial of antiinflammatory, antiangiogenic and antifibrogenic compounds in the sponge implant model”, under the supervision of Silvia Passos Andrade, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/10/2014. This certificates expires in 23/10/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende

Coordenador CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 23/10/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

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

**UFMG****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 91 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Composto de inclusão de erlotinibe em ciclodextrina: síntese, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e do potencial atitumoral", que tem como responsável Maria Esperanza Cortes Segura, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/05/2015. Este certificado espira-se em 12/05/2020.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 91 / 2015, related to the Project entitled "Erlotinib inclusion complex in cyclodextrin: synthesis, characterization and evaluation of biocompatibility and potential atitumoral", under the supervision of Maria Esperanza Cortes Segura, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/05/2015. This certificate expires in 12/05/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 12/05/2015.

Atenciosamente.

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

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