

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele

Raquel Petrilli

PETRILLI, R.

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no

carcinoma celular escamoso de pele

Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca

DOUTORADO

FCFRPUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Raquel Petrilli

Orientadora: Profa. Dra. Renata

Fonseca Vianna Lopez

Coorientador: Prof. Dr. Robert J.

Lee

Ribeirão Preto 2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Petrilli, Raquel

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele. Ribeirão Preto, 2016. 129 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Lopez, Renata Fonseca Vianna

1. Cetuximabe. 2. Imunolipossomas. 3. Carcinoma celular escamoso.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raquel Petrilli

Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof.Dr		
	Assinatura:	
Prof.Dr.		
	Assinatura:	
Prof.Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof.Dr.		
Instituição:	Assinatura:	

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar, ao meu irmão Nando (*in memorian*), que sempre me inspirou a ser forte e batalhar pelos meus sonhos. Infelizmente ele não teve tempo suficiente nesta vida para que pudesse defender seu doutorado, por isso dedico esta tese a ele que sempre batalhou por ser doutor;

À minha mãe Claudete, pelo apoio incondicional e por sempre me incentivar e me mostrar os melhores caminhos para a felicidade e realização;

Ao meu pai, por se esforçar sempre para que pudéssemos nos dedicar aos estudos, sempre incentivando também;

Ao meu marido Josimar, um parceiro de vida e de profissão, muito paciente e amoroso, que sempre me apoia em busca dos meus sonhos

A Deus, por me dar saúde e inspiração nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Claudete pelo apoio nestes anos todos de dedicação. Agradeço imensamente pela paciência e amor que teve e tem por mim, e por me incentivar a sempre prosseguir os estudos em busca dos meus sonhos;

Ao meu pai, Fernando, que sempre batalhou para que tivéssemos tudo em casa e pudéssemos nos dedicar integralmente aos nossos sonhos;

Ao meu marido Josi, por estar sempre presente e apoiar cada passo com palavras de incentivo e amor. Obrigada pela paciência quando eu estive atarefada e por todo o carinho, além das discussões frequentes sobre este trabalho, correções e ajuda experimental constante;

Ao meu irmão Nando (*in memorian*) que me incentivou e sempre foi um modelo de integridade e honestidade. Que esta tese possa de alguma forma homenagear todo seu esforço na tentativa de concluir seu doutorado;

A minha irmã Dani, meus sogros Irani e José, cunhados Juliano e Bruno e meus sobrinhos (as) lindos Yasmin, Ana Lívia, Beatriz e Miguel por admirarem meu trabalho e incentivarem. Agradeço aos meus sobrinhos pelo carinho e amor;

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, por estar sempre presente nas discussões deste trabalho, por apoiar e confiar no meu trabalho. Agradeço as inúmeras oportunidades que tive em seu laboratório, que certamente acrescentaram muito conhecimento. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Robert J Lee, co-orientador deste trabalho da Ohio State University, pelos conhecimentos compartilhados comigo durante o meu estágio em seu laboratório e por estar sempre presente. Agradeço também as inúmeras oportunidades que me deu;

A todos os colegas de laboratório, no Brasil e no exterior pelo apoio e amizade;

Às funcionárias do laboratório Patrícia Sper e Marina Claro de Souza pela ajuda em alguns experimentos desta tese. Agradeço pela amizade, profissionalismo e paciência, principalmente com aqueles experimentos longos em que necessitei de dias de ajuda.

A funcionária Deise Chesca (FMRP) pela ajuda no preparo de lâminas histológicas e imunohistoquímica;

Ao funcionário Eduardo Tozzatto (FCFRP) pela ajuda nas análises por microscopia confocal;

A funcionária Fabiana (FCFRP) pela ajuda nas análises por citometria de fluxo;

Aos funcionários do biotério da FCFRP pelo cuidado com os animais empregados neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Luciano Neder Serafini, da FMRP, por permitir o uso de suas instalações para o preparo das lâminas histológicas;

A Profa. Fernanda Maris Peria pela ajuda científica na elaboração do projeto;

Ao Prof. Dr. Yasuro Sugimoto, da Ohio State University, pelas discussões e ajuda;

Ao James Hospital (Columbus) e Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela doação de cetuximabe para a realização deste trabalho;

Ao Dr. Fabiano Saggioro, do HCRP, pela ajuda nas análises histológicas e imunohistoquímicas;

A FAPESP, por apoiar este trabalho com bolsa de doutorado no Brasil e no exterior (Processos n° 2012/23764-3 e 2013/15134-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e com projeto de auxílio (Projeto Temático 2014/22451-7).

Ao CNPq pelo apoio financeiro (Proc. 480962/2013-8).

RESUMO

PETRILLI, R. Aplicação tópica de lipossomas contendo cetuximabe: efeito do uso de métodos físicos de penetração cutânea no carcinoma celular escamoso de pele. 2016. 129f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O carcinoma de células escamosas (SCC) é um tumor maligno de origem epitelial no qual o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) está superexpresso e associado a malignização. O cetuximabe é um anticorpo monoclonal, capaz de se ligar seletivamente ao EGFR. A combinação de cetuximabe com o quimioterápico hidrofílico 5-fluorouracil (5-FU) é utilizada na clínica pela via intravenosa e é associada a efeitos colaterais. A administração tópica de 5-FU também é realizada a partir de cremes convencionais, porém sua eficácia é limitada a doenças pré-cancerosas e o carcinoma basocelular. Estima-se que a conjugação do cetuximabe à superfície de lipossomas. os quais podem ser administrados na pele em associação a um método físico, como a iontoforese, seja capaz de direcionar a liberação do 5-FU para as camadas da pele onde os tumores estão presentes, além de aumentar o uptake celular em linhagem EGFR positiva, viabilizando o tratamento tópico de SCC. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do cetuximabe conjugado a um lipossoma (imunolipossoma) na penetração cutânea passiva e iontoforética do 5-FU e na regressão do SCC. Para tanto, um método analítico e um método bioanalítico foram desenvolvidos e validados para quantificação de 5-FU. Lipossomas convencionais foram preparados a partir de diferentes composições lipídicas, métodos de preparo e razão fármaco/lipídeo para selecionar aqueles que encapsulassem maior porcentagem de 5-FU. Lipossomas compostos por 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina e colesterol (DSPC:Chol, 55:45), preparados por hidratação do filme lipídico, na razão fármaco/ lipídeo 0.1, de aproximadamente 140 nm. foram escolhidos por encapsularem cerca de 50% de 5-FU. Para obtenção dos imunolipossomas, o cetuximabe foi conjugado lipídeo DSPE primeiramente ao acoplado ligante maleimida(polietilenoglicol)-2000 (DSPE-PEG-Mal), resultando em 94% de eficiência de conjugação. Os imunolipossomas foram então obtidos da mesma forma que os lipossomas e apresentaram tamanho e porcentagem de encapsulação do 5-FU semelhante a apresentada pelos lipossomas. Estudo in vitro em linhagem EGFR positiva (A431) mostrou sinergismo entre 5-FU e imunolipossoma, resultando em valores de IC50 cerca de 3 vezes menores do que o apresentado pelo 5-FU em solução. O uptake celular do imunolipossoma foi 3,5 vezes maior do que o do lipossoma. Nos estudos de penetração cutânea in vitro observou-se que, em relação a uma solução de 5-FU, lipossomas e imunolipossomas diminuíram a quantidade de 5-FU que atravessou a pele. A iontoforese aumentou a penetração do 5-FU a partir de todas as formulações. Neste caso, o acúmulo de 5-FU na epiderme viável, onde os tumores estão presentes, foi duas vezes maior quando este estava encapsulado no imunolipossoma em relação ao lipossoma. In vivo, as formulações foram administradas por via subcutânea ou tópica usando iontoforese em modelo xenográfico de SCC. O tratamento com os imunolipossomas diminuiu o crescimento tumoral em mais de 60% em relação ao controle e em torno de 50% em relação aos tratamentos com solução e lipossoma de 5-FU. A administração tópica por iontoforese apresentou maior redução tumoral do que a subcutânea quando os tumores foram tratados com solução de 5-FU e lipossomas, mas foi igualmente eficaz para os imunolipossomas. Análise imunohistológica revelou que o potencial de proliferação celular foi reduzido para os grupos tratados. Desta forma, a administração por iontoforese de imunolipossomas contendo 5-FU é uma estratégia promissora para o tratamento tópico de SCC.

Palavras-chave: lipossoma, imunolipossoma, cetuximabe, 5-fluorouracil, câncer de pele, carcinoma celular escamoso.

ABSTRACT

PETRILLI, R. Topical application of liposomes containing cetuximab: effect of physical methods for skin penetration in skin squamous cell carcinoma. 2016. 129f Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant tumor of epithelial origin in which the epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed and associated with malignization. Cetuximab is a monoclonal antibody, able to selectively bind EGFR. The combination of the chemotherapy with the hydrophilic drug 5-fluorouracil (5-FU) and cetuximab is applied in the clinic by intravenous injection and is associated with side effects. Cetuximab conjugation onto liposomal surface, which can be administered topically onto the skin using physical methods, such as iontophoresis, is able to direct 5-FU release to the skin layers where tumors are localized and to increase cellular uptake in EGFR positive cells, making possible the topical treatment of SCC. Thus, the objective of this work was to investigate the influence of cetuximab conjugation to liposomes (immunoliposomes) in the passive and iontophoresis skin penetration of 5-FU and SCC regression. For this purpose, an analytical and a bioanalytical method were developed and validated for 5-FU quantification. Then, conventional liposomes were prepared using different lipid compositions, preparation methods and drug to lipid ratios in order to select those able to load higher percentages of 5-FU. Liposomes composed by 1,2-Distearoylsn-glycero-3-phosphocholine and cholesterol (DSPC:Chol, 55:45) prepared by the thin lipid film hydration with drug/lipid ratio 0.1 with approximately 140 nm, were chosen because they encapsulated about 50% of 5-FU. For the obtainment of immunoliposomes, cetuximab was first coupled to the lipid DSPE linked to maleimide (polyethylene glycol)-2000 (DSPE-PEG-Mal) as an anchor for the antibody conjugation, resulting in 94% coupling efficiency. The immunoliposomes were obtained similarly to liposomes, with similar particle size and loading efficiency of 5-FU. In vitro studies using EGFR positive cells (A431) showed synergism for 5-FU and cetuximab, resulting in IC50 values about 3 times lower than 5-FU solution. Cellular uptake of immunoliposomes increased 3.5-fold compared to the liposomes. In vitro skin penetration studies revealed that, compared to the 5-FU solution, liposomes and immunoliposomes reduced the amount of 5-FU that passed through the skin. Iontophoresis increased the amount of 5-FU retained in viable epidermis for all formulations. In this case, the amount of 5-FU in viable epidermis, where tumors are localized, was 2 times higher when it was encapsulated in immunoliposomes compared to liposomes. In vivo, the formulations were administered subcutaneously or topically with iontophoresis in xenograft animal model of SCC. Treatment with immunoliposomes reduced tumor growth more than 60% compared to the negative control and about 50% compared to the treatments with 5-FU solution and liposomes. The topical administration using iontophoresis resulted in improved tumor reduction compared to the subcutaneous administration when tumors were treated with 5-FU solution and liposomes, but was equally effective for the immunoliposomes. The histological analysis showed the reduction of cellular proliferation for the treated groups. In conclusion, the administration of immunoliposomes containing 5-FU using iontophoresis is a promising strategy for the topical treatment of SCC.

Keywords: liposome, immunoliposome, cetuximab, 5-fluorouracil, skin cancer, squamous cell carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. EGFR transmite sinais de sobrevivência e proliferação celular	06
através de diferentes vias de sinalização (Adaptado de RATUSHNY et. al.,	
2009).	
Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura do anticorpo quimérico	07
cetuximabe, mostrando a região variável e a constante (Adaptado de	
https://www.neb.com, acesso em novembro/2016).	
Figura 3. Estrutura do 5-fluorouracil.	09
Figura 4. Pele e suas camadas. A) Representação esquemática dos	11
componentes do estrato córneo (Adaptado de HARDING, 2004) e B)	
camadas da pele (Adaptado de BEAR et al.,2002)	
Figura 5. Esquema ilustrativo da acumulação de lipossomas e moléculas	13
pequenas em tecidos normais e tumorais (efeito EPR) (Adaptado de MILLA	
et al, 2012).	
Figura 6. Lipossomas. A) Lipossoma convencional. B) Lipossoma	15
funcionalizado com anticorpo - imunolipossoma. C) Representação do	
uptake de imunolipossomas por células que contém receptores para o	
anticorpo (Adaptado de ELOY et al., 2014).	
Figura 7. Representação esquemática de imunolipossomas. A figura mostra	15
diferentes modos de conjugação do anticorpo ao lipossoma: no Tipo A o	
anticorpo é diretamente conjugado ao lipossoma, enquanto que no Tipo B o	
anticorpo é conjugado ao lipossoma usando um espaçador flexível	
(Adaptado de IYER et al., 2011).	
Figura 8. Figura esquemática de um aparato para iontoforese com sistema	18
de eletrodos Ag/AgCl. O ânodo possui um fármaco ionizável D+ e seu contra	
íon A ⁻ (GRATIERI et al., 2008). Para facilitar a passagem da corrente	
elétrica e as reações eletroquímicas, o sal Na+Cl- está presente nos dois	
compartimentos.	
Figura 9. Representação esquemática dos métodos de preparo de	32
lipossomas: A) encapsulação ativa por gradiente usando Cu:PEI e B)	
evaporação de fase reversa (Adaptado de PETRILLI et al., 2016).	
Figura 10. Reação de tiolação do cetuximabe (Adaptado de	34
http://www.google.com/patents/US7691826, acesso em novembro/2016).	
Figura 11. Ilustração do experimento de penetração cutânea passivo (A) e	40

de iontoforese (B)	١.
------------------	----	----

Figura 12. Esquema dos protocolos de tratamento realizado para cada uma 44 das vias de administração: subcutânea e tópica (iontoforese) Figura 13. Tratamento tópico dos camundongos usando iontoforese 45 anódica. Figura 14. Curva analítica determinada por espectrofotometria para o 5-FU 50 em 265 nm. Figura 15. Valores de pKa determinados para o 5-FU utilizando o software 52 Marvin Sketch versão 6.2 (ChemAxon). Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE das soluções de 5-FU e 53 amostras de pele em diferentes solventes: A) Padrão 5-FU em água (sem pele); B) Amostra de pele em água; C) Padrão de 5-FU em metanol (sem pele); D) Amostra de pele em metanol; E) Padrão de 5-FU em acetonitrila (sem pele); F) Amostra de pele em acetonitrila e G) Amostra matrizada de 5-FU com pele após partição líquido-líquido com acetato de etila. Figura 17. Cromatograma da solução de 5-FU matrizada com pele em água 55 após partição para o acetato de etila e em presença de timina (PI). Figura 18. Curva bioanalítica determinada por CLAE para o 5-FU 55 recuperado da pele utilizando partição água/acetato de etila e timina a 2 µg/mL como PI. Figura 19. Avaliação da penetração cutânea do 5-FU na pele (A) e através 58 dela (B) a partir de solução e creme comercial contendo 5-FU após 24 h. Figura 20. A e B) Cromatogramas dos imunolipossomas e dos 65 imunolipossomas contendo 5-FU, respectivamente após eluição em coluna CL-4B com tampão PBS-EDTA 5 mM, pH 8, obtidos por leitura em espectrofotômetro em 562 nm e C) Eletroforese em gel SDS-Page para cetuximabe livre, em imunolipossomas e em imunolipossomas contendo 5-FU. Figura 21. A) Lipossomas visualizados em TEM e B) Imunolipossomas 67 visualizados em TEM, ambos com contrastação negativa usando acetato de uranila, aceleração de 100 kV e aumento de 200000 vezes. Figura 22. Viabilidade celular em linhagem A431: A) solução de 5-FU; B) 68

solução de cetuximabe; C) lipossomas branco, lipossomas 5-FU e

imunolipossomas após 72 h de tratamento e D) lipossomas branco, lipossomas 5-FU e imunolipossomas após 120 h de tratamento.

Figura 23. Internalização pelas células A431 após 3 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Figura 24. Internalização pelas células A431 após 6 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Figura 25. Internalização pelas células A431 após 24 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Figura 26. Gráficos de citometria de fluxo obtidos para A) Controle sem tratamento; B) Lipossomas; C) Imunolipossomas; Em D e E, Q4 representa as células vivas (sem marcação de iodeto de propídeo) e marcadas com Dio, sendo que D expressa os resultados em número de células e E representa intensidade de fluorescência.

Figura 27. Internalização pelas células B16F10 (EGFR negativas) após 24 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Figura 28. Gráficos de citometria de fluxo obtidos para a linhagem B16F10 77

71

72

73

74

(EGFR negativa) sendo A) Controle sem tratamento; B) Lipossomas; C) Imunolipossomas; Em D e E Q4 representa as células vivas (sem marcação de iodeto de propídeo) e marcadas com Dio (marcador dos lipossomas/imunolipossomas, sendo que em D os resultados estão expressos como número de células e em E expressos como intensidade de fluorescência).

Figura 29. Curvas de liberação de 5-FU (%) em função do tempo a partir da solução, lipossomas e imunolipossomas usando o dispositivo Amicon (50 kDa) para separação da fração livre e encapsulada.

Figura 30. Quantidade de 5-FU retida na epiderme viável para soluções de 5-FU nas concentrações de 130 μg/mL e 500 μg/mL após experimento de penetração passiva ou iontoforese por 6 h. Teste estatístico One-way ANOVA com pós teste de Tukey * (p<0,05).

Figura 31. Quantidade de 5-FU retida na epiderme viável (A) e acumulada no compartimento receptor (B) para lipossomas e imunolipossomas de 5-FU na concentração de 500 μg/mL após experimento de penetração passiva ou iontoforese por 6 h. A quantidade de 5-FU obtida no estrato córneo não pôde ser quantificada pelo método analítico utilizado (abaixo do LOQ). Teste estatístico One-way ANOVA com pós teste de Tukey, sendo a significância estatística estabelecida como p < 0,05 (*).

Figura 32. Resistência das peles ao final dos experimentos usando soluções de 5-FU na concentração de 500 μg/mL após experimento de penetração passiva ou iontoforese por 6 h para A) solução, B) lipossomas e C) imunolipossomas.

Figura 33. 5-FU nos folículos pilosos após aplicação da iontoforese (0,5 mA/cm² por 6 h) usando soluções, lipossomas e imunolipossomas de 5-FU na concentração de 500 μg/mL. A) Concentração de 5-FU no folículo (p=0,40, Teste estatístico one-way ANOVA). B) Relação entre a quantidade de 5-FU na epiderme viável e no folículo.

Figura 34. Modelo xenografico com células A431 injetadas 91 subcutaneamente em camundongos *Swiss nude*. Imagem do tumor desenvolvido no animal 12 dias após a injeção, medindo aproximadamente 100 mm³.

79

81

84

88

Figura 35. Volumes tumorais de células A431 injetadas em camundongos *Swiss nude* obtidos com o tratamento por injeção subcutânea de PBS (controle negativo), solução 5-FU, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU. As doses utilizadas foram 10 mg/kg de 5-FU e 20 μg de cetuximabe por μmol de lipídeo, aplicadas subcutaneamente a cada 3-4 dias no total de 6 doses. Teste estatístico twoway ANOVA com pós-teste de Bonferroni indicado no texto (* p<0,05 imunolipossomas vs. PBS e solução de 5-FU; ** p<0,05 imunolipossomas vs. lipossoma).

Figura 36. Fotografia dos tumores, após biópsia, ao final do tratamento por via subcutânea com PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV).

Figura 37. Massa corporal dos camundongos durante o estudo *in vivo* com tratamento subcutâneo de formulações contendo 10 mg/kg de 5-FU administradas a cada 3-4 dias num total de 6 doses.

Figura 38. Imagens representativas de cortes histológicos dos grupos PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV) corados com hematoxilina-eosina. As setas vermelhas indicam a presença de mitoses.

Figura 39. Imagens representativas de cortes histológicos corados com anticorpo anti Ki-67 dos grupos PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV) com aumento de 200X. Os núcleos castanhos indicam a presença de proliferação celular.

Figura 40. Volumes tumorais de células A431 injetadas em camundongos *Swiss nude* obtidos com o tratamento tópico usando iontoforese com solução 5-FU, solução 5-FU e cetuximabe, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU em relação ao grupo de animais não tratados (controle negativo). As formulações continham 500 μg/mL de 5-FU e 20 μg de cetuximabe por μmol de lipídeo, aplicadas topicamente a cada 3-4 dias no total de 6 doses. Teste estatístico two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni indicado no texto (* p<0,05 vs. PBS, ** solução de 5-FU vs. imunolipossomas).

92

95

- **Figura 41.** Fotografia dos tumores dos grupos tratados por iontoforese: controle não tratado (I), solução de 5-FU (II), solução de 5-FU e cetuximabe (III), lipossoma contendo 5-FU (IV) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (V), extraídos ao final do estudo (6 doses de tratamentos) após biópsia.
- **Figura 42.** Massa corporal dos camundongos durante o estudo *in vivo* com tratamento tópico com iontoforese de formulações administradas a cada 3-4 dias num total de 6 doses.
- **Figura 43.** Imagens representativas de cortes histológicos dos grupos 100 tratados topicamente por iontoforese com solução 5-FU (A), solução de 5-FU e cetuximabe (B), lipossoma contendo 5-FU (C) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (D) corados com hematoxilina-eosina com aumento de 200X. As setas vermelhas indicam áreas com queratinização.
- **Figura 44.** Imagens representativas de cortes histológicos corados com anticorpo anti Ki-67 dos grupos tratados topicamente por iontoforese com solução 5-FU (A), solução de 5-FU e cetuximabe (B), lipossoma contendo 5-FU (C) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (D) com aumento de 200X. Os núcleos castanhos indicam a presença de proliferação celular.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da precisão e exatidão intra e inter-ensaio para o	51
método espectrofotométrico de quantificação de 5-FU.	
Tabela 2 - Resultados da precisão e exatidão intra e inter-ensaio para o	56
método por CLAE de quantificação de 5-FU em pele.	
Tabela 3 – Valores de recuperação de 5-FU proveniente de amostras de pele	56
de orelha de suínos.	
Tabela 4 - Estabilidade das amostras de 5-FU da curva matrizada com	57
presença de PI após três ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento	
(temperatura ambiente).	
Tabela 5 - Efeito da composição, razão fármaco/lipídeo e métodos de	61
preparo no tamanho, potencial zeta e porcentagem de encapsulação de 5-	
FU.	
Tabela 6 - Avaliação da estabilidade dos lipossomas compostos por	63
DSPC:Col (55:45), na razão fármaco/lipídeo 0,1 por 30 dias, armazenadas a	
4°C.	
Tabela 7 - Comparação de lipossomas não peguilados e peguilados com	64
relação ao tamanho de partícula, PdI, potencial zeta e eficiência de	
encapsulação.	
Tabela 8 – Caracterização de imunolipossomas contendo ou não 5-FU.	66
Tabela 9 – Valores de IC50 obtidos para as diferentes formulações após 72 h	69
ou 120 h de incubação em linhagem A431.	
Tabela 10 – Índice de combinação (CI) para a associação cetuximabe e 5-FU	69
em solução e em lipossoma após 120 h de tratamento.	
Tabela 11 – Permeação e retenção do 5-FU na pele em função do tempo de	82
iontoforese a partir da solução de 5-FU a 500 μg/mL.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU 5-fluorouracil

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC American Type Culture Collection

BCA Ácido bicinconínico

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

Col Colesterol

CV Coeficiente de variação

Dio 3,3'-Dioctadeciloxacarbocianina perclorato

DLS Espalhamento dinâmico da luz

DMSO Dimetilsulfóxido
DOX Doxorrubicina

DPPC 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DSPC 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DSPE-PEG- 1,2-distearol-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-

2000 [amino(polietilenoglicol)-2000]

DSPE-PEG-Mal 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-

N[maleimida(polietileno glicol)-2000] (sal de amônio)

DSPE-PEG-NH₂ 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-

[amino(polietilenenoglycol)-2000] (sal de amônio)

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EE Eficiência de encapsulação

EGFR Receptor de fator de crescimento epidermal

EPR Efeito permeabilidade e retenção aumentada

FBS Soro bovino fetal

FDA Food and Drug Administration

IC50 Half maximum inhibitory concentration

ICH International Conference on Harmonisation

LOD Limite de detecção

LOQ Limite de quantificação

Mal Maleimida

MTT Brometo de (4,5-dimetilltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

PBS Tampão fosfato
PEG Polietilenoglicol
PEI Polietilenimina

SCC Carcinoma de células escamosas

SD Desvio padrão

SDS-Page Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

SPC Fosfatidilcolina de óleo de soja

TBS Tris-buffered saline

TEM Microscopia eletrônica de trasmissão

Tr Tempo de retenção

UV Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	ij
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	iχ
Lista de abreviaturas e siglas	Х
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Carcinoma de células escamosas	5
2.2 Tratamento	6
2.3 Vias de administração	Ĝ
2.4 Sistemas de Liberação	12
2.5 Métodos físicos de promoção da penetração cutânea de fármacos	17
	20
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	
	24
4.1.1 Substâncias químicas	24
4.1.2 Linhagens celulares	25
4.2 Métodos	25
4.2.1 Desenvolvimento e validação de métodos analítico e bioanalíticos	25
4.2.1.1 Quantificação do 5-FU em lipossomas por espectrofotometria	25
A) Especificidade	25
B) Linearidade	26
C) Precisão e exatidão	26
D) Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	27
4.2.1.2. Quantificação do 5-FU em pele por cromatografia líquida de alta	27
eficiência (CLAE)	
A) Especificidade	28
B) Linearidade	29
C) Precisão, exatidão, LOD e LOQ	29
D) Estabilidade	29
E) Avaliação da recuperação	29
F) Aplicação do método	30
4.2.2 Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo 5-FU	30
4.2.2.1 Métodos de preparo	30
4.2.2.2 Tamanho de partícula e potencial zeta	33
4.2.2.3 Porcentagem de encapsulação de 5-FU	33

4.2.2.4 Estabilidade dos lipossomas	33
4.2.3 Desenvolvimento e caracterização de imunolipossomas	34
4.2.3.1 Preparo do cetuximabe para conjugação aos lipossomas	34
4.2.3.2 Preparo dos imunolipossomas	34
4.2.3.3 Quantificação do cetuximabe conjugado aos lipossomas por BCA	35
4.2.3.4 Integridade da estrutura primária do cetuximabe	36
4.2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	36
4.2.4 Avaliação in vitro em linhagem de carcinoma celular escamoso de pele	37
humana (A431) EGFR positiva	
4.2.4.1 Cultivo de células	37
4.2.4.2 Avaliação da citotoxicidade	37
4.2.5 Avaliação do uptake celular de lipossomas e imunolipossomas em	38
linhagem EGFR positiva (A431) e negativa (B16F10)	
4.2.5.1Cultivo de células	38
4.2.5.2Microscopia confocal	38
4.2.5.3Citometria de fluxo	39
4.2.6 Avaliação da liberação in vitro	39
4.2.7 Estudo in vitro de penetração cutânea	40
4.2.7.1 Determinação da quantidade de 5-FU retida na região folicular	42
4.2.7.2 Análise estatística	43
4.2.8 Estudo in vivo em modelo xenográfico de SCC com superexpressão	43
de EGFR	
4.2.8.1 Animais	43
4.2.8.2 Indução de SCC nos camundongos	43
4.2.8.3 Tratamento de SCC induzido em camundongos	43
4.2.8.4 Avaliação da regressão tumoral	45
4.2.8.5 Monitoramento da massa corpórea dos animais	46
4.2.8.6 Obtenção dos cortes histológicos	46
4.2.8.7 Avaliação histológica utilizando coloração com hematoxilina-eosina	46
(HE)	
4.2.8.8 Avaliação imunohistoquímica com anticorpo anti Ki-67	47
4.2.8.9 Avaliação estatística	48
,	
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Desenvolvimento e validação de métodos analítico e bioanalíticos	50
5.1.1 Quantificação do 5-FU em lipossomas por espectrofotometria	50
5.1.2 Quantificação do 5-FU em pele por cromatografia líquida de alta	51
eficiência (CLAE)	
5.1.2.1 Aplicação do método	57
5.2 Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo 5-FU	59
5.3 Desenvolvimento e caracterização de imunolipossomas	64
5.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	66
5 4 Avaliação <i>in vitro</i> em linhagem de carcinoma celular escamoso de pele	67

humana (A431) EGFR positiva	
5.4.1 Citotoxicidade	67
5.4.2 Microscopia confocal	70
5.4.3 Citometria de fluxo	74
5.5 Avaliação do <i>uptake</i> celular de lipossomas e imunolipossomas em	75
linhagem EGFR negativa (B16F10)	
5.5.1 Microscopia confocal	
5.5.2 Citometria de fluxo	77
5.6 Avaliação da liberação in vitro	78
5.7 Estudo in vitro de penetração cutânea	80
5.8 Estudo in vivo em modelo xenográfico de SCC	
5.8.1 Tratamento de SCC por via subcutânea	91
5.8.2 Tratamento de SCC por via tópica	96
6. CONCLUSÕES 1	102
7. REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é a forma mais comum de todos os tumores. Destes, o carcinoma celular escamoso (SCC) ocupa a segunda posição em frequência e é biologicamente mais agressivo do que o carcinoma basocelular visto que em cerca de 12% dos casos ocorre metástase, especialmente para os linfonodos (URIBE, GONZALEZ 2011; ALAM, RATNER, 2001). De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016) estima-se que o câncer da pele do tipo não melanoma é o mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% dos casos de tumores não malignos. Sendo assim, cerca de 175 mil novos casos são esperados para 2016.

A primeira escolha de tratamento do SCC é a cirurgia, seguida ou em associação à quimioterapia sistêmica. Considerando-se que o principal objetivo na cirurgia é a retirada completa do tumor e a manutenção da vida do paciente, nem sempre resultados adequados são alcançados do ponto de vista cosmético, visto que cicatrizes e áreas completas da face, por exemplo, podem ser perdidas. Outro aspecto a ser considerado é a necessidade de quimioterapia quando metástase é observada, principalmente no tratamento de pacientes idosos que possuem, muitas vezes, função renal e hepática prejudicadas (STRATIGOS et al., 2015). Sendo assim, sistemas de liberação capazes de direcionar a liberação dos fármacos e reduzir a exposição sistêmica são promissores

O tratamento de cânceres de pele pela via tópica é uma possibilidade, inclusive na clínica, na qual muitas vezes a terapia fotodinâmica com creme de ácido 5-aminolevulínico ou cremes convencionais de 5-FU são utilizados, principalmente para o tratamento de tumores cutâneos menos agressivos como o carcinoma basocelular. Estudos são necessários para uma maior utilização da via tópica para o tratamento de tumores mais agressivos como o SCC.

Neste trabalho, o objetivo principal é desenvolver um sistema de liberação capaz de veicular topicamente um quimioterápico convencional, o 5-fluorouracil (5-FU), que seja seletivo para as células de SCC, as quais possuem superexpressão do fator de crescimento epidermal (EGFR). Para tanto, o anticorpo monoclonal anti-EGFR, cetuximabe, será ligado covalentemente à superfície de lipossomas contendo 5-FU, gerando imunolipossomas. Devido à alta hidroficilidade e irritação cutânea do 5-FU, no entanto, ele não é capaz de penetrar, em concentrações adequadas, através do estrato córneo que compõe a superfície do SCC. Desta forma, ele carece de um carreador, como o lipossoma, para atravessar o estrato córneo e atingir as células tumorais. A ligação do cetuximabe ao sistema de liberação deve aumentar a captura

(uptake) dos lipossomas pelas células tumorais EGFR positivas, possibilitando uma maior concentração intratumoral do quimioterápico. Como o SCC cutâneo apresenta-se normalmente hiperqueratinizado, a associação de um método físico à dispersão de imunolipossoma para aumentar e direcionar a penetração cutânea do sistema de liberação para as células tumorais será também avaliado. A iontoforese é um método físico que se baseia no transporte de fármacos carregados ou não na/através da pele usando corrente elétrica de baixa intensidade, favorecendo a veiculação de fármacos encapsulados ou não principalmente através dos apêndices cutâneos. Desta forma, espera-se que este trabalho possa contribuir para a aplicação futura do tratamento tópico de SCC empregando sistemas de liberação e métodos físicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma de células escamosas

O SCC é um tumor maligno de origem epitelial, derivado principalmente de células escamosas. Como essas células representam a principal parte da epiderme, o SCC é a segunda forma mais frequente de tumores de pele não-melanoma, ficando atrás apenas do carcinoma basocelular. Este tipo de neoplasia responde por 20% das neoplasias malignas cutâneas (JOHNSON *et. al.*, 1992; SALEHI *et. al.*, 2007), e por 90% de todos os cânceres de cabeça e pescoço.

Sabe-se que a exposição à luz ultravioleta tem um papel importante como iniciador e promotor da carcinogênese, sendo que a incidência aumenta em pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles que apresentem concomitantemente a infecção do papiloma vírus. A radiação ultravioleta produz mutações no DNA que são usualmente reparadas pela formação de dímeros de timidina pelo gene supressor de tumor p53, cuja falha no mecanismo de reparo é capaz de resultar na formação de tumor. Outras doenças também geram predisposição ao desenvolvimento do SCC, tais como xeroderma pigmentoso, epidermólise bolhosa recessiva e disqueratose congênita (URIBE, GONZALEZ 2011).

Até o momento não se sabe o número exato de alterações genéticas ou epigenéticas necessárias para a malignização do SCC. Um dos modelos propõe que clones epidérmicos com p53 mutados sejam precursores da displasia escamosa, gerando SCC *in situ*, infiltração e culminando com a metástase. Assim como no melanoma, o SCC apresenta alterações na via de sinalização MAPK Erk, além de mutações em k-RAS (URIBE, GONZALEZ 2011). Ademais, o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) está associado ao prognóstico ruim e os tumores que o apresentam são mais agressivos (NUÑO-GONZÁLEZ *et. al.*, 2012).

O EGFR é um dos quatro membros da família ErbB-HER de receptores de fatores de crescimento transmembrana de tirosinas quinase. O reconhecimento dos ligantes extracelulares naturalmente presentes pelo domínio III do EGFR promove mudanças conformacionais que permitem a homodimerização com outro EGFR ou heterodimerização com outro membro da família HER. A formação dos dímeros e multímeros promove a autofosforilação da tirosina do domínio intracelular do EGFR, o que aumenta o acesso ao ATP e substrato e cria sítios de ligação para moléculas sinalizadoras, servindo como locais de ligação para a união de várias moléculas associadas a múltiplas vias de transdução mitogênicas, antiapoptóticas, angiogênicas

e pró-invasivas (RATUSHNY et. al., 2009; URIBE, GONZALEZ 2011). No câncer, a atividade de EGFR está aumentada como resultado da hiper-regulação, amplificação, mutação ou expressão aumentada de ligantes e cofatores, gerando o efeito maligno dos cânceres, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 1 (RATUSHNY et. al., 2009).

Recentemente foi demonstrada a superexpressão de EGFR em SCC cutâneo de cabeça e pescoço com metástases locais, comparado aos casos cutâneos não metastáticos. Ch'ng e colaboradores (CH'NG et. al., 2008) utilizaram imunohistoquímica e hibridização fluorescente in situ para avaliar a expressão de EGFR em 3 grupos de lesões: lesões primárias sem metástase (P), lesões primárias com metástase (PM) e doença metastática (M). Os resultados indicaram superexpressão do EGFR para 36% dos casos de P, 79% dos casos de PM e 47% dos casos de M, revelando a importância deste receptor no prognóstico e tratamento deste tipo de carcinoma.

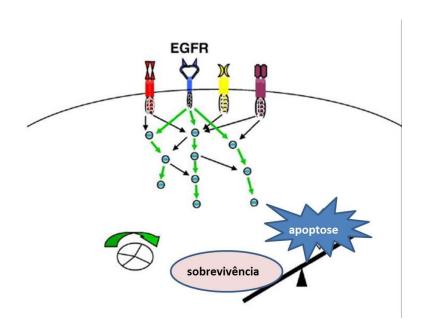


Figura 1. EGFR transmite sinais de sobrevivência e proliferação celular através de diferentes vias de sinalização (Adaptado de RATUSHNY et. al., 2009).

2.2 Tratamento

O tratamento convencional do SCC de pele é geralmente realizado através de cirurgias e/ou radioterapia, esta geralmente utilizada em casos onde a cirurgia não é possível ou em pacientes idosos. É necessário o acompanhamento do paciente a

cada 4 ou 6 meses, no entanto, há sempre a possibilidade do desenvolvimento regional ou distante de metástases (MAUBEC et. al., 2005; NUÑO-GONZÁLEZ et. al., 2012). O uso de cirurgia, eletrodissecação, curetagem ou criocirurgia são preferenciais para SCC de baixo risco. Para os casos mais avançados, é indicado o uso de quimioterápicos sistêmicos, como 5-fluorouracil (5-FU), cisplatina, bleomicina e doxorrubicina, imunoterápicos, como interferon, e agentes para alvos moleculares, como cetuximabe, gefitinibe e erlotinibe (CRANMER et. al., 2010).

O cetuximabe (Figura 2) é indicado pelo FDA como primeira linha para o tratamento de SCC recorrente ou metastático de cabeça e pescoço. Ele é um anticorpo IgG1 recombinante quimérico que inibe competitivamente o fator EGFR através de ligação altamente específica, bloqueando a fosforilação induzida por outros ligantes (CUNNINGHAM 2004; BONNER *et. al.*, 2006; BAUMAN *et. al.*, 2007). Sua aplicação pode ser observada em diversos relatos na literatura (BAUMAN *et. al.*, 2007; SUE *et. al.*, 2007; GIACCHERO *et. al.*, 2011) e em pelo menos 74 ensaios clínicos em andamento (Clinical Trials, 2016). Contudo a administração intravenosa é a utilizada na clínica e nos estudos citados, o que implica na administração de altas concentrações relativas e em efeitos colaterais gerais.

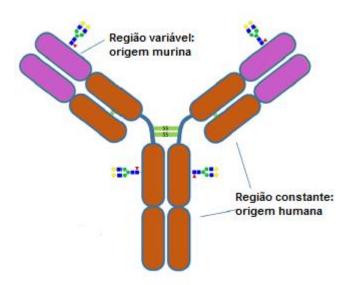


Figura 2. Ilustração esquemática da estrutura do anticorpo quimérico cetuximabe, mostrando a região variável e a constante (Adaptado de https://www.neb.com, acesso em novembro/2016).

Comparado aos quimioterápicos convencionais, o cetuximabe é bem tolerado. A maioria dos efeitos adversos por ele causados são reações cutâneas, incluindo erupções acneiformes (em 50 a 100% dos pacientes), xerose, paroníquia, alterações nos cabelos, telangectasias (quando vasos capilares ficam visíveis abaixo da pele) e hiperpigmentação (KALAPURAKAL *et. al.,* 2012). Acredita-se que os efeitos adversos na pele estejam relacionados ao papel fisiológico do EGFR na epiderme. Salienta-se, no entanto, que o cetuximabe, como outros quimioterápicos/imunoterápicos, são administrados por via endovenosa. Os efeitos colaterais gerados são, portanto, generalizados, não se restringindo ao local onde o tumor se encontra. A combinação de cetuximabe e 5-FU, cisplatina ou carboplatina demonstrou relação custo-benefício aceitável devido ao aumento do tempo de sobrevida e ausência de toxicidade adicional (VERMOKEN et al., 2008; MESÍA et al., 2010; COHEN et al., 2013).

O tratamento do SCC em estágio avançado é normalmente realizado com o cetuximabe em combinação com quimioterápicos convencionais, como com o 5-FU, a cisplatina ou a carboplatina. Essas associações demonstraram relação custobenefício aceitável devido ao aumento do tempo de sobrevida do paciente e ausência de toxicidade adicional (VERMOKEN et al., 2008; MESÍA et al., 2010; COHEN et al., 2013).

O 5-FU (Figura 3) é um antineoplásico análogo da pirimidina, capaz de interferir tanto na síntese do DNA como do RNA, pois bloqueia a metilação do ácido deoxiuridílico em ácido timidílico. O 5-FU foi desenvolvido em 1957 e tem sido usado para o tratamento de diversos tipos de cânceres, tais como mama, intestino, próstata, gastrointestinal, vaginal, cervical e pele. Geralmente é utilizado pela via intravenosa, mas alguns estudos têm demonstrado sua eficácia para o tratamento intralesional (GROVES et al., 2017; METTERLE et al., 2015). Está disponível também comercialmente na forma de cremes para a aplicação tópica, tais como Efurix® 5% (Valeant Pharmaceuticals, Int., Costa Mesa, CA), Fluoroplex® 1% (Allergan, Inc., Irvine, CA) e Carac® 0,5% (Dermik Laboratories, Berwyn, PA). É indicado para o tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular (MCGILLIS et al., 2004), mas também tem demonstrado sucesso para o tratamento do SCC (MORSE et al., 2003; PETRILLI et al., 2016).

Figura 3. Estrutura do 5-fluorouracil.

Diversos trabalhos demonstraram que o uso combinado de 5-FU e cetuximabe é vantajoso para o tratamento do SCC, associado ou não a outros fármacos, tais como docetaxel, cisplatina, carboplatina e bleomicina, seguido ou não de radioterapia (BUIRET et al., 2010; COHEN et al., 2013; KEIL et al., 2013; CRANMER et al., 2010). Em 2011, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de cetuximabe em combinação com cisplatina ou carboplatina e 5-FU como primeira linha de tratamento em pacientes com SCC recorrente locoregional ou mestatástico de cabeça e pescoço. A aprovação foi baseada em um estudo randomizado com 442 pacientes, que utilizou a administração de cisplatina (100 mg/m², intravenoso), carboplatina (área sob a curva 5, intravenoso) no primeiro dia de tratamento e 5-FU (1000 mg/m²/dia, infusão intravenosa contínua do 1º ao 4º dia de tratamento). O cetuximabe foi administrado na dose de 400 mg/m² inicialmente, seguido da dose de 250 mg/m²/semana. Neste estudo, foi verificado melhora na sobrevivência dos pacientes tratados com cetuximabe, com tempo de sobrevida média de 10,1 a 7,4 meses. O tempo de sobrevida sem recorrência da doença também foi melhorado para o grupo tratado com cetuximabe (COHEN et al., 2013). Neste estudo foi feito o uso intravenoso dos fármacos livres, sem o uso de sistemas de liberação, resultando em efeitos adversos tais como náusea, vômitos, neutropenia, exantema, diarreia, conjuntivite, além de reações adversas a infusão, tais como hipomagnesemia, hipocalcemia e hipocalemia.

2.3 Vias de administração

O transporte de fármacos e o direcionamento destes para tumores sólidos é um assunto de interesse na tecnologia farmacêutica. A veiculação inadequada de um fármaco pode resultar em crescimento tumoral devido a células residuais e a possibilidade de desenvolvimento de células resistentes ao tratamento (SHENOY et al., 2005; FASEHEE et al., 2016).

A rota de administração também é muito importante quando sistemas de liberação de fármacos são utilizados (FASEHEE et al., 2016). Em um estudo realizado por Wiklander e colaboradores (WIKILANDER et al., 2015), por exemplo, vesículas extracelulares foram avaliadas quanto à sua biodistribuição após serem injetadas em camundongos pela via intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. Os autores observaram diferentes perfis de distribuição, sendo que as vias intraperitoneal e subcutânea resultaram em menor acúmulo no fígado e rins, mas maior acúmulo no pâncreas e trato gastrointestinal.

A administração subcutânea de biomacromoléculas é mais segura e conveniente que a administração intravenosa (STONER et al., 2014; LIU et al., 2016). Por outro lado, espera-se uma redução na biodisponibilidade, principalmente quando se tem a administração de macromoléculas, visto que o fármaco precisa atravessar a complexa barreira tridimensional de matriz extracelular da derme, capilares e vasos linfáticos para atingir tumores de pele ou para alcançar os capilares e vasos linfáticos para atingir a circulação sistêmica (LIU et al., 2016).

A administração tópica, localizada, para o tratamento de SCC, principalmente os de pele, é uma alternativa promissora para diminuir efeitos adversos causados pela quimioterapia sistêmica. No entanto, os SCCs localizam-se nas camadas profundas da pele. Para um tratamento tópico efetivo é necessário que o quimioterápico chegue até essas camadas em altas concentrações, o que representa uma tarefa bastante complexa. Isto porque a função primordial da pele é a proteção contra agentes físicos, químicos, imunológicos, patógenos, radiação UV, dentre outros. A pele representa, portanto, uma barreira e também, em certos casos, uma oportunidade para a passagem de fármacos devido a sua extensa superfície (MENON, 2002).

O estrato córneo é camada mais externa da epiderme e o principal responsável pela função barreira da pele, sendo composto de corneócitos, que são queratinócitos completamente diferenciados, e pelos conteúdos secretados pelos corpos lamelares (Figura 4). O arranjo espacial desta camada ocasiona a formação de um caminho tortuoso, pelo qual as substâncias necessitam atravessar para chegar as camadas viáveis da pele, o que limita a permeabilidade cutânea (MENON, 2002; HARDING, 2004).

O estrato córneo mantém o conteúdo de água no organismo mesmo em condições climáticas variáveis, bem como limita a absorção de substâncias tóxicas do ambiente o que, consequentemente, dificulta a entrada de fármacos na pele. Esses

precisam, portanto, ter características físico-químicas adequadas para difundir através do estrato córneo e chegar, em concentrações terapêuticas, nas camadas da pele onde os tumores se encontram. Como o estrato córneo é uma barreira complexa, heterogênea, formada por regiões hidro e lipofílicas, para atravessá-lo o fármaco precisa ter, além de outras características, coeficiente de partilha óleo/água adequado (logKo/a de aproximadamente 2) e massa molecular baixa (GRATIERI *et al.*, 2012a).

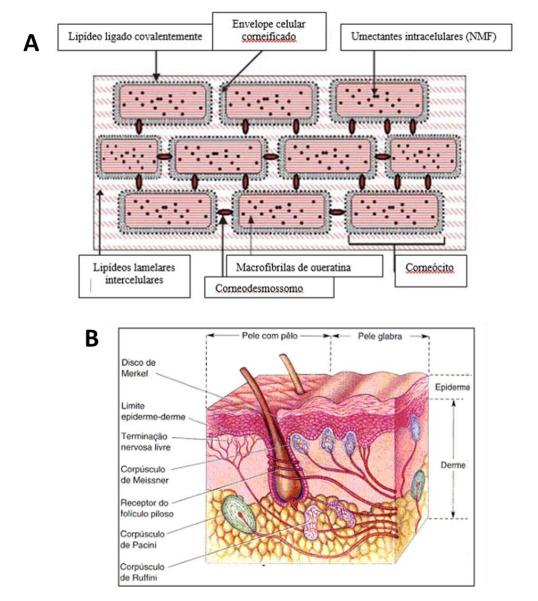


Figura 4: Pele e suas camadas. A) Representação esquemática dos componentes do estrato córneo (Adaptado de HARDING, 2004) e B) camadas da pele (Adaptado de BEAR et al.,2002)

O cetuximabe (fórmula molecular C₆₄₈₄H₁₀₀₄₂N₁₇₃₂O₂₀₂₃S₃₆), se administrado topicamente, deve difundir através do estrato córneo, onde não existe EGFR com os

quais o cetuximabe possa interagir, e alcançar as células tumorais (GUSTERSON & HUNTER, 2009). No entanto, além do mesmo ser uma macromolécula (MM = 145781,6 g/mol), é hidrossolúvel e pode sofrer degradação ou mudanças conformacionais quando em contato com o estrato córneo ou tecidos subcutâneos. Para a sua administração efetiva, sistemas de liberação, como os lipossomas/imunolipossomas, são necessários para mascarar suas características físico-químicas e proteger o fármaco contra a degradação, assim como métodos físicos, como a iontoforese e o ultrassom, são necessários para "forçar" a penetração do fármaco em altas concentrações e para o interstício tumoral.

O uso tópico de 5-FU para o tratamento de queratose actínica, por exemplo, vêm sendo realizado desde 1970, quando este foi aprovado para uso dermatológico pelo FDA. Porém, reações como dermatite erosiva, dor, prurido, hipopigmentação e hiperpigmentação, principalmente quando usa-se oclusão e resultam em baixa adesão ao tratamento (LOYAL et al., 2016; WESCHLER et al., 2008). Outro aspecto a ser considerado é a elevada hidrofilicidade da molécula, que limita sua penetração através do estrato córneo lipofílico. Sendo assim, sistemas de liberação vêm sendo estudados como alternativas promissoras para a veiculação de 5-FU (CHINEMBIRI et al., 2015).

2.4 Sistemas de liberação

A administração tópica de quimioterápicos ainda é pouco explorada, mas vem mostrando sua potencialidade principalmente para o tratamento de tumores cutâneos associados à terapia fotodinâmica (LOPEZ et. al., 2004; OH et. al., 2011; ROCHA et. al., 2012; BOLFARINI et. al., 2012; LEMOS et al., 2016), antimicrobianos (GAO et al., 2014; PEREZ et al., 2016; JORAHOLMEN et al., 2015) e antitumorais (COSCO et al., 2015; HUBER et al., 2015; PETRILLI et al., 2016). Três estratégias podem ser empregadas para facilitar a penetração de quimioterápicos na pele: a primeira delas é o desenvolvimento de novas moléculas, mais específicas e seguras, sendo este o caminho mais lento e caro (LI & WALLACE, 2008). A segunda estratégia envolve o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores, uma alternativa que vem sendo explorada devido ao menor custo e tempo requeridos (KARATHANASIS, 2008). E a terceira estratégia envolve a aplicação de métodos físicos, como a iontoforese e o ultrassom para forçar a penetração de altas concentrações de quimioterápicos no

tumor (GRATIERI *et al.*, 2008, TAVEIRA *et al.*, 2009; OGURA; PALIWAL; MITRAGOTRI, 2008).

Neste contexto, os nanocarreadores são sistemas nanométricos coloidais capazes de encapsular ou de se ligar a moléculas quimioterápicas, sejam elas moléculas pequenas, como o 5-FU, ou macromoléculas, como o cetuximabe. Nanocarreadores, tais como nanopartículas poliméricas e lipossomas, são capazes de proteger fármacos contra degradação, sustentar sua liberação, aumentar a adesão do paciente ao tratamento por reduzir a frequência de administração e os efeitos adversos. Estes, por sua vez, são reduzidos devido a acumulação melhorada dos quimioterápicos nas células tumorais, evitando os tecidos normais. Desta forma, altas concentrações do fármaco carreado pelo sistema de liberação são atingidas nos tumores, com reduzida toxicidade sistêmica se comparados à administração de fármacos livres (não encapsulados nos nanocarreadores) (PEREZ-HERRERO & FERNANDEZ-MENARDES, 2015).

O acúmulo preferencial de nanocarreadores no tecido tumoral se deve a um dos fenômenos mais descritos do microambiente tumoral, o "efeito permeabilidade e retenção aumentada" (EPR) (Figura 5). O EPR descreve o transporte facilitado de macromoléculas pelo interstício tumoral devido a vasculatura frouxa e mais permeável dos tumores (IVEY et al., 2016; ELOY et al., 2014). Sendo assim, macromoléculas maiores que 40 kDa são capazes de extravasar seletivamente dos vasos sanguíneos tumorais e se acumular nos tecidos tumorais, efeito este que não ocorre nos tecidos normais (MATSUMURA & MAEDA, 1986; MAEDA, 2001).

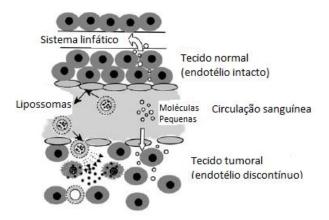


Figura 5: Esquema ilustrativo da acumulação de lipossomas e de moléculas pequenas em tecidos normal e tumoral (efeito EPR) (Adaptado de MILLA et al, 2012).

Lipossomas são nanocarreadores atóxicos, biodegradáveis e passíveis de preparação em larga escala. Com a forma de vesículas, são compostos por uma ou mais bicamadas lipídicas arranjadas concentricamente a um compartimento aquoso (Figura 6). Nesses sistemas de liberação, os fármacos podem ser encapsulados no compartimento aquoso ou intercalados na bicamada lipídica, permitindo assim a incorporação de moléculas hidrofílicas e lipofílicas (EGBARIA, WEINER 1990).

Um exemplo clássico da melhora do tratamento de tumores com lipossomas está na administração endovenosa de lipossomas de doxorrubicina (DOX). Os lipossomas de DOX foram os primeiros sistemas de liberação nanoparticulados aprovados pelo FDA. O Doxil® é o medicamento referência e está no mercado desde 1995 (BARENHOLZ, 2012).

Além de serem sistemas de liberação de uso consagrado na literatura e no mercado, lipossomas são sistemas interessantes para veiculação de fármacos hidrofílicos como o 5-FU. Apesar de fármacos hidrofílicos serem facilmente dissolvidos na fase aquosa durante o preparo dos lipossomas, são necessárias diversas estratégias, dentre elas o uso de lipídeos adequados e métodos de preparo otimizados com o intuito de melhorar a encapsulação destes fármacos, bem como evitar o extravasamento durante a estocagem (ELOY et al., 2014).

A superfície dos lipossomas pode ser facilmente modificada para aumentar seu tempo de circulação sistêmica ou para direcioná-los para células específicas. Por exemplo, a incorporação de polietilenoglicol (PEG) à bicamada lipídica, estratégia conhecida como peguilação, dificulta o reconhecimento das vesículas pelo sistema mononuclear fagocitário, aumentando o tempo de circulação do sistema de liberação (GABIZON et al., 1994; VIJAYAKUMAR et al., 2016). A peguilação evita ainda a agregação das vesículas, protege os lipossomas da degradação por proteínas plasmáticas e evita a liberação prematura do fármaco. Além disso, é capaz de reduzir a adsorção de opsoninas. Sendo assim, lipossomas com maior tempo de circulação podem se acumular mais facilmente na área do tumor pelo efeito EPR (MILLA et al., 2012).

A superfície dos lipossomas também pode ser funcionalizada com anticorpos, polissacarídeos, transferrina, folato, peptídeos de transdução de membrana, dentre outros (PETRILLI et al., 2014). A conjugação à superfície de lipossomas com anticorpos monoclonais dá origem aos imunolipossomas. Os imunolipossomas tem, portanto, afinidade por um antígeno/receptor específico. Se este estiver altamente

expresso no alvo terapêutico, o fármaco carreado pelo imunolipossoma pode ser liberado neste local específico em altas concentrações. A liberação direcionada do fármaco minimiza a toxicidade em tecidos com baixa expressão do antígeno/receptor, gerando menores efeitos colaterais e permitindo a administração do medicamento em menores doses (Figura 6) (PARK et. al., 2001).

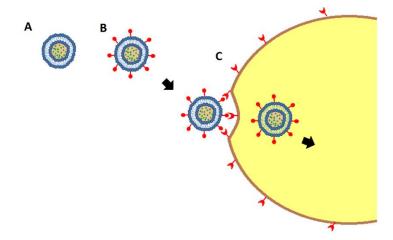


Figura 6. Lipossomas. A) Lipossoma convencional. B) Lipossoma funcionalizado com anticorpo – imunolipossoma. C) Representação do *uptake* de imunolipossomas por células que contém receptores para o anticorpo (Adaptado de ELOY et al., 2014).

No preparo de imunolipossomas (Figura 7), os anticorpos podem ser ligados à superfície destes covalentemente ou não covalentemente. A ligação não covalente é geralmente realizada com o uso de anticorpos biotinilados, ligados a lipossomas derivatizados com avidina. A ligação covalente utiliza técnicas de bioconjugação, tais como formação de ligações tioéster, dissulfídica ou amida entre os lipídeos e os anticorpos a serem ligados. Neste caso, os anticorpos podem ser ligados diretamente a grupos presentes na superfície dos lipossomas ou ligados pós-insercionalmente via micelas de um anticorpo ligado a um lipídeo (PAN et. al., 2007).

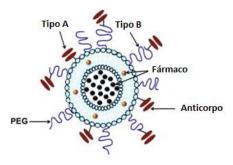


Figura 7. Representação esquemática de imunolipossomas. A figura mostra diferentes modos de conjugação do anticorpo ao lipossoma: no Tipo A o anticorpo é

diretamente conjugado ao lipossoma, enquanto que no Tipo B o anticorpo é conjugado ao lipossoma usando um espaçador flexível (Adaptado de IYER et al., 2011).

Imunolipossomas estericamente estabilizados podem ser obtidos pelo acoplamento de anticorpos às terminações distais de cadeias de PEG. Estas cadeias de PEG podem ser utilizadas como ligantes entre os lipossomas e os anticorpos, visando melhorar a ligação antígeno-anticorpo. Koning et al (2002) demonstraram que a ligação de anticorpos à extremidade terminal da cadeia de PEG é capaz de aumentar a associação entre os imunolipossomas e as células que possuem o receptor, mesmo quando baixas concentrações do anticorpo são utilizadas. Este reconhecimento melhorado se deve a correta orientação para a interação com o antígeno na superfície celular, combinada a reduzida interferência estérica das cadeias de PEG para esta interação.

Diversos métodos de acoplamento covalente foram desenvolvidos para a ligação de anticorpos derivatizados às extremidades PEG usando lipídeos peguilados funcionalizados com um grupamento terminal quimicamente reativo, tais como hidrazina, N-3-(piridilditio) proprionato, maleimida, succinil, p-nitrofenilcarbonil, entre outros. Uma das técnicas mais comuns de derivatização utiliza o reagente de Traut, capaz de produzir grupamentos tiol no anticorpo, permitindo a subsequente reação com o grupamento maleimida de lipídeos modificados através de ligação covalente (SCHNYDER et al., 2004; BARRAJÓN-CATALÁN et al., 2011).

O uso de imunolipossomas de cetuximabe é promissor visto que o EGFR está presente em uma variedade de tumores sólidos, incluindo o SCC. Imunolipossomas contendo DOX específicos para ligação ao EGFR demonstraram atividade clínica em um estudo de fase 1 de escalonamento de dose (MAMOT et al., 2005; WICKI et al., 2015) e estes progrediram para fase 2 (LIMASALE et al., 2015).

A aplicação tópica de lipossomas, sejam eles funcionalizados ou não, pode aumentar a deposição de fármacos na pele no sítio de ação, reduzindo a absorção sistêmica e os efeitos adversos, além de carrear fármacos diretamente pelos apêndices da pele (MAGHRABY *et. al.*, 2008). Diversos peptídeos e proteínas já tiveram sua penetração cutânea beneficiada pelos lipossomas (SHEW *et. al.*, 1985; MEYENBURG *et. al.*, 2000).

Sistemas de liberação na forma de nanobastões de ouro conjugados ao cetuximabe já foram descritos como facilitadores do diagnóstico de SCC por aplicação

tópica (PUVANAKRISHNAN et. al., 2012). Este estudo foi realizado, no entanto, aplicando os nanobastões diretamente no tumor, ex vivo, sem a barreira conferida pelo estrato córneo. Sistemas mais conhecidos e não-rígidos, como os lipossomas, podem facilitar a penetração do cetuximabe através do estrato córneo, permitindo que ele chegue até o tumor em quantidades superiores aquelas conseguidas a partir da administração em nanobastões rígidos de ouro. Além disso, a presença do cetuximabe na superfície dos lipossomas, como no caso dos imunolipossomas, pode aumentar o *uptake* do lipossoma pelas células tumorais, aumentando a concentração nas células tumorais tanto do cetuximabe, como de quimioterápicos encapsulados no sistema de liberação.

2.5 Métodos físicos de promoção da penetração cutânea de fármacos

O emprego de métodos físicos é uma estratégia promissora para aumentar o transporte de macromoléculas através do estrato córneo e, consequentemente, permitir que maiores quantidades das mesmas cheguem às células tumorais (GRATIERI *et al.*, 2008, TAVEIRA et al., 2009). Dentre os métodos mais estudados para este fim está a iontoforese.

A iontoforese é a aplicação de uma corrente elétrica fraca, de no máximo 0,5 mA/cm². Ela aumenta tanto a penetração cutânea de fármacos ionizados, por eletromigração, como de fármacos neutros, por eletrosmose (GELFUSO *et al.*, 2011).

Na iontoforese uma corrente elétrica é aplicada na pele por meio de uma solução/formulação eletrolítica e de dois eletrodos, um positivo, o ânodo, e outro negativo, o cátodo (Figura 8). A formulação que contém o fármaco, de preferência ionizado, é colocada em contato com um dos eletrodos de forma que forças eletromigratórias direcionem à molécula para a pele. Desta forma, de maneira simplificada, moléculas catiônicas, ou seja, positivamente carregadas, sofrem repulsão pelo eletrodo positivo ou ânodo e penetram a pele, enquanto fármacos negativamente carregados ou ânions sofrem repulsão pelo cátodo. Devido à eletromigração, a taxa de penetração cutânea de substâncias ionizadas aumenta substancialmente quando comparada com a penetração passiva (na ausência de corrente elétrica) (TESSELAR, SJÖBERG, 2011).

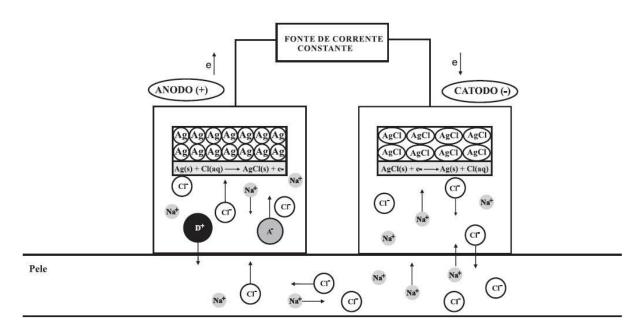


Figura 8. Figura esquemática de um aparato para iontoforese com sistema de eletrodos Ag/AgCl. O ânodo possui um fármaco ionizável D⁺ e seu contra íon A⁻ (GRATIERI et al., 2008). Para facilitar a passagem da corrente elétrica e as reações eletroquímicas, o sal Na⁺Cl⁻ está presente nos dois compartimentos.

Eletrosmose é o termo utilizado para descrever o fluxo de um volume de solvente e movimentação de cargas quando uma corrente elétrica é aplicada sobre a pele. Tal corrente causa a movimentação de íons Na⁺ preferencialmente em relação aos íons Cl⁻. Isso se deve ao ponto isoelétrico da pele (aproximadamente 4-4,5), que faz com que esta, em contato com uma solução em pH fisiológico, esteja negativamente carregada, favorecendo o transporte de cátions. Desta forma, é favorecido o transporte de íons no sentido do ânodo para o cátodo visando neutralizar as cargas negativas na pele e, com isso, ocorre o transporte de solvente e das moléculas neutras presentes no sistema. Sendo assim, moléculas com carga neutra em pH fisiológico são beneficiadas pela eletrosmose quando colocadas em contato com o ânodo e os cátions se beneficiam de uma força adicional de transporte à eletromigração (GUY et al., 2000; GRATIERI et al., 2008). Desta forma, o fluxo iontoforético total é a soma das contribuições da eletromigração e eletrosmose, como indicado na Equação I.

$$J total = \frac{z_p u_p c_p I}{\mathcal{F}.\sum z_1 u_1 c_1} + v.cp \quad \text{Equação I}.$$

Sendo $\mathcal{Z}_p\mathcal{U}_pc_p$ a carga do permeante, a mobilidade e a concentração, respectivamente, I a intensidade da corrente elétrica aplicada, \mathcal{F} a constante de Faraday e v a velocidade do solvente eletrosmótico.

Diversos fatores são conhecidos por influenciar a iontoforese. Estes incluem as propriedades físico-químicas da molécula (tamanho, carga, concentração), a formulação escolhida (veículo, tampão, pH, viscosidade, presença de outros íons), o equipamento utilizado (faixa de corrente elétrica disponível, corrente contínua ou pulsada, tipo de eletrodo), variações biológicas (sítio de aplicação, fluxo sanguíneo no local, idade, sexo), temperatura da pele e duração da iontoforese (RAWAT et al., 2008).

A influência da iontoforese na penetração de sistemas nanoparticulados começou a ser explorada apenas recentemente. A maioria dos trabalhos sugere o aumento da retenção dos fármacos encapsulados na pele, com menor permeação através dela (VUTLA et al., 1996; FANG et al., 1999; TAVEIRA et al., 2009; KAJINOMOTO et al., 2011). No primeiro trabalho publicado com a associação de iontoforese e lipossomas, os autores investigaram o transporte iontoforético da [Leu5]encefalina em pele de cadáver e observaram a penetração cutânea do fármaco e dos constituintes do lipossoma, com menor degradação do fármaco encapsulado (VUTLA et al., 1996). Além disso, foi demonstrado que o aumento da cadeia carbônica do fosfolipídeo usado para preparar o lipossoma reduz a permeação cutânea do fármaco nele encapsulado, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa para cadeias carbônicas de 14, 16 ou 18 com relação a quantidade acumulada de fármaco nas camadas da pele (FANG et al., 1999). A associação da iontoforese com nanopartículas também já foi avaliada visando o tratamento de tumores cutâneos. A aplicação da iontoforese em nanopartículas lipídicas contendo DOX aumentou a penetração cutânea da DOX (TAVEIRA et al., 2009), o que resultou na regressão do crescimento tumoral do SCC (HUBER et al., 2015).

Sendo assim, a iontoforese parece forçar a entrada de componentes das nanopartículas para dentro da pele, mantendo o fármaco neste local, diminuindo sua difusão para a circulação sistêmica, o que é promissor para um tratamento local de doenças como o câncer de pele.

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver lipossomas convencionais e imunolipossomas com cetuximabe, ambos contendo 5-FU, para o tratamento tópico de SCC de pele, bem como avaliar a influência do uso tópico da iontoforese na promoção da penetração cutânea *in vitro* e regressão tumoral *in vivo* em modelo xenográfico de SCC de pele comparado à administração subcutânea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Desenvolver e validar um método analítico para quantificação de 5-FU em lipossomas e imunolipossomas;
- Desenvolver e validar um método bioanalítico para quantificação de 5-FU em pele;
- Preparar e caracterizar lipossomas contendo 5-FU usando medidas de tamanho de partícula e potencial zeta, porcentagem de encapsulação de 5-FU, estabilidade e avaliação morfológica das vesículas;
- Conjugar cetuximabe aos lipossomas para obter imunolipossomas e caracterizá-los quanto a eficiência de conjugação do cetuximabe e integridade da estrutura primária do anticorpo;
- Preparar e caracterizar imunolipossomas contendo 5-FU usando medidas de tamanho de partícula e potencial zeta, porcentagem de encapsulação de 5-FU, estabilidade, eficiência de conjugação do cetuximabe, integridade da estrutura primária do anticorpo e avaliação morfológica das vesículas
- Avaliar a citotoxicidade, IC50 e sinergismo entre 5-FU e cetuximabe, em solução ou nos lipossomas, em linhagem de SCC humano A431;
- Avaliar o uptake celular de lipossomas e imunolipossomas em linhagem EGFR positiva (A431) e em linhagem EGFR negativa (B16F10) usando microscopia confocal e citometria de fluxo;
- Estudar a liberação in vitro de 5-FU dos lipossomas e dos imunolipossomas;

- Avaliar, in vitro, a penetração cutânea passiva e iontoforética do 5-FU a partir de soluções, lipossomas e imunolipossomas;
- Avaliar, in vitro, a acumulação 5-FU no folículo piloso a partir da iontoforese de soluções, lipossomas e imunolipossomas;
- Avaliar a regressão tumoral do SCC induzido em camundongos Swiss nude após administração subcutânea e iontoforética tópica de soluções, lipossomas e imunolipossomas contendo 5-FU;
- Avaliar a perda de peso e a sobrevivência de camundongos Swiss nude após administração subcutânea e tópica por iontoforese de soluções, lipossomas e imunolipossomas contendo 5-FU;
- Avaliação histológica e imunohistoquímica dos tumores extraídos dos camundongos Swiss nude após o tratamento subcutâneo e tópico com iontoforese de soluções, lipossomas e imunolipossomas contendo 5-FU.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Substâncias químicas

- 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), Avanti Polar Lipids;
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), Avanti Polar Lipids;
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [amino(polietilenenoglycol)-2000] (sal de amônio) (DSPE-PEG-NH₂), LaySan Bio;
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-maleimida(polietilenoglicol) 2000] (sal de amônio) (DSPE-PEG-Mal), LaySan Bio;
- 2-mercaptoetanol, Biorad;
- 3,3'-Dioctadeciloxacarbocianina perclorato (Dio), Sigma Aldrich;
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT), Sigma Aldrich;
- 5-FU, Sigma Aldrich;
- Acetato de etila, Synth;
- Anticorpo Rb Anti-Ki-67 (SP6) Mab, Spring;
- Cloreto de prata, Sigma Aldrich;
- Colesterol (Col), Sigma Aldrich;
- Colunas PD-10 descartáveis, GE Healthcare;
- Erbitux 5 mg/mL (Cetuximabe) contendo os seguintes adjuvantes: cloreto de sódio, glicina, polissorbato 80, ácido cítrico monoidratado, hidróxido de sódio 1M e água para injeção, Merck Serono;
- Gel Tris-HCl pronto para uso SDS-Page 4-20% mini-PROTEAN, Biorad;
- lodeto de propídeo, Sigma Aldrich;
- Kit para imunohistoquímica REVEAL Biotin Free Polyvalent DAB -Spring;
- L-α-fosfatidilcolina de soja (SPC), Avanti Polar Lipids;
- Meio de cultura DMEM, Gibco;
- Paraformaldeído, Sigma Aldrich;
- Polietilenimina (PEI);
- Precision Plus ProteinTM (padrão com duas cores), Biorad;
- Prolong® Diamond com DAPI, Life Technologies;
- Reagente de Traut, Sigma Aldrich;
- Sepharose CL-4B, GE Healthcare;

- Solução de antibiótico/antimicótico contendo 10,000 unidades/mL de penicillina, 10,000 μg/mL de estreptomicina e 25 μg/mL de anfotericina B, Gibco;
- Soro bovino fetal, Gibco;
- Tampão de amostra Laemmli 4X, Biorad;
- Tampão Tris/ Glicina/ SDS 10X, Biorad;
- Tubos de ultracentrifugação 50 kDa, Amicon;
- Tripsina 2,5X, Sigma.

4.1.2 Linhagens celulares

- Linhagem celular de SCC humano A431-CRL 1555™, ATCC.
- Linhagem celular de melanoma murinho B16F10 -CRL 6475™, ATCC.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos

4.2.1.1 Quantificação do 5-FU em lipossomas por espectrofotometria

Um método espectrofotométrico para quantificação de 5-FU em lipossomas foi desenvolvido e validado. Soluções estoque de concentração 1,3 mg/mL em água foram preparadas e diluições seriadas foram realizadas obtendo-se soluções de 5-FU em água na faixa de concentração de 0,25 a 6 µg/mL. A absorvância das soluções foi monitorada em 265 nm utilizando-se água milli-Q como branco em espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800, Shimadzu). Para a validação do método foram avaliados a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), seguindo os parâmetros preconizados pelo ICH Q2(R1) e ANVISA (Resolução n°899, de 29 de maio de 2003- "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos").

A) Especificidade

A especificidade foi avaliada analisando as soluções contendo todos os componentes dos lipossomas, exceto o fármaco (placebo). Sendo assim, lipossomas branco foram preparados pelo método da hidratação do filme lipídico compostos por

DSPC:Col (55:45). Ao volume de 25 µL de lipossomas foram adicionados 25 µL de DMSO, que foram submetidos à agitação em vórtex por 2 minutos e banho ultrassônico por 10 min. Em seguida, as amostras foram diluídas em 950 µL de água e filtradas usando filtro com porosidade 0,22 µM previamente à quantificação. As respostas foram avaliadas pela presença de interferentes e sobreposições com a absorção de 5-FU em 265 nm.

B) Linearidade

Para a avaliação da linearidade, três séries de soluções padrões de 5-FU (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 μg/mL) foram preparadas por diluição da solução estoque em água milli-Q. A absorvância foi monitorada em triplicata em 265 nm.

C) Precisão e Exatidão

A precisão intra-ensaio e a exatidão foram determinadas pela análise de replicatas de diferentes concentrações, preparadas e analisadas no mesmo dia. A precisão intra-ensaio (repetibilidade) e a exatidão (E) intra-ensaio foram avaliadas pela medida da absorvância de 3 diferentes concentrações (0,5; 2; 6 μg/mL), n=6, avaliadas no mesmo dia sob as mesmas condições experimentais. Os resultados de precisão foram calculados usando o coeficiente de variação (CV) obtido pela razão entre o desvio padrão e a média (Equação II). A E foi obtida levando-se em consideração a diferença entre a concentração obtida experimentalmente (Cmedida) e a concentração teórica (Cesperada) (Equação III). A precisão inter-ensaio (precisão intermediária) e a E inter-ensaio foram calculadas usando os resultados de absorvância de 5 concentrações em 3 dias consecutivos (n=6 para cada concentração por dia de análise).

$$CV$$
 (%) = $\frac{\text{Desvio padrão}}{M\acute{e}dia}x$ 100 (Equação II)

$$E = \frac{\text{Cmedida} - \text{C esperada}}{\text{Cesperada}} x \ 100 \ \text{(Equação III)}$$

Os resultados foram avaliados de acordo às diretrizes da ANVISA (Resolução - RE n° 899, de 29 de maio de 2003 – "Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos") e *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, guia para a validação de métodos analíticos Q2(R1).

D) Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) foi determinado com o auxílio da Equação IV:

$$LOD = DPa \times \frac{3}{S}$$
 (Equação IV),

Na qual DPa representa o desvio padrão do intercepto com o eixo y de, 3 curvas de calibração construídas contendo diferentes concentrações do fármaco (faixa de 0,25 a 6µg/mL). S é a inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação (LOQ) foi considerado a menor concentração obtida com precisão e exatidão adequadas de acordo às diretrizes da ANVISA (Resolução - RE n° 899, de 29 de maio de 2003 – "Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos") e *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, guia para a validação de métodos analíticos Q2(R1), visto que o guia da ANVISA determina valores de até 5% e o ICH não estabelece limites, mas sabe-se que de acordo à complexidade da amostra e concentração, valores de até 20% são aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

4.2.1.2 Quantificação do 5-FU em pele por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo a líquido modelo UFLC Prominience (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado de uma bomba binária (LC-20AT Prominience), degaseificador (DGU-20A₃ Prominience), auto-amostrador (SIL-20A Prominience) e detector UV-vis (SPD-20A Prominience). As separações cromatográficas foram conduzidas em coluna de fase reversa Lichrospher RP-C18 (250 mmX 4,6mm, 5µm, 100 Å), inserida em um compartimento com temperatura regulada por termostato (CTO-20A). A aquisição e análise dos dados foram feitas empregando um módulo controlador (CBM-20A) acoplado a um computador com o software Shimadzu LC solution. Foram testadas as seguintes condições analíticas, tais como: acetonitrila e solução aquosa de ácido perclórico 0,1% (2:98, v/v, pH 2,6);

metanol e solução aquosa de ácido perclórico 0,1%(2:98, v/v, pH 2,6) e solução aquosa contendo ácido perclórico 0,02% (pH 2,6). A escolha da melhor composição da fase móvel foi baseada na resolução dos picos e tempo de retenção de soluções de 5-FU em água, metanol e acetonitrila. A condição analítica que se mostrou mais adequada foi composta de uma fase móvel água: ácido perclórico (99,8%:0,02%, pH=2,6), sob fluxo isocrático 1 mL/min, comprimento de onda de detecção 265 nm, temperatura do compartimento da coluna de 25°C, volume de injeção 100 μL e tempo total de corrida fixado em 16 min.

Visando a validação de um método bioanalítico para quantificação de 5-FU em amostras de pele de orelha de suínos (frigorífico de Ipuã-SP), foram utilizados 0,95 cm² de pele dermatomizada a 700 µm como matriz para cada concentração de 5-FU e padrão interno (PI) timina na concentração final de 2 μg/mL. Especificamente, as amostras de pele foram picotadas e contaminadas com 12, 80 e 240 µL de soluções de 5-FU em água a 125 µg/mL. Após secagem dessas soluções na pele, o 5-FU foi extraído com 5 mL de 3 diferentes solventes: água ou metanol ou acetonitrila, resultando em dispersões com 0,3, 0,5, 1, 2, 4 e 6 µg/mL de 5-FU. As amostras foram submetidas a vórtex por 1 min, seguidas de banho de ultrassom por 15 min e adição do PI. As amostras foram então centrifugadas por 10 min e filtradas em 0,22 µm. Um procedimento de extração líquido-líquido pela partição da dispersão de pele em água com acetato de etila foi também avaliado com base em estudos prévios (ALSARRA & ALARIFI, 2004; SANSON et al., 2011). Adicionaram-se 5 mL de acetato de etila à 1 mL das amostras de pele em água, que foram submetidas à agitação em vórtex por 7 min e centrifugação a 4000 x g por 10 min. O sobrenadante (fase orgânica) foi reservado e o procedimento foi repetido, de forma que ao final, 10 mL de fase orgânica foram submetidos à evaporação a 60°C, ressupensas usando 500 µL de água milliQ, agitadas em vórtex por 1 min e filtradas em 0,22 µm para quantificação do 5-FU por CLAE.

A) Especificidade

A especificidade foi avaliada analisando as amostras de pele na ausência do fármaco (placebo). As respostas foram avaliadas pela presença de interferentes e sobreposições de picos no mesmo tempo de retenção que o 5-FU e a timina em 265 nm.

B) Linearidade

Para a avaliação da linearidade, três séries de soluções padrões de 5-FU (0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 and 6,0 μg/mL) foram preparadas através de diluições a partir das soluções estoque em água milli-Q, utilizando-se pele como matriz e timina 2 μg/mL como padrão interno. A absorvância foi monitorada em triplicata em 265 nm. Os valores da razão (área pico 5-FU)/(área pico PI) foram plotados no eixo das ordenadas versus a concentração de 5-FU no eixo das abcissas

C) Precisão, Exatidão, LOD e LOQ

A avaliação da precisão e exatidão foram realizadas utilizando-se três diferentes concentrações (0,3; 2; 6 µg/mL) conforme especificado na metodologia analítica para quantificação de 5-FU nos lipossomas (item 4.2.1.1). Os valores de LOD e LOQ também foram obtidos seguindo-se a metodologia já descrita.

D) Estabilidade

A estabilidade das soluções de 5-FU foi avaliada em curva matrizada com presença de PI após três ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados foram avaliados de acordo às diretrizes da ANVISA (Resolução - RDC n° 27, de 17 de maio de 2012 – "Guia para validação de métodos bionalíticos") e FDA- guia para a indústria de validação de métodos bioanalíticos (2013), que determinam desvios de até 15% como aceitáveis (ANVISA, 2012; FDA, 2013).

E) Avaliação da recuperação

Amostras de pele de orelha de suínos dermatomizadas com área de 0,95 cm² foram picotadas e contaminadas com soluções de 5-FU de concentrações conhecidas (0,3 μg/mL, 2 μg/mL e 6 μg/mL). As amostras de pele foram submetidas à secagem em ar comprimido e o procedimento de extração foi procedido com a adição de 5 mL de água. Os tubos foram submetidos à agitação em vórtex por 1 min e banho de ultrassom por 15 min e então adicionados de 80 μL de PI a 125 μg/mL. As amostras foram centrifugadas por 10 min e filtradas em 0,22 μm. Em seguida, 1 mL destas amostras foram submetidos à extração líquido-líquido usando com 5 mL de acetato de etila, que foram submetidas à agitação em vórtex por 7 min e centrifugação a 4000

x *g* por 10 min. A fase orgânica foi reservada e o procedimento foi repetido, de forma que ao final, 10 mL de fase orgânica foram submetidos à evaporação a 60°C. Por fim, foram ressuspendidas usando 500 μL de água milliQ, agitadas em vórtex por 1 min e filtradas em 0,22 μM para quantificação do 5-FU por CLAE. Os valores obtidos de concentração de 5-FU foram comparados aos valores da curva padrão para obtenção dos valores de recuperação.

F) Aplicação do método

A aplicabilidade do método foi verificada a partir de um estudo de penetração cutânea *in vitro* do 5-FU a partir de uma solução e um creme comercial. As peles dermatomizadas a 700 μm (n=6) foram montadas em células de difusão de Franz, com compartimento doador preenchido com solução de 5-FU ou 70 μg de pomada comercial Efurix[®] ambos contendo 5% de 5-FU, resultando em 3,5 mg de 5-FU aplicados. O compartimento receptor foi preenchido com tampão PBS (100 mM pH 7,4), com agitação a 500 rpm durante 24 h (OECD, 2004). Ao término do experimento, as peles foram lavadas com água destilada e submetidas à extração pelo método validado. O compartimento receptor também foi coletado e extraído com água seguido de partição com acetato de etila para quantificação usando o método validado por CLAE.

4.2.2 Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo 5-FU

4.2.2.1 Métodos de preparo

Com o objetivo de alcançar a maior eficiência de encapsulação possível para o 5-FU, os lipídeos SPC, DPPC ou DSPC foram combinados ao Col usando a razão molar de 55:45 (100 µmol lipídeos) e razão fármaco-lipídeo 0,2 ou 0,1, com base nos estudos de THOMAS et al. (2011). Os lipossomas foram primeiramente preparados pelo método clássico da hidratação do filme lipídico (BANGHAM et al, 1965) e pelo método de ciclos de congelamento e descongelamento. Na hidratação do filme lipídico, os lipídeos DSPC:Col na proporção molar 55:45 foram colocados em balões de fundo redondo e dissolvidos em 2 mL de clorofórmio, até que uma solução límpida fosse obtida. Em seguida, o balão foi acoplado a um rotaevaporador (RV-10 equipado com controlador HB-10 e banho termostatizado SL-152/10, Ika), mantido imerso em banho termostatizado a 60°C com agitação de 100 rpm até a completa evaporação do

clorofórmio e formação de um fino filme lipídico (30 min). Em seguida, adicionou-se 5 mL de tampão fosfato (PBS pH 7,4) contendo 5-FU e este foi mantido em banho termostatizado com agitação de 100 rpm até a completa hidratação do filme lipídico (1h). Para os ciclos de congelamento e descongelamento, os lipossomas previamente preparados, pela hidratação do filme lipídico, foram submetidos a 5 ciclos de congelamento/descongelamento, de forma que o balão foi colocado alternadamente em banho de gelo seco ou em banho a 37°C (ELORZA et al., 1993; UHL et al., 2007). Todos os lipossomas foram extruídos (extrusor Northern Lipids) cinco vezes utilizando membranas de policarbonato com porosidade 0,2 µm, seguidos de extrusão três vezes em membranas de porosidade 0,1 µm. A melhor composição lipídica (DSPC:Col) para os demais estudos foi escolhida e outros dois métodos de preparo foram testados: método de encapsulação ativa por gradiente e método de evaporação da fase reversa.

A encapsulação ativa por gradiente foi realizada seguindo-se o método proposto por THOMAS et al. (2011) e está resumida na Figura 9A. De maneira geral, a solução de encapsulação foi preparada composta por PEI e acetato de cobre (Cu:PEI, razão 1:4, concentração final de cobre 600 µmol/mL) e usada para a hidratação do filme lipídico a 60°C por 1 h. Após a extrusão, os lipossomas foram purificados em coluna Sepharose CL-4B e frações de 1 mL foram eluídas em PBS. As frações contendo os lipossomas foram monitoradas quanto à absorvância em 400 nm, sendo que as frações 4 a 6 que continham os lipossomas foram combinadas a solução de 5-FU em PBS de diferentes concentrações, gerando razões fármaco/lipídeos 0,2; 0,5 e 1. Após a homogeneização em rotaevaporador por 1 h, os lipossomas foram separados do fármaco livre usando coluna Sepharose CL-4B, cujas frações (1 mL) foram eluídas em PBS e a porcentagem de encapsulação de 5-FU foi avaliada pelo método espectrofotométrico validado.

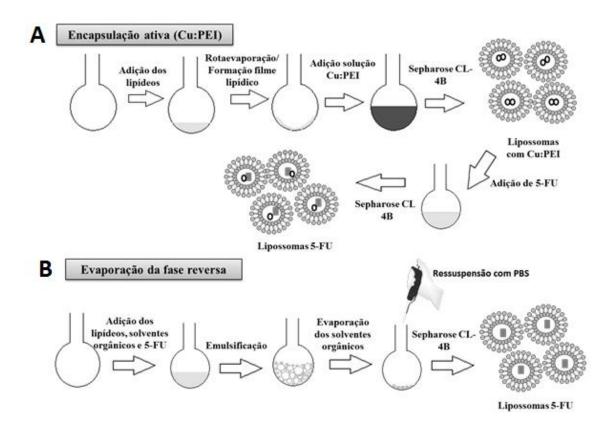


Figura 9. Representação esquemática dos métodos de preparo de lipossomas: A) encapsulação ativa por gradiente usando Cu:PEI e B) evaporação de fase reversa (Adaptado de PETRILLI et al., 2016).

Com o objetivo de avaliar a influência do método de preparo dos lipossomas na porcentagem de encapsulação de 5-FU, os lipossomas também foram preparados pelo método da evaporação de fase reversa (Figura 9B). Primeiramente, os lipídeos foram combinados a uma mistura de 2-propanol/clorofórmio/solução de 5-FU (2:1:1) e foi realizada emulsificação sob agitação. Os solventes orgânicos foram evaporados (a 60°C em placa de agitação em capela) e a mistura foi ressuspensa utilizando-se PBS, seguido de extrusão em membranas de policarbonato com porosidade 0,2 µm, seguidos de extrusão três vezes em membranas de porosidade 0,1 µm. Por fim, os lipossomas foram separados da fração não encapsulada usando-se uma coluna CL-4B e a porcentagem de encapsulação foi avaliada utilizando-se o método espectrofotométrico validado.

4.2.2.2 Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho de partícula, polidispersividade (PdI) e o potencial zeta dos lipossomas foram avaliados usando-se espalhamento dinâmico da luz (DLS) em um aparelho Zetasizer NS 90 (Malvern Instruments) usando-se laser 10 mW HeNe operando em 633 nm com um ângulo de incidência de 90° e temperatura a 25°C. Todas as análises foram realizadas no modo automático por intensidade, com amostras diluídas 10 vezes em água e os resultados (n=3) expressos em média ± desvio padrão (SD).

4.2.2.3 Porcentagem de encapsulação de 5-FU

A separação do 5-FU encapsulado nos lipossomas e livre foi realizada utilizando-se uma coluna de exclusão cromatográfica Sepharose CL-4B (0,7 cm x 10 cm), na qual 1 mL dos lipossomas extruídos foi aplicado. As frações (1 mL cada) foram coletadas usando PBS pH 7,4 e a absorvância foi verificada em 265 nm para quantificação do 5-FU livre e em 400 nm para detecção dos lipossomas (MADY, DARWISH, 2010). As frações lipossomais (frações 4-6) e do 5-FU livre (frações 10-14) foram separadas e o lipossoma total (previamente a separação na coluna de Sepharose) e o fármaco livre foram quantificados utilizando a metodologia validada.

A porcentagem de encapsulação foi determinada como a porcentagem de fármaco livre relativa à quantidade total de fármaco (Equação V). Para a quantificação do lipossoma total, os lipossomas foram lisados usando-se DMSO, submetidos a agitação em vortex por 2 min e sonicados em banho de ultrassom por 10 min. Por fim, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas previamente à quantificação.

% encapsulação =
$$\frac{C_{5FUtotal} - C_{5FUlivre}}{C_{5FUtotal}}$$
 (Equação V)

Na qual C _{5-FU total} é a concentração total de 5-FU (previamente à eluição na coluna) e C_{livre 5-FU} é a concentração de 5-FU livre (frações 10-14).

4.2.2.4 Estabilidade dos lipossomas

A formulação lipossomal escolhida para o protocolo de conjugação ao cetuximabe (DSPC:Col) foi monitorada para verificar a estabilidade usando tamanho

de partícula, polidispersividade e porcentagem de encapsulação durante 30 dias a 4°C. Para isso, os lipossomas foram mantidos a 4°C e eluídos em coluna CL-4B imediatamente antes das quantificações para monitoramento da porcentagem de encapsulação. Os resultados estão expressos como a média ± desvio padrão (SD) das análises em triplicata e submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

4.2.3 Desenvolvimento e caracterização de imunolipossomas

4.2.3.1 Preparo do cetuximabe para conjugação aos lipossomas

O protocolo de conjugação foi baseado no método previamente descrito por LAGINHA et al. (2005). Brevemente, cetuximabe (1 mg/mL) foi tiolado usando-se uma mistura reagente de traut:cetuximabe 40:1 (mol/mol) em tampão PBS/EDTA (5 mM, pH 8,0) por 1 h a 37°C (Figura 10). O excesso de reagente de Traut foi removido usando-se cromatografia em colunas descartáveis PD-10, coletando-se frações de 1 mL eluídas com tampão PBS/EDTA. A concentração de cetuximabe tiolado foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) seguindo-se as especificações do fabricante. Por fim, as frações contendo cetuximabe tiolado (frações 4-6) foram combinadas e reservadas para conjugação aos lipossomas.

$$NH_{2} - NH_{2} + NH_{2} + CI - NH_{2} + C$$

Figura 10. Reação de tiolação do cetuximabe (Adaptado de http://www.google.com/patents/US7691826).

4.2.3.2 Preparo dos imunolipossomas

Lipossomas foram preparados pelo método da hidratação do filme lipídico como feito anteriormente (item 4.2.2.1), mas acrescentando-se ao preparo do filme lipídico composto por DSPC-Col, o lipídeo DSPE ligado ao PEG-Mal (DSPE-PEG-Mal) como âncora para o cetuximabe tiolado através de uma ligação covalente, devido à presença da extremidade quimicamente reativa maleimida (Mal). Desta forma, a

mistura lipídica DSPC:Col:DSPE-PEG-Mal (55:45:2,5) foi dissolvida em 2 mL de clorofórmio, o qual foi evaporado em rotaevaporador a 60°C e o filme lipídico formado foi hidratado usando-se 2 mL de PBS (pH 7,4) contendo ou não 5-FU, seguido de extrusão cinco vezes em membranas de policarbonato 0,2 µm e três vezes em porosidade 0,1 µm. A esta dispersão lipossomal foram adicionados 3 mL do cetuximabe tiolado e esta mistura foi deixada em repouso *overnight* a temperatura ambiente (lipossoma total).

O cetuximabe não conjugado ao lipossoma foi removido usando-se coluna Sepharose CL-4B e eluente PBS (pH 7,4). Resumidamente, 1 mL das amostras foram eluídas em coluna Sepharose CL-4B, usando-se PBS e frações de 1 mL de volume. A absorvância destas frações foi monitorada em 400 nm (absorção de lipossomas) e pelo método do BCA para quantificação das proteínas (item 4.2.3.3). A eficiência de conjugação do cetuximabe aos lipossomas foi determinada pela diferença porcentual entre a quantidade de cetuximabe adicionada e a recuperada nas frações 4 a 6 (imunolipossomas).

Os imunolipossomas foram caracterizados usando-se tamanho de partícula, polidispersividade, potencial zeta, eficiência de conjugação do cetuximabe, integridade da estrutura primária do cetuximabe e microscopia eletrônica de transmissão.

Com o intuito de avaliar possíveis alterações na porcentagem de encapsulação de 5-FU nos lipossomas contendo o lipídeo DSPE-PEG, também foram preparados e caracterizados lipossomas formados por DSPC:Col:DSPE-PEG-NH₂ (55:45:2.5).

4.2.3.3 Quantificação do cetuximabe conjugado aos lipossomas por BCA

A eficiência de conjugação dos anticorpos aos lipossomas foi avaliada pelo método de quantificação de proteínas, BCA, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, o reagente de trabalho foi preparado misturando-se 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B (50:1, Reagente A:B). Em placas de 96 poços, aplicaram-se a 25 μL da curva padrão (25-750 μg/mL) ou amostras e 200 μL do reagente de trabalho. As microplacas foram então homogeneizadas por 30 s em um agitador de placas e incubadas a 37°C por 30 min. Por fim, a absorvância foi medida em 562 nm e a eficiência de conjugação foi calculada como a porcentagem de

cetuximabe conjugado comparado a quantidade total de anticorpo tiolado adicionado a dispersão de lipossoma (Equação VI).

Eficiência de conjugação =
$$\frac{C \text{ cetuximabe frações 4-6}}{C \text{ cetuximabe tiolado}} x 100 \text{ (Equação VI)}$$

Na qual C cetuximabe frações 4-6 é a concentração obtida de cetuximabe nas frações 4-6 e C cetuximabe tiolado é a concentração de cetuximabe tiolado adicionado a dispersão lipossomal.

4.2.3.4 Integridade da estrutura primária do cetuximabe

A integridade da estrutura primária do anticorpo após a ligação covalente aos lipossomas foi avaliada usando eletroforese em gel SDS-Page, sob condições redutoras, baseada em estudos prévios de PERK et al (2005) e nos protocolos fornecidos pelo fabricante Biorad. As amostras contendo 1 mg de proteína previamente tratadas com a adição do reagente redutor 2-mercaptoetanol e do tampão Laemmli foram aquecidas a 60°C por 10 minutos e então aplicadas nos géis SDS-Page 4-20% mini-PROTEAN. A corrida eletroforética foi conduzida a 100 V por 50 min usando tampão Tris/glicina/SDS pH 8,3 e Precision Plus ProteinTM (padrão com duas cores, Biorad) para confirmação do peso molecular das bandas. A coloração foi conduzida usando Coomassie coloidal QC (Biorad), seguido de remoção do excesso do corante com três ciclos de lavagem em água milliQ por 30 min cada. Por fim, os géis foram fotografados para a interpretação dos resultados.

4.2.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Os lipossomas e imunolipossomas foram visualizados usando contraste negativo em um microscópio eletrônico de transmissão. As amostras foram diluídas previamente em tampão PBS pH 7,4 de forma que a concentração final de lipídeos obtida foi de 0,5 mg/mL. As formulações foram colocadas em grades de cobre com 200 mesh, deixadas em repouso para a adsorção e o excedente foi removido com papel de filtro. Uma gota de 1% (p/v) de solução aquosa de acetato de uranila foi adicionada e deixada em contato com as amostras por 2 min. O excesso de água foi

removido e as amostras foram secas em temperatura ambiente. As análises foram então realizadas usando aceleração de 100 kV e aumento de 200.000 vezes (microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CX2, JEOL).

4.2.4 Avaliação *in vitro* em linhagem de carcinoma celular escamoso de pele humana (A431) EGFR positiva

4.2.4.1 Cultivo de células

Células de SCC humano (ATCC A431) foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) inativado com calor e 1% (v/v) de solução antibiótica/antimicótica contendo 10000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL, cultivadas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.2.4.2 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade induzida pelas amostras foi avaliada pelo método do MTT. Para este experimento, 1x10⁴ células/poço foram plaqueadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com amostras de 5- FU (10⁻³ a 1000 μM), cetuximabe (6,85.10⁻⁷ a 0,685 μM), lipossomas (5.10⁻⁴ a 10 μM) e imunolipossomas (5.10⁻⁴ a 10 μM) diluídas em meio DMEM incompleto por 72 h e 120 h. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e meio DMEM incompleto acrescido de solução de MTT a 2,5 mg/mL foram adicionados e as microplacas incubadas a 37°C por 4 h. Após essa etapa, o meio foi descartado e os cristais de formazan solubilizados em 200 μL de DMSO. A absorvância foi avaliada em leitor de microplacas em 570 nm. A citotoxicidade foi calculada como a porcentagem de células viáveis comparadas ao grupo controle e a concentração inibitória para 50% das células (IC50) foi calculada.

O método de CHOU e TALALAY et al. (1984) foi usado para calcular o índice de combinação entre os fármacos (5-FU e cetuximabe), como representado na Equação VII:

$$CI = \frac{(D)^{1}}{(D_{x})^{1}} + \frac{(D)^{2}}{(D_{x})^{2}}$$
(Equação VII)

Na qual, $(D)^1$ e $(D)^2$ são as concentrações dos fármacos 1 e 2 requeridos para causar IC50 em combinação, enquanto $(D_x)^1$ e $(D_x)^2$ são as doses dos fármacos 1 e 2 requeridas para causar IC50 quando aplicados individualmente. Valores de CI<1 indicam sinergismo, CI>1 indicam antagonismo e CI=1 indicam aditividade (JAAFARI et al., 2012).

4.2.5 Avaliação do *uptake* celular de lipossomas e imunolipossomas em linhagem EGFR positiva (A431) e negativa (B16F10)

4.2.5.1 Cultivo de células

Células de SCC humano (A431), EGFR positivas, e células de melanoma murino (B16F10), EGFR negativas, foram cultivadas conforme descrito no item 4.2.4.1.

4.2.5.2 Microscopia confocal

Visando avaliar o uptake de lipossomas e imunolipossomas pelas células A431 (EGFR postivas) e B16F10 (EGFR negativas), os lipossomas e os imunolipossomas foram marcados com o corante Dio. Para tanto, foram adicionados 100 µL de uma solução de Dio na concentração de 2,5 mg/mL em clorofórmio no momento do preparo do filme lipídico (MORTESEN et al., 2013). O filme lipídico foi obtido por rotaevaporação conforme descrito no item 4.2.2.1 e 4.2.3.2 e hidratado com 2 mL de PBS. Então, 4x10⁵ células/poço foram plaqueadas em microplacas de 6 poços, contendo lamínulas esterilizadas de 22 mm/22 mm e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por 3, 6 e 24 h com as amostras (20 µL) diluídas em meio DMEM incompleto. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS e então se acrescentaram 2 mL de paraformaldeído (1%) nos poços para fixação das células. As placas foram mantidas overnight a 4°C e vedadas com vitafilme. Em seguida, os poços foram novamente lavados com PBS e as lamínulas vertidas em lâminas de histologia contendo Prolong Diamond® com o marcador de núcleo DAPI. As lâminas foram mantidas em repouso por 24 h previamente a visualização em microscópio confocal Leica TCS SP8 (λexc= 488 nm, λem= 552 nm, aumento de 63 vezes com objetiva de imersão em óleo).

4.2.5.3 Citometria de fluxo

As mesmas amostras avaliadas em microscopia confocal foram estudadas em citometria de fluxo. Para isso, $4x10^5$ células/poço foram plaqueadas em microplacas de 6 poços e incubadas por 24 h a 37° C em atmosfera contendo 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com as amostras diluídas (lipossomas e imunolipossomas marcados com Dio) em meio incompleto por 24 h. Após o tratamento as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas usando-se $300~\mu\text{L}$ de tripsina 0,25%, seguidas de neutralização com meio completo, centrifugação e ressupensão em PBS. No momento da análise as amostras foram acrescidas de $5~\mu\text{L}$ de iodeto de propídeo ($50~\mu\text{g/mL}$). As amostras foram então submetidas à análise em citômetro de fluxo (BD FACSCanto I), usando λ exc= 488~nm, λ em= 530/30~nm (Dio) e λ exc= 488~nm, λ em= 670~nm (iodeto de propídeo).

4.2.6 Avaliação da liberação in vitro

A avaliação da quantidade de 5-FU liberada dos lipossomas e imunolipossomas foi realizada utilizando-se 1,5 mL das amostras (n=3) e 48,5 mL de PBS pH 7,4 sob agitação constante a 500 rpm. Nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h foram retiradas alíquotas de 1 mL das amostras diluídas e acrescentados 1 mL de PBS (GIJSENS et al., 2002). As amostras foram então dispostas em tubos Amicon® 50 kDa e submetidas a centrifugação durante 10 min a 4000 g para separação da fração livre, que deveria atravessar a membrana de 50 kDa (alíquota filtrada), da fração encapsulada do fármaco, retida pelo filtro. Como controle deste processo, uma solução simples de 5-FU em água foi analisada da mesma forma que os lipossomas e imunolipossomas. Por fim, as amostras da alíquota filtrada foram diluídas para leitura em espectrofotômetro em 265 nm. Amostras branco de lipossomas e imunolipossomas foram submetidas ao mesmo processo para verificação de possíveis interferentes. O método analítico para quantificação de 5-FU em espectrofotômetro foi utilizado para quantificação do fármaco liberado. Os perfis de liberação da solução controle, lipossomas e imunolipossomas foram comparados e calculou-se a porcentagem de 5-FU liberada.

A cinética de liberação foi determinada avaliando-se o maior coeficiente de correlação linear dentre as cinéticas de ordem zero, primeira ordem e Higuchi, de acordo com as equações VIII, IX e X (Frizon et al., 2013):

Cinética de ordem zero: M₀–M_T= k₀.t (*Equação VIII*);

Cinética de primeira ordem: $ln(M_0/M_T) = k_1.t$ (Equação IX);

Modelo de Higuchi: M_T= k₂√t (Equação X).

4.2.7 Estudo in vitro de penetração cutânea

A pele da porção externa de orelhas de suínos recentemente sacrificados foi dissecada com ajuda de um bisturi e dermatomizada (~700 µm). As peles foram estocadas a -70°C por um período máximo de 30 dias antes do uso. Com o objetivo de garantir que a barreira da pele estava íntegra, no dia do experimento, a resistividade elétrica das peles foi determinada usando-se os parâmetros determinados por Tang et al. (2001). Resumidamente, as peles dermatomizadas foram montadas nas células de difusão tipo Franz e eletrodos de Ag/AgCl inseridos no compartimento doador e receptor das células. O eletrodo em contato com o meio receptor foi ligado a um gerador de corrente elétrica alternada e uma potência de 100 mV (RMS) e 10 Hz de frequência foi aplicada. A intensidade da corrente elétrica capaz de ser passada através da pele foi então medida por meio do eletrodo inserido no compartimento doador ligado a um multímetro (Minipa ET 2053). A resistência da pele foi calculada utilizando-se a lei de Ohm e o valor de resistividade foi obtido multiplicando-se o valor de resistência pela área da pele disponível para permeação (0,95 cm²). As amostras de pele com resistividade elétrica inferior a 35 kΩ.cm² foram consideradas danificadas e não foram utilizadas nos experimentos (TANG et al. 2001).

Na avaliação da penetração cutânea em pele de orelha de suínos, as peles (n=6) foram dispostas em células de difusão de Franz de área 0,95 cm², com compartimento doador preenchido com 1,5 mL de solução, lipossomas ou imunolipossomas contendo 5-FU, todos na concentração de 500 μg/mL de fármaco. O compartimento receptor foi preenchido com 16 mL de tampão PBS pH 7,4 e submetido a agitação à 500 rpm durante 6 h. Nesta etapa, o objetivo foi avaliar a penetração cutânea do 5-FU na ausência da corrente elétrica (penetração passiva do

fármaco) para posterior comparação com a penetração do 5-FU na presença da iontoforese (Figura 11).

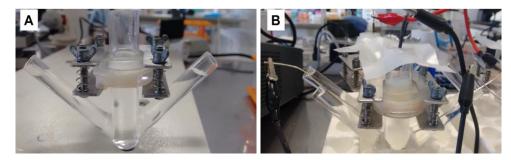


Figura 11. Ilustração do experimento de penetração cutânea passivo (A) e de iontoforese (B).

Nos experimentos de iontoforese foram utilizados eletrodos de prata (Ag) e cloreto de prata (AgCl) obtidos conforme descrito por Lopez et al. (2000) e Bernardi et al. (2015). Primeiramente, para obtenção dos eletrodos negativos (cátodo), um fio de prata (99,9% de pureza) teve sua ponta dobrada e foi imerso em cloreto de prata fundido e então removido para solidificação à temperatura ambiente. Para o preparo de eletrodos positivos (ânodo) foi feito um circuito elétrico em série com fios de platina e eletrodos de AgCl, todos mergulhados em solução de NaCl. Uma corrente de 0,3 mA foi passada pelos eletrodos por 24 h, partindo do terminal positivo ligado à platina e se ligando ao terminal negativo nos eletrodos de AgCl para sua redução ao estado de Ag.

Para os experimentos de penetração cutânea usando a iontoforese e células de difusão de Franz, o eletrodo de Ag (ânodo) foi colocado no compartimento doador, em contato com a formulação que continha o 5-FU (solução, lipossoma ou imunolipossoma). O eletrodo de AgCl (cátodo) foi colocado no compartimento receptor e o sistema, com os eletrodos ligados em série em 6 células de difusão, foi submetido a uma corrente elétrica constante de 0,5 mA/cm² 6 h (Figura 11B). Desta forma, as formulações foram submetidas a iontoforese anódica.

Ao término do experimento, as peles foram lavadas com água destilada e colocadas sobre uma superfície forrada, com o estrato córneo voltado para cima. Para separar o estrato córneo das demais camadas da pele, as amostras de pele foram submetidas à técnica do *tape stripping*. O processo foi realizado utilizando 15 pedaços de fita adesiva (Durex® 3M), aderidas ao estrato córneo e retiradas sucessivamente, sendo que a primeira foi descartada e as demais mergulhadas em tubo falcon

contendo 5 mL de água milliQ. A parte remanescente da pele (epiderme viável e derme) foi picotada e imersa em tubos falcon contendo 5 mL de água milliQ. O compartimento receptor também foi coletado e o volume de 5 mL foi colocado em tubos falcon. As amostras foram então submetidas à agitação em vórtex por 1 min, seguidas de banho de ultrassom por 15 minutos e adição do padrão interno timina na concentração final de 2 μg/mL. Em seguida foram centrifugadas por 10 min e filtradas em 0,22 μm. O procedimento de extração do 5-FU das amostras foi realizado por partição líquido-líquido (água-acetato de etila), conforme padronizado no item 4.2.1.2. Desta forma, adicionaram-se 5 mL de acetato de etila à 1 mL dessas amostras em água, que foram submetidas à agitação em vórtex por 7 min e centrifugação a 4000 x g por 10 min. O sobrenadante (fase orgânica) foi reservado e o procedimento foi repetido, de forma que ao final 10 mL de fase orgânica foram submetidos à evaporação a 60°C, ressupensa usando 500 μL de água milliQ, agitada em vórtex por 1 min e filtrada em 0,22 μm para quantificação do 5-FU que penetrou no estrato córneo pelo método validado usando CLAE (item 4.2.1.2).

4.2.7.1 Determinação da quantidade de 5-FU retida na região folicular

Com o objetivo de determinar a quantidade de 5-FU retida na região folicular e avaliar a influência dos lipossomas e imunolipossomas no direcionamento do fármaco para o folículo piloso com o uso de iontoforese, utilizou-se a técnica de *tape stripping* diferencial (GELFUSO et al., 2015). Ao final do experimento de penetração cutânea, procedeu-se o tape stripping com o auxílio de 15 fitas adesivas para a remoção do estrato córneo. Em seguida, o conteúdo folicular desta área da pele sem estrato córneo foi removido pela aplicação de uma gota de cola de cianoacrilato (SuperBonder, Brasil) em sua superfície. Uma fita adesiva foi posicionada sobre a cola e pressionada levemente por 5 min até que secasse completamente. Em seguida, a fita foi removida com um único movimento. A fita adesiva com o conteúdo folicular foi então submetida ao procedimento de extração em água e partição com acetato de etila para quantificação do 5-FU acumulado nos folículos pilosos pelo método bioanalítico validado.

4.2.7.2 Análise Estatística

Os estudos de penetração cutânea *in vitro* foram analisados usando o método de variância ANOVA, com pós teste de Tukey (p< 0,05 foi considerado o valor mínimo de significância).

4.2.8 Estudo in vivo em modelo xenográfico de SCC com superexpressão de EGFR

4.2.8.1 Animais

Camundongos fêmea *Swiss nude* de 12 a 16 semanas foram utilizados para os experimentos de acordo ao protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (Protocolo CEUA nº 13.1.1156.53.0). Os animais foram mantidos a temperatura e umidade controladas com água e comida *ad libitum* e ciclos de 12 h claro/escuro, em *racks* com ar filtrado por filtros HEPA e manipulados em capela de fluxo laminar.

4.2.8.2 Indução do SCC nos camundongos

Células A431 de SCC de pele humano, EGFR positivas, forma cultivadas em meio DMEM como descrito no item 4.2.4.1. Por via subcutânea, 2x10⁶ células A431 foram injetadas no dorso dos camundongos. Os experimentos foram iniciados quando os tumores atingiram entre 50 e 100 mm³ (12 dias após a injeção), de maneira similar ao trabalho de Nakata et al (2004) e Skvortsova et al (2010).

4.2.8.3 Tratamento do SCC induzido em camundongos

As formulações contendo 5-FU (solução, lipossoma e imunolipossoma) foram administradas a dois grupos distintos de animais por duas vias diferentes: subcutânea e tópica. A administração tópica foi feita com o auxílio da iontoforese anódica (0,5 mA/cm²).

A Figura 12 mostra um esquema dos protocolos de tratamento realizado para cada uma das vias de administração.

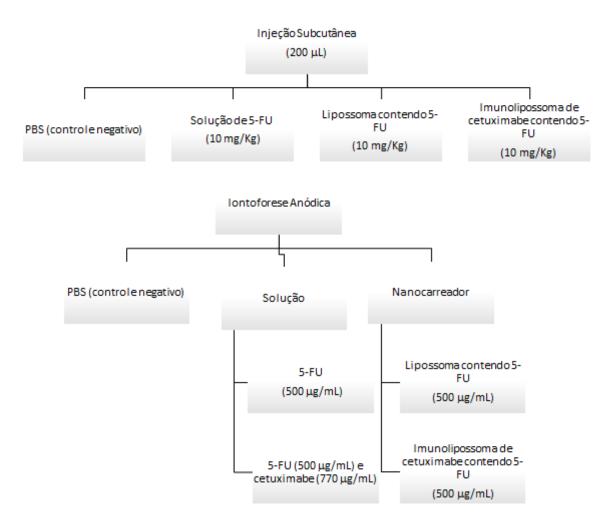


Figura 12. Esquema dos protocolos de tratamento realizado para cada uma das vias de administração: subcutânea e tópica (iontoforese)

Todos os grupos eram compostos por 5 animais. A quantidade de cetuximabe utilizada nas formulações foi de 20 μg por μmol de lipídeo, de acordo à literatura e estudos clínicos (PAN et al., 2007; MAMOT et al., 2012). A quantidade de 5-FU administrada foi de 10 mg/Kg no tratamento subcutâneo e 500 μg/mL de 5-FU no tratamento tópico (iontoforese). Uma solução de cetuximabe na dose de 770 μg/mL foi administrada topicamente nos animais tratados com iontoforese para comparação do efeito do anticorpo não conjugado.

Os animais foram tratados a cada 3-4 dias em capela de fluxo laminar, totalizando 6 doses. No caso do tratamento por iontoforese, os animais foram anestesiados usando 120 µL de ketamina/xilazina (1:2) 30% previamente aos tratamentos. A iontoforese anódica foi aplicada inserindo-se o eletrodo de Ag em um compartimento de plástico que envolvia o tumor e continha a formulação estudada.

Este eletrodo foi conectado a um dos polos da fonte de energia. Para fechar o circuito elétrico, um eletrodo negativo (AgCl) na forma de *patch* (IOMED) foi aplicado na cauda do animal (Figura 13). Uma corrente elétrica constante de 0,5 mA/cm² foi aplicada por 15 min. A fonte de energia Futron Data foi utilizada nos experimentos.

Após 22 dias do início do tratamento, os animais foram sacrificados usando-se sobredose anestésica ketamina/xilazina (1:2) 30%, por via intraperitoneal, conforme preconizado pelo Comitê de Ética do uso de animais do Campus de Ribeirão Preto – USP.



Figura 13. Tratamento tópico dos camundongos usando iontoforese anódica.

4.2.8.4 Avaliação da regressão tumoral

O crescimento tumoral foi acompanhado duas vezes por semana até o final do estudo (33 dias após a injeção das células) com o uso de paquímetro digital. Os animais foram sacrificados usando-se sobredose anestésica, conforme preconizado pelo Comitê de Ética da FCFRP-USP. O volume tumoral foi calculado de acordo a Equação XI:

$$V (mm^3) = d^2 x \frac{D}{2}$$
 (Equação XI)

na qual d e D correspondem ao menor e ao maior diâmetro, respectivamente (ZUCO et al., 2010).

Os tumores então foram mantidos imersos em formalina para posterior avaliação histológica e imunohistoquímica.

4.2.8.5 Monitoramento da massa corpórea dos animais

Com o objetivo de avaliar efeitos tóxicos do uso das formulações nos animais, a massa corpórea foi aferida duas vezes por semana utilizando-se balança digital.

4.2.8.6 Obtenção dos cortes histológicos

Os tumores dos grupos avaliados (controle negativo, solução, lipossomas e imunolipossomas) foram retirados da formalina e deixados por 1 h imersos em etanol 80%. Os tumores foram então dispostos em cassetes plásticos para a etapa de desidratação usando três banhos de etanol absoluto, com duração de 1 h cada, seguido de diafanização com três banhos de xilol, por 30 min cada. Foram então realizados dois banhos com parafina a 62°C, com duração de 30 min cada. Os tumores foram incluídos em parafina e deixados à temperatura ambiente para endurecimento. Um micrótomo rotativo (HM 315R, Microm) foi então utilizado para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura, que foram recolhidos em lâminas de vidro do tipo Knittel adesivas (ELOY et al., 2016).

4.2.8.7 Avaliação histológica utilizando coloração com hematoxilinaeosina (HE)

Foi utilizado o método clássico de coloração com hematoxilina-eosina (ELOY et al., 2016). Primeiramente, os cortes histológicos foram desparafinados usando-se 2 banhos de xilol de 10 min cada, seguidos de hidratação com banhos de álcool absoluto, 85%, 80%, 70% e água destilada, cada banho com duração de 5 min. Em seguida, foi realizada a coloração com hematoxilina (5-10 min) e lavagem com água destilada por 10 min. A coloração com eosina foi realizada em seguida, usando-se a concentração de 0,5% de eosina por 5 min e lavagem com água corrente. Uma etapa de desidratação foi realizada pela passagem sequencial em álcool 70%, álcool 80%, álcool 95% por 1 min cada. Então, procedeu-se a incubação três vezes com álcool absoluto (5 min) e lavagem com água. Por fim, o corante foi fixado e o material foi conservado utilizando-se banho de xilol por 5 min, seguido da montagem da lâmina

com resina. A observação das lâminas foi realizada em microscópio óptico, com aumento de 200 x acoplado à câmera. Foram avaliadas as características histológicas do tecido tumoral para os diferentes grupos tratados bem como a atividade mitótica, necrótica e presença de vasos sanguíneos e queratinização. Os tumores foram classificados com relação ao grau de diferenciação (pouco diferenciado, moderamente diferenciado ou muito diferenciado), já que quanto maior a diferenciação do tumor, menor sua agressividade.

4.2.8.8 Avaliação imunohistoquímica com anticorpo anti Ki-67

A avaliação imunohistoquímica com anticorpo anti Ki-67 foi realizada com base em estudos prévios (SOLOMON et al., 2002; ELOY et al., 2016). Com o tecido previamente fixado e parafinado, procedeu-se a recuperação antigênica do tecido. As lâminas foram incubadas por 10 min em tampão citrato pH 6,0 (30 min) a 95-99°C, em banho maria. As lâminas foram então removidas, resfriadas por 5 min, lavadas em água destilada e deixadas em banho por 5 min com tampão de lavagem TBS/Tween 20. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através da aplicação do reagente de bloqueio da peroxidase ao redor dos cortes, que foram secos com caneta Pap Pen. A incubação com o tampão de bloqueio foi feita por 10 min à temperatura ambiente, seguido de lavagem com tampão de lavagem. O bloqueio de proteína foi realizado com aplicação do reagente de bloqueio de proteína, incubado por 10 min, sem a etapa de lavagem. Em seguida, o anticorpo primário monoclonal de coelho anti-Ki-67, clone SP6, diluído em 1:200 com diluente de anticorpo foi aplicado, com incubação por 1 h à temperatura ambiente, e então lavado com tampão de lavagem. Para a visualização, os cortes foram secos e o reagente *complement*, do polímero reveal HRP, foi aplicado e incubado por 10 min à temperatura ambiente. Após secagem dos cortes, o reagente HRP conjugate foi aplicado e incubado por 15 min à temperatura ambiente, seguido da etapa de lavagem com o tampão de lavagem. Para a coloração do substrato cromógeno, o reagente DAB líquido foi diluído, conforme instruções do fabricante (Spring), aplicado e incubado por 5 min à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e em seguida contra corados com hematoxilina-eosina. Por último, os tecidos foram desidratados em etanol e xilol e as lâminas foram permanentemente montadas. A observação das lâminas foi feita em microscópio convencional acoplado com câmera, com aumento de 200X. Para determinação da porcentagem de núcleos positivos para Ki-67, o número de células com núcleo castanho em 500 células foram contadas/lâmina com o auxílio do *software* ImageJ.

4.2.8.9 Análise estatística

O teste two-away ANOVA com pós teste de Bonferroni foi utilizado nos estudos de eficácia *in vivo* e a significância estatística foi estabelecida como p <0,05.

5.1 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos

5.1.1 Quantificação do 5-FU em lipossomas por espectrofotometria

Primeiramente, o comprimento de onda de máxima absorvância do 5-FU foi determinado em 265 nm, usando-se um espectrofotômetro e com base em estudos prévios (DE MATTOS et al., 2013). A Figura 14 mostra a curva analítica obtida para o 5-FU em água analisado por espectrofotometria. Uma relação linear foi encontrada para a absorvância das soluções entre 0,25 e 6 µg/mL. O coeficiente de correlação linear obtido foi de 0,9991, o que demonstra linearidade adequada (r > 0.999). O LOD foi determinado como 210 ng/mL e o LOQ em 250 ng/mL.

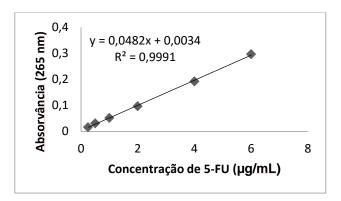


Figura 14. Curva analítica determinada por espectrofotometria para o 5-FU em 265 nm.

A especificidade do método espectrofotométrico foi avaliada usando lipossomas branco e lipossomas branco contaminados com solução de 5-FU em concentração conhecida. Não foram detectados interferentes para o comprimento de onda de interesse, fazendo com que o 5-FU em solução contaminada com lipossomas pudesse ser quantificado com 95,5% e 99,4% de precisão e exatidão, respectivamente.

O coeficiente de variação e a exatidão, ambos intra e inter-ensaio para as soluções padrão estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da precisão e exatidão intra e inter-ensaio para o método espectrofotométrico de quantificação de 5-FU.

Intra-ensaio			Inter-ensaio		
Concentração (μg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Concentração (μg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
0,25	104,6	4,4	0,25	99,2	6,9
0,5	113,1	1,9	0,5	114,3	10,3
1,0	100,8	1,9	1,0	108,5	10,0
2,0	96,9	0,9	2,0	99,1	4,8
4,0	97,8	0,5	4,0	101,7	5,9
6,0	101,4	0,4	6,0	100,4	2,0

Os valores de desvio padrão relativo representam variações intra e inter-ensaio aceitáveis para o 5-FU, com adequada precisão e exatidão do método, visto que o guia da ANVISA Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 determina valores de até 5% e o ICH não estabelece limites, mas sabe-se que de acordo à complexidade da amostra e concentração, valores de até 20% são aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

5.1.2 Quantificação do 5-FU em pele por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação do 5-FU extraído de pele de porco foi feita usando uma coluna analítica C-18 com eluição isocrática. Baseando-se em estudos previamente publicados (ALSARRA & ALARIFI, 2004; ZHANG et al., 2012; DE MATTOS et al., 2013; SABITHA et al., 2013) e na farmacopeia americana (United States Pharmacopoeia USP 34, 2010), fases móveis compostas somente por água acidificada com pH próximo de 3 acrescidas ou não de até 10% de acetonitrila ou metanol devem ser empregadas. O uso de baixo pH é interessante considerando-se a natureza altamente hidrofílica do 5-FU e seu pKa próximo de 8 (Figura 15). Desta forma, em pH ácido, o 5-FU, sendo um ácido fraco, encontra-se não ionizado, aumentando sua interação com a coluna C-18, resultando em um tempo de retenção médio de 5 minutos, como observado em nossos experimentos e em estudos prévios (ALSARRA & ALARIFI, 2004; SANSON et al., 2011).

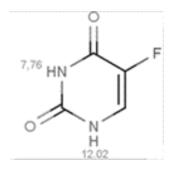


Figura 15. Valores de pKa determinados para o 5-FU utilizando o *software* Marvin Sketch versão 6.2 (ChemAxon).

A Figura 16 mostra cromatogramas de soluções de 5-FU e de homogenatos de pele obtidos usando água acidificada (pH 2,6) como fase móvel. Essa composição de fase móvel foi selecionada após estudo preliminar com solução aquosa de 5-FU e de homogenato de pele em água eluídos com outras duas fases móveis, além da água acidificada, tais como: água acidificada:acetonitrila (98:2) e água acidificada:metanol (98:2). As soluções de 5-FU apresentaram picos mais bem definidos e com tempo de retenção maior (aproximadamente 5 min, Figura 16A) para a fase móvel composta por água acidificada (pH 2,6) comparado à fase móvel contendo água:acetonitrila (98:2), água:metanol (98:2).

Desta forma, optou-se por prosseguir os estudos para quantificação de 5-FU extraído de pele utilizando fase móvel composta apenas por água acidificada (pH 2,6). No entanto, observou-se, como ilustrado na Figura 16B, que a pele apresenta elevado número de interferentes que impediriam a quantificação do fármaco por análise direta da solução de 5-FU extraída da pele com água.

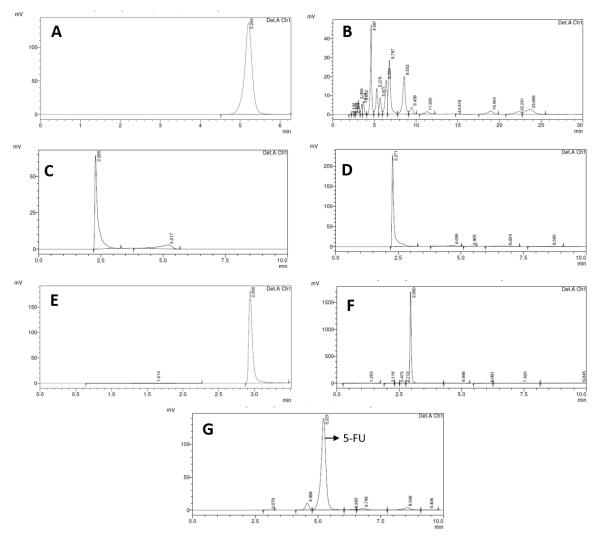


Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE das soluções de 5-FU e amostras de pele em diferentes solventes: A) Padrão 5-FU em água (sem pele); B) Amostra de pele em água; C) Padrão de 5-FU em metanol (sem pele); D) Amostra de pele em metanol; E) Padrão de 5-FU em acetonitrila (sem pele); F) Amostra de pele em acetonitrila e G) Amostra matrizada de 5-FU com pele após partição líquido-líquido com acetato de etila.

Desta forma, foram feitas extrações em água, metanol (Figura 16C e D) e acetonitrila (Figura 16 E e F) e uma partição líquido-líquido, após a extração da pele com água, usando acetato de etila (Figura 16 G).

A partição liquido-liquido envolve a partilha da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), sendo que a eficiência de recuperação do fármaco é determinada pela afinidade do mesmo pelo solvente de extração, pela proporção entre as fases e pelo número de extrações realizadas. Como vantagens do método podem-

se citar a facilidade do procedimento, a possibilidade de uso de um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Ainda, as proteínas extraídas da pele pela água são desnaturadas pelo solvente orgânico, o que reduz o número de substâncias indesejáveis injetadas na coluna cromatográfica. Por outro lado, como desvantagens tem-se que as amostras com alta afinidade pela água, como o 5-FU, são parcialmente extraídas pelo solvente orgânico, resultando em perda do analito, além da possibilidade de concentrar impurezas do solvente junto com a amostra, dentre outras. Apesar destas desvantagens, esta é considerada uma técnica clássica de preparação de amostra e passível de ser utilizada para uma grande gama de substâncias presentes em fluidos biológicos, visto que extratos bastante limpos podem ser obtidos com alta seletividade para alguns analitos (QUEIROZ et al., 2001).

Extrações de pele com metanol já foram relatas na literatura para resolução dos interferentes de pele e quantificação de 5-FU (SABITHA et al., 2013), porém resultando em tempos de retenção próximos a 1 min. Este método foi testado em nossos experimentos (Figura 16C), resultando em um único pico com tempo de retenção de 3 min quando apenas a solução metanólica de 5-FU foi injetada. Porém, contaminantes da pele foram eluídos no mesmo tempo de retenção, impedindo a quantificação adequada do 5-FU (Figura 16 D). De maneira semelhante, testou-se extração com acetonitrila, também conhecida por causar a precipitação de proteínas (QUEIROZ et al., 2001), a qual apresentou resultado semelhante ao metanol (tr=3,0min, Figuras 16E e 16F). Apenas a partição com acetato de etila resultou em separação dos interferentes e picos de interesse (5-FU), como mostrado na Figura 16G.

Na Figura 17 observa-se o pico de 5-FU e o pico da timina, usada como PI, eluídos com água acidificada, após extração do 5-FU da pele com água seguida de partição com acetato de etila. O uso de PI é importante para minimizar perdas do processo de extração com o acetato de etila, visto que a área do pico de 5-FU é normalizada pela área do pico do PI. Optou-se pela utilização de timina devido ao tempo de retenção próximo de 10 minutos (ALSARRA & ALARIFI, 2004).

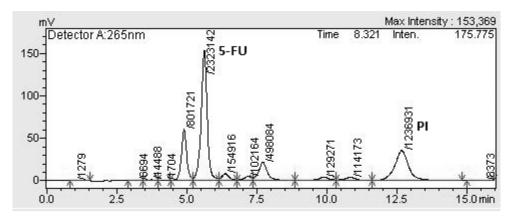


Figura 17. Cromatograma da solução de 5-FU matrizada com pele em água após partição para o acetato de etila e em presença de timina (PI).

O método apresentou-se linear (r=0,999), com precisão e exatidão na faixa de concentração entre 0,3 μg/mL e 6 μg/mL, conforme ilustrado na Figura 18 e Tabela 2. Os valores de CV obtidos tanto nas análises intra-ensaio como nas inter-ensaio foram inferiores a 6,3%, o que está de acordo ao guia para validação de métodos bioanalíticos do FDA (FDA & Food and Drug Administration 2013). Este guia define que valores de CV e exatidão menores de 15% são aceitáveis, sendo que o LOQ pode atingir até 20% de desvio. Os valores de exatidão obtidos variaram entre 93%-108,7% e, portanto, estão de acordo aos guias e recomendações da literatura (FDA & Food and Drug Administration 2013; BARTH et al., 2011).

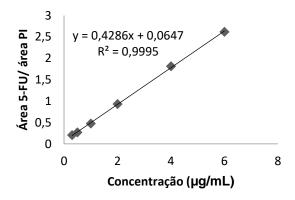


Figura 18. Curva bioanalítica determinada por CLAE para o 5-FU recuperado da pele utilizando partição água/acetato de etila e timina a 2 μg/mL como PI.

Tabela 2. Resultados da precisão e exatidão intra e inter-ensaio para o método por CLAE de quantificação de 5-FU em pele.

Int	Intra-ensaio			ter-ensaio	
Concentração (μg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)	Concentração (μg/mL)	Exatidão (%)	CV (%)
0,3	108,4	0,7	0,3	108,7	0,9
0,5	93,0	6,3	0,5	94,6	2,3
1,0	96,5	3,2	1,0	95,3	1,8
2,0	100,5	1,5	2,0	101,0	0,7
4,0	102,2	0,1	4,0	102,0	0,2
6,0	99,1	0,2	6,0	99,2	0,5

Os valores de recuperação de 5-FU das amostras de pele foram determinados após a extração do fármaco em três diferentes concentrações (0,3 µg/mL; 2 µg/mL e 6 µg/mL) e foram comparados à curva padrão de 5-FU matrizada (Tabela 3). Os valores de recuperação obtidos apresentaram-se na faixa de 95-110% e são considerados satisfatórios para a recuperação de amostras de pele (PRAÇA et al., 2011; FDA & Food and Drug Administration 2013).

Tabela 3. Valores de recuperação de 5-FU proveniente de amostras de pele de orelha de suínos

Recuperação				
Concentração %				
(μg/mL)	90			
0,3	109,9 ± 12,5			
2,0	$95,9 \pm 2,5$			
6,0	95,5 ± 1,0			

De acordo às normas vigentes, amostras recuperadas de tecidos biológicos devem ser testadas quanto à sua estabilidade nas condições que serão expostas. Dessa forma, optou-se por avaliar a estabilidade de 5-FU extraído de amostras de pele após três ciclos de congelamento e descongelamento, visando mimetizar as condições máximas as quais estas amostras seriam submetidas em caso de necessidade de estocagem. Os resultados (Tabela 4) para as seis concentrações testadas foram comparados às amostras recém preparadas e indicaram variação

máxima de 1%, o que demonstra a elevada estabilidade das amostras na condição testada, visto que valores de até 15% são considerados aceitáveis pelas normas vigentes (ANVISA, Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012.).

Tabela 4. Estabilidade das amostras de 5-FU da curva matrizada com presença de PI após três ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento (temperatura ambiente).

Estabilidade				
Concentração	CV (%)			
(μg/mL)	CV (90)			
0,3	1,02			
0,5	1,02			
1,0	0,95			
2,0	1,0			
4,0	0,99			
6,0	1,0			

5.1.2.1 Aplicação do método

Com o objetivo de avaliar a adequada quantificação de 5-FU proveniente de amostras de pele usando o método bioanalítico validado por CLAE optou-se por investigar a retenção cutânea e quantidade de fármaco no compartimento receptor após o tratamento passivo por 24 h com solução ou creme comercial (Efurix®) contendo 5-FU.

A Figura 19 mostra a quantidade de 5-FU recuperada da pele de porco e da solução receptora após 24 h de tratamento *in vitro* com solução e creme, ambos contendo 3,5 mg de 5-FU.

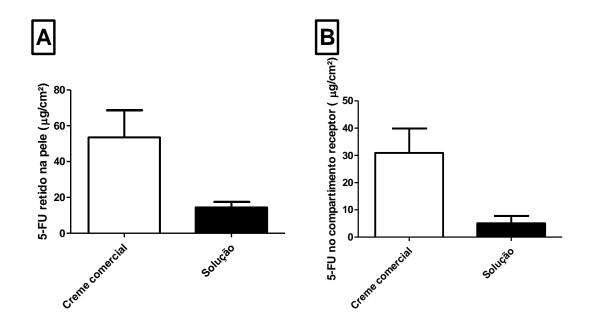


Figura 19: Avaliação da penetração cutânea do 5-FU na pele (A) e através dela (B) a partir de solução e creme comercial contendo 5-FU após 24 h.

O tratamento com o creme aumentou em cerca de 3 vezes a quantidade de 5-FU retida na pele e cerca de 4 vezes a quantidade que atravessou a pele (no compartimento receptor) quando comparado ao tratamento com a solução de 5-FU (Figura 19).

A formulação comercial é uma emulsão do tipo óleo em água. Em geral, emulsões são capazes de aumentar a penetração cutânea de fármacos quando comparadas a soluções e suspensões (SAKATA et al., 2014). O creme comercial possui em sua composição promotores de absorção tais como o álcool estearílico (álcool graxo de cadeia longa) e o propilenoglicol (éster), capazes de melhorar a penetração cutânea por diferentes mecanismos.

O mecanismo envolvido no aumento de penetração cutânea causado pelo propilenoglicol não está totalmente esclarecido, mas pode estar relacionado à desidratação cutânea e a incorporação do propilenoglicol nas extremidades das cabeças polares dos lipídeos e este pode ter efeito sinérgico quando combinado a outros promotores de absorção (OSTRENGA et al., 1971; BOUWSTRA et al., 1991; WILLIAMS & BARRY, 2004; LANE et al., 2013). O álcool de cadeia longa é capaz de desorganizar o estrato córneo, favorecendo a penetração cutânea (LANE et al., 2013). Por exemplo, Andega et al (2001) testaram uma variedade de álcoois graxos de cadeia

longa e seu efeito na permeabilidade cutânea (pele de porco e humana) do fármaco modelo melatonina. Foi observada uma relação parabólica entre o comprimento da cadeia carbônica saturada do álcool graxo e o aumento da penetração cutânea.

Em nossos experimentos o método de quantificação validado por CLAE permitiu analisar o 5-FU na pele e no compartimento receptor, diferenciando a quantidade que penetrou a partir de diferentes formulações e, portanto, é adequado para as demais quantificações deste trabalho.

5.2 Desenvolvimento e caracterização de lipossomas contendo 5-FU

O fármaco 5-FU tem sido usado na terapia de uma variedade de tumores sólidos. Devido ao curto tempo de meia vida plasmático, altas doses são necessárias em administração semanal, o que induz toxicidade gastrointestinal e mielotoxicidade (KAISER et al., 2003). Ademais, a alta hidrofilicidade reduz sua eficácia *in vivo* devido ao baixo *uptake* celular, o que é usual para pequenas moléculas hidrofílicas e representa uma desvantagem (ELOY et al. 2014). Sendo assim, a administração tópica de 5-FU pode reduzir os efeitos colaterais sistêmicos e aumentar a adesão do paciente ao tratamento. No entanto, sistemas de liberação são necessários para melhorar a biodisponibilidade e a penetração cutânea devido à alta hidrofilicidade do fármaco.

A característica hidrofílica do 5-FU e sua baixa massa molecular (MM= 130,08 g/mol) tornam difícil a encapsulação deste fármaco no compartimento aquoso de lipossomas (THOMAS et al, 2011). Dessa forma, a encapsulação passiva de 5-FU é relatada na literatura como sendo entre 2-6%, dependendo da composição lipídica do lipossoma (ÖZER et al., 1992; FRESTA et al., 1993). Outro problema é o rápido extravasamento do 5-FU de lipossomas após a remoção do fármaco não encapsulado (ÖZER et al., 1992; FRESTA et al., 1993; ELORZA et al., 1993), o que limita o tempo de estocagem de lipossomas convencionais.

Com o objetivo de encapsular 5-FU em lipossomas com porcentagem de encapsulação maior do que a relatada na literatura e estabilidade, diferentes composições lipídicas foram investigadas. A entrega de fármacos encapsulados em lipossomas para as células está ligada à capacidade das vesículas lipídicas interagirem com estas. Sendo assim, existem diferentes formas de interação, tais como absorção, troca lipídica, fusão e endocitose (FRESTA et al., 1993).

Considerando que nem todas estas formas de interação asseguram a entrega do fármaco para as células, optou-se por estudar o SPC como lipídeo devido à elevada biocompatibilidade com as membranas celulares. Porém, a baixa temperatura de transição (Tc= -20 a -30°C) proporciona a formação de vesículas mais flexíveis, o que poderia prejudicar a encapsulação de 5-FU e a estabilidade dos lipossomas. Desta forma, optou-se por avaliar também os fosfolipídeos DPPC e DSPC, porém com maior cadeia hidrocarbônica, que causam um aumento da temperatura de transição e maior rigidez das vesículas (DPPC Tc= 41°C e DSPC Tc= 55°C). Visando a aplicação biológica, optou-se pela adição de Col, capaz de assegurar a estabilidade coloidal dos lipossomas e reduzir a perda de fármacos hidrofílicos, como o 5-FU (MANOJLOVIC et al., 2008; GLAVAS-DODOV et al., 2005).

SPC:Col, DPPC:Col e DSPC:Col foram combinadas na proporção 55:45, com razão fármaco lipídeo 0,2 baseado em estudos prévios de THOMAS et al. (2011). Os resultados de tamanho de partícula/ polidispersividade (PdI), potencial zeta e porcentagem de encapsulação foram mostrados na Tabela 5.

Tabela 5.	Efeito da composição, razão fármaco/lipídeo e métodos de preparo no
tamanho, p	tencial zeta e porcentagem de encapsulação de 5-FU.

Composição	Técnica de preparo	Razão fármaco/lipídeo	Tamanho (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)	% encapsulação
	Hidratação do filme	0,2	$133,5\pm4,2$	$0,\!306\pm0,\!03$	$-10,01 \pm 0,40$	0%
SPC:Col Ci	Ciclos Congelamento/ descongelamento	0,2	129,1 ± 5,4	$0,212 \pm 0,09$	$-6,57 \pm 0,15$	0%
	Hidratação do filme	0,2	$117,8 \pm 2,7$	$0,\!374\pm0,\!04$	$-10,25 \pm 0,77$	0%
DPPC:Col	Ciclos Congelamento/ descongelamento	0,2	$103,9 \pm 2,5$	$0,\!280 \pm 0,\!06$	-9,78 ± 1,01	4,9 ± 0,4%
	Hidratação do filme	0,2	$143,2 \pm 3,8$	$0,\!207\pm0,\!02$	$-13,60 \pm 1,41$	$4.8\pm0.7\%$
	Hidratação do filme	0,1	143,4 ±11,4	$0,276 \pm 0,08$	$-1,07 \pm 0,47$	49,9± 2,1%
	Ciclos Congelamento/ descongelamento	0,2	$162,4 \pm 3,2$	$0,231 \pm 0,08$	-7,77 ± 1,03	$7,7\pm0,5\%$
DSPC:Col		1	$151,2 \pm 2,6$	$0,\!254\pm0,\!09$	$11{,}20\pm0{,}42$	$17,9\pm3,2\%$
	Encapsulação ativa Cu:PEI	0,5	$151\pm1,5$	$0,\!251 \pm 0,\!04$	$7,\!25\pm0,\!30$	$17,\!4\pm1,\!6\%$
		0,2	$148,9 \hspace{0.1cm} \pm \hspace{0.1cm} 1,\hspace{0.1cm} 0$	$0,\!260\pm0,\!03$	$12,25 \pm 0,35$	$17,2\pm5,8\%$
	Evaporação de fase	0,2	139,4 ± 3,4	$0,201 \pm 0,08$	*	$31,5 \pm 0,2\%$
	reversa	0,1	127,2 ± 2,2	$0,\!206\pm0,\!05$	*	43,4 ± 5,9%

^{*} Houve separação de fases após 24 h, o que impediu as medidas do potencial zeta destes lipossomas.

A primeira série de lipossomas foi produzida usando o método clássico da hidratação do filme lipídico e o método de ciclos de congelamento e descongelamento. As composições SPC:Col, DPPC:Col e DSPC:Col resultaram respectivamente em 0%, 0% e 4,8±0.7% de 5-FU encapsulado, usando o método clássico da hidratação do filme lipídico (Tabela 5). Um pequeno aumento na porcentagem de encapsulação de 5-FU foi observado quando os ciclos de congelamento e descongelamento foram utilizados. O uso de ciclos repetidos de congelamento e descongelamento produz o rompimento das vesículas lipossomais devido a formação de cristais que rompem as lamelas das vesículas e consequentemente aumentam a razão fármaco hidrofílico-lipídeo, resultando em maior porcentagem de encapsulação (CASTILE et al., 1999).

Em seguida, o método da encapsulação ativa por gradiente usando Cu:PEI proposto por THOMAS et al. (2011) que baseia-se nas interações eletrostáticas entre PEI e 5-FU e a evaporação de fase reversa (ELORZA et al., 1993) foram testados, ambos considerados métodos para aumento da porcentagem de encapsulação de fármacos hidrofílicos. Obteve-se 17% de encapsulação para o 5-FU quando o método da encapsulação por Cu:PEI foi utilizado e alterações na razão fármaco/lipídeo não

resultaram em melhores porcentagens. Além disso, a evaporação de fase reversa aumentou a porcentagem de encapsulação de 5-FU de 31,5 para 43,4% quando as razões de fármaco/lipídeo 0,2 e 0,1 foram usadas, respectivamente, o que demonstra a importância da razão fármaco/ lipídeo para o aumento da porcentagem de 5-FU encapsulado usando esta técnica. Por fim, quando a razão de 0,1 foi testada para o método clássico da hidratação do filme lipídico, a porcentagem de encapsulação alcançou cerca de 50%, um valor considerado alto para um fármaco hidrofílico. Portanto, devido à facilidade de preparo, ausência de solventes orgânicos residuais e alta porcentagem de encapsulação, os lipossomas para os demais estudos foram preparados usando DSPC:Col pelo método da hidratação do filme lipídico, com razão de 0,1 de fármaco para lipídeos.

Dentre as possíveis aplicações, o uso de lipossomas como sistemas de liberação é capaz de aumentar a penetração cutânea de fármacos. Um dos primeiros estudos da influência do uso de lipossomas na penetração cutânea de fármacos, realizado por MEZEI e GULASEKHARAM (1980), demonstrou que a aplicação tópica de lipossomas de triamcinolona acetonida resultou em concentrações do fármaco na epiderme e derme quatro vezes maiores do que a observada com a pomada controle, além de reduzida excreção urinária, o que indica que a aplicação tópica de lipossomas é capaz de melhorar a penetração cutânea local e reduzir a absorção percutânea, consequentemente reduzindo os efeitos colaterais (EGBARIA et al., 1990). Em outro estudo, VERMA et al. (2003) relacionaram o tamanho dos lipossomas e o grau de polidispersividade com a penetração cutânea. Os autores demonstraram que lipossomas menores que 120 nm e com PdI 0,3 eram capazes de atingir camadas mais profundas da pele; seis vezes mais do que lipossomas maiores, embora lipossomas menores que 377 nm se acumulassem no estrato córneo em concentrações semelhantes. Os lipossomas desenvolvidos em nosso trabalho apresentaram tamanho menor que 165 nm/0,3 PdI, o que indica o seu potencial para a veiculação de 5-FU na pele.

Com relação ao potencial zeta, todos os lipossomas apresentaram carga negativa ou neutra, com exceção daqueles obtidos pelo método da encapsulação ativa usando Cu:PEI, devido ao potencial zeta positivo do PEI. Sabe-se que partículas com potencial zeta acima de |30|mV são consideradas estáveis devido à repulsão entre as partículas (CHEN et al., 2012).

A Tabela 6 apresenta os resultados dos estudos de estabilidade da formulação lipossomal de DSPC:Col escolhida. O tamanho de partícula e a porcentagem de encapsulação foram mantidos durante os 30 dias de avaliação, demonstrando a estabilidade dos lipossomas a 4°C quando separados da fração livre imediatamente antes das quantificações. Não houve diferença estatística na porcentagem de encapsulação e tamanho dos lipossomas (P>0.05, teste de Kruskal- Wallis e pós-teste de Dunn).

Tabela 6. Avaliação da estabilidade dos lipossomas compostos por DSPC:Col (55:45), na razão fármaco/lipídeo 0,1 por 30 dias, armazenadas a 4°C.

Dias após o preparo	Tamanho (nm)	PdI	% encapsulação 5-FU
0	143,4±11,4	$0,\!276\pm0,\!08$	49,9±2,1%
7	137,8±14,6	$0,\!364\pm0,\!12$	52,2±3,9%
15	137,1±0,4	$0,327 \pm 0,04$	45,6±2,9
30	153,6±6,01	$0,\!326\pm0,\!10$	44,4±3,3

Considerando a necessidade de uma âncora para a ligação covalente de cetuximabe na superfície dos lipossomas, o lipídeo DSPE-PEG-NH₂ foi adicionado às formulações contendo DSPC:Col visando avaliar a influência da peguilação nos parâmetros físico-químicos, mas, principalmente, na porcentagem de encapsulação de 5-FU. A Tabela 7 contém os resultados de tamanho de partícula, PdI, potencial zeta e eficiência de encapsulação para lipossomas contendo 5-FU encapsulado, peguilados ou não.

Tabela 7. Comparação de lipossomas não peguilados e peguilados com relação ao
tamanho de partícula, PdI, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

Lipossomas	Tamanho (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)	% encapsulação 5- FU
Branco	142,3±8,6	$0,252\pm0,09$	-4,44±0,18	-
5-FU	143,4±11,4	$0,\!276\pm0,\!08$	$-1,07\pm0,47$	49,9±2,1]
Branco peguilado	147,7±9,3	$0,351\pm0,18$	$0,47{\pm}1,09$	*
5-FU peguilado	131,4±7,8	$0,361\pm0,16$	$0,47\pm0,38$	44,5±5,0 J

^{*} Não houve diferença estatística entre lipossomas convencionais e peguilados para o tamanho, polidispersividade e porcentagem de encapsulação pelo teste de Kruskal- Wallis e pós-teste de Dunn, P>0,05.

A adição da âncora de PEG nos lipossomas não causou aumento do tamanho de partícula ou PdI e porcentagem de encapsulação como mostrado na Tabela 7 (teste de Kruskal- Wallis e pós-teste de Dunn, P>0,05).

5.3 Desenvolvimento e caracterização de imunolipossomas

Em estudos prévios (PAN et al., 2007), uma âncora baseada em Col foi usada para o acoplamento de cetuximabe na superficie dos lipossomas. Apesar do baixo custo de uma âncora de Col comparada ao DSPE-PEG, a etapa de síntese pode ser um problema para produção em larga escala. Assim, DSPE-PEG-Mal é comumente utilizado nesta função e o uso da âncora DSPE com um braço espaçador longo de PEG faz com que o anticorpo fique ligado mais distante da bicamada lipídica e previne o baixo rendimento de acoplamento do anticorpo ao receptor presente nas células causado pelo raio de hidratação do PEG (NOBS et al., 2004).

Para conjugar o cetuximabe ao DSPE-PEG-Mal foi necessário tiolar o anticorpo. O cetuximabe tiolado pode ser facilmente conjugado ao DSPE-PEG-Mal pela formação de uma ligação tiol-éter entre o grupamento tiol do anticorpo e o grupamento Mal. Esta ligação não é facilmente hidrolisada *in vivo*, o que mantém a ligação do anticorpo nos imunolipossomas (YANG et al., 2007).

O cetuximabe tiolado pela reação com Traut, purificado em coluna PD-10, é diretamente acoplado aos lipossomas, como descrito na metodologia. Os lipossomas

conjugados com o cetuximabe foram então purificados usando uma coluna CL-4B, cujo cromatograma está apresentado nas Figuras 20 A e B para os imunolipossomas e imunolipossomas contendo 5-FU, respectivamente.

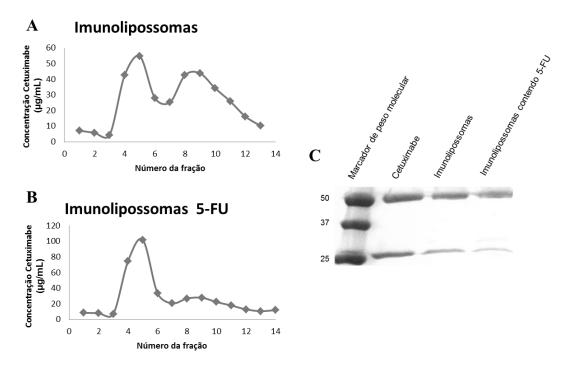


Figura 20. A e B) Cromatogramas dos imunolipossomas e dos imunolipossomas contendo 5-FU, respectivamente após eluição em coluna CL-4B com tampão PBS-EDTA 5 mM, pH 8, obtidos por leitura em espectrofotômetro em 562 nm e C) Eletroforese em gel SDS-Page para cetuximabe livre, em imunolipossomas e em imunolipossomas contendo 5-FU.

A análise espectrofotomética de lipossomas mostra que eles absorvem em 400 nm (MADY, DARWISH 2010). Pode-se observar na Figura 20 A e B que a maior parte do cetuximabe está presente nas frações 4-6, onde os lipossomas estão presentes, conforme constatado pela absorção no comprimento de onda de 400 nm. O 5-FU livre está presente nas frações 10-14, conforme monitorado pela absorvância na região do UV, em 265 nm e o cetuximabe não conjugado está presente nas frações 8-13, conforme quantificado pelo método do BCA.

Com base nos cromatogramas apresentados na Figura 20 e na concentração de cetuximabe presente nos lipossomas, pode-se concluir que o cetuximabe foi conjugado à superfície dos lipossomas com eficiência de 59,4% e 94,5% para os imunolipossomas (Figura 20 A) e imunolipossomas contendo 5-FU (Figura 20 B),

respectivamente. O aumento da eficiência de conjugação do cetuximabe no imunolipossoma contendo o fármaco pode ser justificado pela melhora potencial da organização das bicamadas lipídicas quando o 5-FU é acomodado no interior da cavidade hidrofílica do lipossoma.

O protocolo de conjugação do anticorpo gerando imunolipossomas não alterou a integridade primária do anticorpo, como representado pelas bandas observadas na eletroforese em gel de SDS-Page observadas na Figura 20C. Sob condições redutoras, duas bandas em 50 kDa e 25 kDa podem ser observadas e correspondem a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo, respectivamente, o que está em acordo com estudos prévios usando anticorpos da classe IgG (YANG et al., 2007; PETRILLI et al., 2016).

A Tabela 8 contém os resultados da caracterização dos imunolipossomas.

Tabela 8. Caracterização de imunolipossomas contendo ou não 5-FU.

Lipossomas	Tamanho (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)	% encapsulação 5-FU	% de acoplamento
Imunolipossomas	174,7±1,3	0,343±0,10	-11,7±0,56	-	59,4
Imunolipossomas contendo 5-FU	164,6±5,7	$0,404\pm0,10$	-9,1±1,1	40,8±1,8	94,5

Os imunolipossomas tiveram um aumento de aproximadamente 30 nm no diâmetro quando comparados aos lipossomas (140 nm para 170 nm, Tabelas 7 e 8), devido possivelmente à camada adicional de anticorpo na sua superfície. O potencial zeta também foi alterado de -1 mV para -9 mV, o que foi estatisticamente significativo (Teste T student, P<0,05). A porcentagem de encapsulação de 5-FU não foi estatisticamente distinta entre os lipossomas convencionais, lipossomas peguilados e imunolipossomas (Tabela 7 e 8, P>0,05, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

5.3.1 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As imagens de TEM (Figuras 21 A e B) apresentam estruturas características de lipossomas, pela presença de bicamada com espaço interno, mantendo integridade estrutural, conforme relatado em estudos prévios usando lipossomas (HADIAN et al., 2014; ZHANG et al., 2016). As estruturas são vesículas unilamelares com diâmetro entre 100-200 nm, o que está de acordo aos estudos de espalhamento dinâmico da luz.

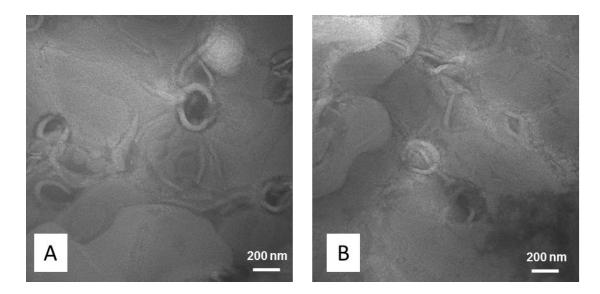


Figura 21. A) Lipossomas visualizados em TEM e B) Imunolipossomas visualizados em TEM, ambos com contrastação negativa usando acetato de uranila, aceleração de 100 kV e aumento de 200000 vezes.

5.4 Avaliação *in vitro* em linhagem de carcinoma celular escamoso de pele humana (A431) EGFR positiva

5.4.1 Citotoxicidade

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade do 5-FU e do cetuximabe na ausência (em solução) e presença dos lipossomas, forma utilizadas células tumorais de SCC da linhagem A431, que são EGFR positivas (SU et al., 2013; PARK et al., 2009). Os tratamentos foram realizados por períodos de 72 h e 120 h, de acordo com os protocolos de LU et al., 2010. Estes resultados estão representados na Figura 22.

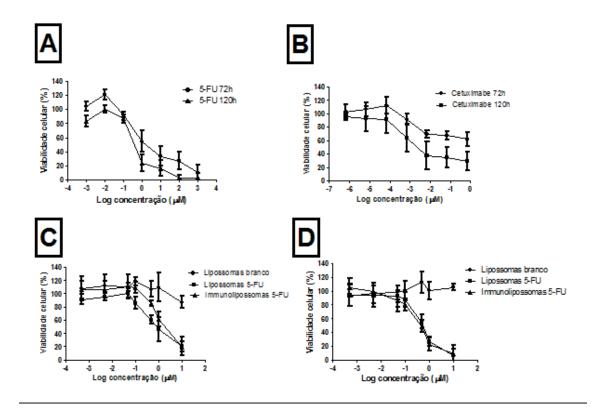


Figura 22. Viabilidade celular em linhagem A431: A) solução de 5-FU; B) solução de cetuximabe; C) lipossomas branco, lipossomas 5-FU e imunolipossomas após 72 h de tratamento e D) lipossomas branco, lipossomas 5-FU e imunolipossomas após 120 h de tratamento.

A Tabela 9 apresenta os valores de IC50 obtidos para a linhagem A431 tratada por 72 h e 120 h com as soluções de 5-FU e cetuximabe, lipossomas e imunolipossomas contendo ou não 5-FU.

Tabela 9. Valores de IC50 obtidos para as diferentes formulações após 72 h ou 120 h de incubação em linhagem A431.

Amostra	5-FU IC50 (µM) em função do tempo de incubação		Cetuximabe IC50 (nM) em função do tempo de incubação	
	72 (h)	120 (h)	72 (h)	120 (h)
Solução 5-FU	5,8	0,7	-	-
Solução cetuximabe	-	-	*	7,2
Lipossomas 5-FU	1,1	0,6	-	-
Imunolipossomas	-	-	67,1	24,6
Imunolipossomas 5- FU	2,2	0,6	8,5	1,8

^{*}IC50 não foi atingido.

A Tabela 10 mostra o índice de combinação (CI), calculado de acordo com a Equação VII, resultante da associação do 5-FU com o cetuximabe em solução e no lipossoma.

Tabela 10. Índice de combinação (CI) para a associação cetuximabe e 5-FU em solução e em lipossoma após 120 h de tratamento.

Cetuximabe/5-FU	CI
Solução	0,24
Imunolipossomas	0,87

Em todas as situações (Figura 22), o tratamento por um período mais longo (120 h) foi capaz de reduzir a viabilidade celular, principalmente para a solução de 5-FU e cetuximabe, o que indica citotoxicidade tempo dependente. O 5-FU em solução resultou em valor de IC50 de 5,8 μM, o que está de acordo com trabalhos anteriores (LEE et al., 2010). O tratamento com a solução de cetuximabe por 72 h não foi capaz de atingir o IC50, por outro lado, após 120 h de tratamento o IC50 obtido foi de 7,2 nM (Tabela 9, Figura 22B). A combinação do 5-FU com o cetuximabe em solução apresentou um efeito sinérgico, como pode ser observado na Tabela 10 pelo CI menor do que 1.

Já o tratamento com os lipossomas mostrou que o lipossoma branco não foi citotóxico em nenhum dos tempos de tratamento avaliados e resultou em viabilidade celular superior a 80% (Figura 22C e D). A encapsulação do 5-FU a esses lipossomas reduziu em 5 vezes o IC50 do 5-FU quando comparado ao fármaco em solução após 72 h (Tabela 9). Após 120 h essa redução não foi tão elevada. A maior redução no IC50 do 5-FU quando encapsulado no lipossoma, principalmente em menores tempos de tratamento, pode ser explicada pelo maior *uptake* celular do fármaco altamente hidrofílico quando incorporado na dispersão lipossomal (ELOY et al., 2014).

O lipossoma também aumentou a citotoxicidade do cetuximabe: a sua conjugação a superfície do lipossoma, originando o imunolipossoma, permitiu a determinação do IC50 do cetuximabe mesmo após 72 h de tratamento (Figura 22 e Tabela 9). Após 120 h, o IC50 foi reduzido quase 3 vezes; de 67,1 nM para 24,6 nM (Tabela 9). Estes resultados demonstram que o cetuximabe permaneceu ativo após a conjugação e teve sua citotoxicidade aumentada após 72 h de incubação, quando comparado à solução, visto que o cetuximabe em solução não atingiu IC50 após 72 h de tratamento (Tabela 9). A encapsulação do 5-FU no imunolipossoma também apresentou sinergismo (IC50 < 1, Tabela 10). Mais especificamente, houve queda de aproximadamente 3,5 vezes no valor do IC50 para o cetuximabe dos imunolipossomas contendo 5-FU (cerca de 2 nM) comparado à solução de cetuximabe (7,2 nM).

5.4.2 Microscopia confocal

O sinergismo apresentado pela combinação imunolipossoma/5-FU pode estar relacionado ao maior *uptake* celular desses imunolipossomas pelas células A431, que superexpressam o receptor EGFR. Para verificar esta hipótese, lipossomas e imunolipossomas foram preparados com Dio, que é uma substância fluorescente lipofílica que interage com a bicamada lipídica de lipossomas (MORTESEN et al., 2013). O Dio é, portanto, um marcador de lipossomas. As células, por sua vez, foram marcadas com DAPI, que é um marcador fluorescente com alta afinidade pelo núcleo celular e que emite fluorescência em comprimento de onda diferente do Dio. Desta forma, foi possível verificar o *uptake* celular dos lipossomas por microscopia confocal observando a localização da fluorescência dos lipossomas e das células após diferentes períodos de tratamento (3, 6 e 24 h).

As Figuras 23, 24 e 25 mostram imagens das células A431 tratadas com Dio e DAPI após 3, 6 e 24 h de tratamento, respectivamente, com os lipossomas e com os imunolipossomas. Não foi observada fluorescência relativa ao Dio após os tratamentos de 3 e 6 h, conforme ilustrado nas Figuras 23 e 24. Mortesen et al (2013) demonstrou a internalização de imunolipossomas de cetuximabe após 2 h de tratamento. Porém os lipossomas eram compostos por SPC, cuja fluidez é maior do que a dos lipossomas compostos por DSPC devido à menor temperatura de transição do SPC (t=-20 a -30 °C), o que facilita o rápido *uptake* destes lipossomas.

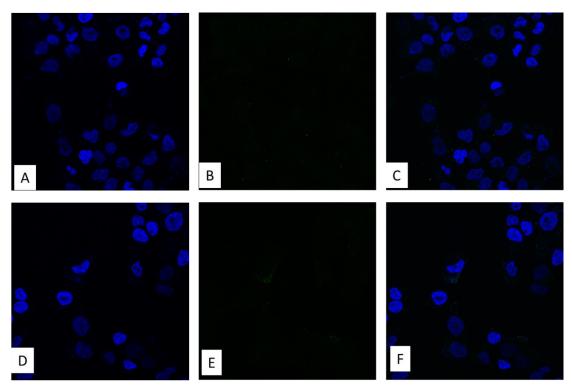


Figura 23. Internalização pelas células A431 após 3 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

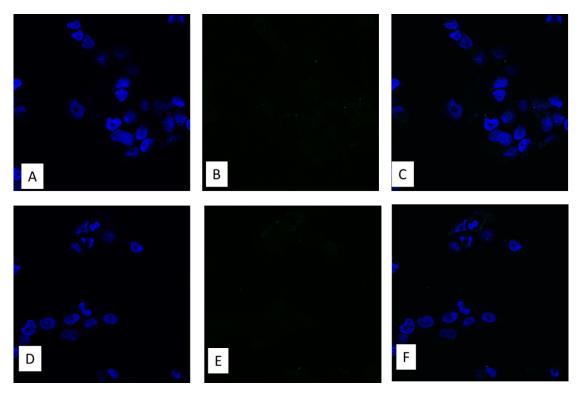


Figura 24. Internalização pelas células A431 após 6 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Neste trabalho, o DSPC foi utilizado visto que sua maior temperatura de transição (t=55 °C) é capaz de proporcionar vesículas mais rígidas, que por sua vez tem efeito positivo na encapsulação de fármacos hidrofílicos, como o 5-FU (ELOY et al., 2014; LI et al., 2015). Desta forma, optou-se por aumentar o tempo de tratamento para 24 h e observou-se intensa fluorescência verde, correspondente ao Dio, referente ao tratamento com os imunolipossomas no citoplasma das células (Figura 25).

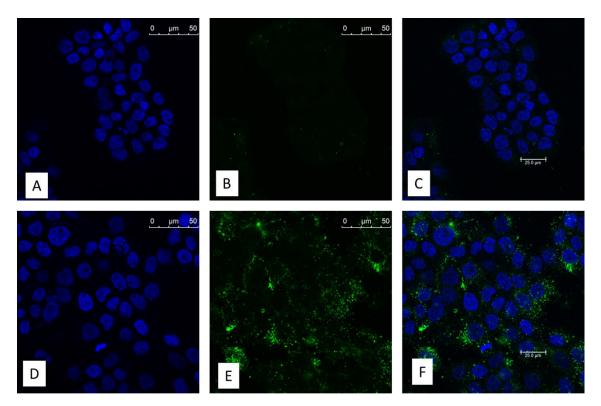


Figura 25. Internalização pelas células A431 após 24 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Pode-se observar na Figura 25 que o tratamento com o lipossoma (Figura 25 B) resultou em intensidade de fluorescência marcadamente inferior ao tratamento com o imunolipossoma (Figura 25 E). O tempo de 24 h de tratamento também foi utilizado nos estudos de Veldman et al. (2005) para lipossomas contendo doxorrubicina funcionalizados com *N*-octanoil-glicosilceramida. Os lipossomas deste estudo eram compostos por uma mistura lipídica contendo DPPC, Col e DSPE-PEG-2000. O DPPC tem características mais semelhantes ao DSPC do que o SPC, por possuir temperatura de transição alta (t=41 °C), porém com cadeias carbônicas diferentes (C16 para o DPPC e C18 para o DSPC) (ELOY et al., 2014; LI et al., 2015).

5.4.3 Citometria de fluxo

O tempo de 24 h de tratamento foi escolhido para os estudos de citometria de fluxo dos lipossomas e imunolipossomas. Nos gráficos de citometria de fluxo (Figuras 26 A, B, C) os quadrantes Q1 e Q2 representam células marcadas com iodeto de propídeo (mortas), sem e com marcação por Dio, respectivamente. Os quadrantes Q3 e Q4 representam células sem iodeto de propídeo (vivas), sem e com marcação respectivamente, por Dio, ou seja, sem е com uptake lipossomas/imunolipossomas. Conforme ilustrado na Figura 26, não foi observada marcação positiva para Dio (Q2 e Q4) para o controle de células sem tratamento (Figura 26 A), enquanto que este foi observado para os lipossomas (Figura 26 B) em menor extensão do que para os imunolipossomas (Figura 26 C). Este resultado era esperado visto que as células A431 superexpressam o receptor EGFR, que se liga ao anticorpo anti-EGFR cetuximabe, mediando a internalização dos imunolipossomas. Tais resultados foram consistentes com aqueles observados em microscopia confocal e já foram observados para diferentes linhagens celulares em estudos prévios (PAN et al., 2007; MORTESEN et al., 2013).

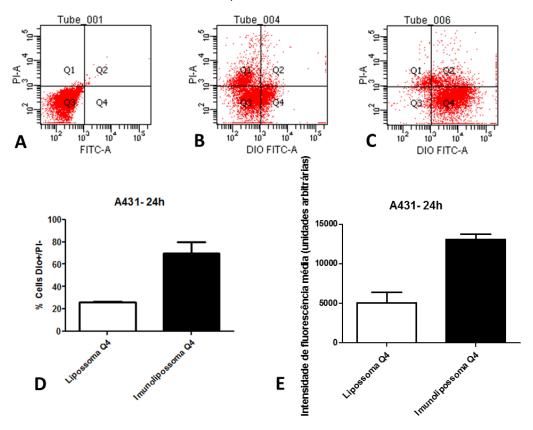


Figura 26: Gráficos de citometria de fluxo obtidos para A) Controle sem tratamento; B) Lipossomas; C) Imunolipossomas; Em D e E, Q4 representa as células vivas (sem

marcação de iodeto de propídeo) e marcadas com Dio, sendo que D expressa os resultados em número de células e E representa intensidade de fluorescência.

Na Figura 26 D e 26 E observa-se que o uso de imunolipossomas foi capaz de aumentar cerca de 3,5 vezes a quantidade de células marcadas com Dio e negativas para iodeto de propídeo, ou seja, células que permaneceram vivas após o tratamento e continham a nanoestrutura. Com relação à intensidade de fluorescência, também foi observado diferença significativa entre lipossomas/ imunolipossomas, com aumento de cerca de 3 vezes na intensidade de fluorescência quando as células foram tratadas com os imunolipossomas. Assim como observado nos estudos de Limasale et al. (2015) observam-se nos histogramas de pontos (Figura 26) que a população de células avança para a direita na linhagem EGFR positiva tratada com os imunolipossomas.

O maior *uptake* dos imunolipossomas pelas células A431 é interessante para a aplicação tópica destes, visto que o 5-FU encapsulado nos lipossomas poderá ser entregue em maiores concentrações para as células tumorais quando os tumores forem tratados com os imunolipossomas.

5.5 Avaliação do *uptake* celular de lipossomas e imunolipossomas em linhagem EGFR negativa (B16F10)

5.5.1 Microscopia confocal

Lipossomas e imunolipossomas foram preparados com Dio, assim como foi realizado para os estudos de microscopia confocal e citometria de fluxo na linhagem EGFR positiva. Com o objetivo de confirmar que a resposta obtida foi causada pela presença de receptores do tipo EGF na superfície das células, optou-se por avaliar também o *uptake* de lipossomas e imunolipossomas em linhagem EGFR negativa (B16F10) (Figura 27). A linhagem B16F10 é proveniente de melanoma de pele murino, cuja ausência de expressão do receptor em questão já foi relatada na literatura (SU et al., 2013)

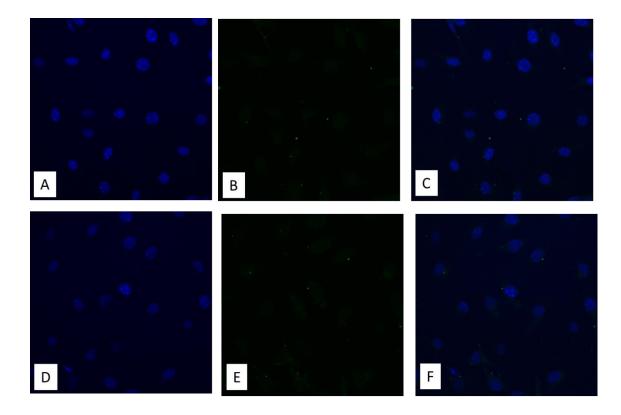


Figura 27. Internalização pelas células B16F10 (EGFR negativas) após 24 h de tratamento. Em A, B, C para lipossomas e D, E e F para imunolipossomas. As imagens A e D apresentam a fluorescência referente ao DAPI (marcador do núcleo celular), em B e E a fluorescência de Dio e em C e F a sobreposição das imagens dos canais do azul e verde. Aumento de 63 vezes foi usado e os mesmos parâmetros de intensidade do laser foram empregados.

Na Figura 27 estão representadas as imagens das células B16F10 tratadas com lipossomas e imunolipossomas por 24 h. Não foi observada diferença na intensidade de fluorescência relativa ao Dio para lipossomas e imunolipossomas após os tratamentos nesta linhagem EGFR negativa.

Os resultados obtidos estão de acordo ao estudo de Limasale et al. (2015). Naquela ocasião os autores investigaram o efeito de imunolipossomas específicos para EGFR contendo celecoxibe encapsulado em uma linhagem EGFR positiva (MDA-MB-468) e uma linhagem EGFR negativa (SW620). Os autores demonstraram o aumento do *uptake* para imunolipossomas na linhagem EGFR positiva, comparado aos lipossomas. De maneira similar aos resultados do presente trabalho, Limasale et al (2015) observou intensidade de fluorescência mínima para o *uptake* de lipossomas e imunolipossomas na linhagem EGFR negativa testada.

5.5.2 Citometria de fluxo

Com o intuito de confirmar e obter mais dados dos resultados de *uptake* celular, da mesma forma que para as células A431, foram avaliados o *uptake* em linhagem EGFR negativa B16F10 usando citometria de fluxo, após 24 h de tratamento (Figura 28).

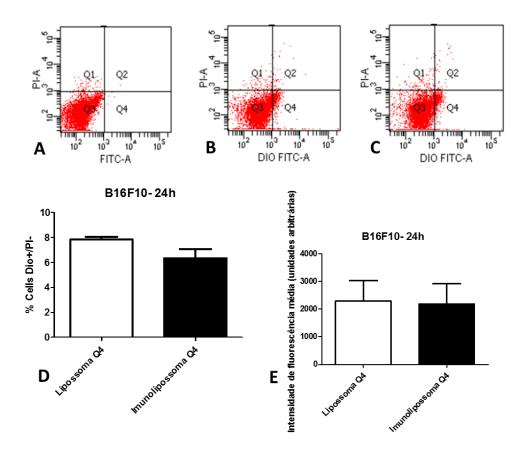


Figura 28: Gráficos de citometria de fluxo obtidos para a linhagem B16F10 (EGFR negativa) sendo A) Controle sem tratamento; B) Lipossomas; C) Imunolipossomas; Em D e E Q4 representa as células vivas (sem marcação de iodeto de propídeo) e marcadas com Dio (marcador dos lipossomas/imunolipossomas, sendo que em D os resultados estão expressos como número de células e em E expressos como intensidade de fluorescência).

Conforme esperado, não foi observada marcação positiva para Dio para as células controle sem tratamento (Figura 28A, Q2 e Q4). Além disso, observa-se que a população de células tratadas com os lipossomas, representada nos histogramas 28B e 28C, não se desloca para a direita na presença dos imunolipossomas, o que é

esperado para uma linhagem EGFR negativa. Além disso, observou-se que a porcentagem de *uptake* mostrada na Figura 28D foi mínima (cerca de 6% *vs* cerca de 75% de internalização para os imunolipossomas na linhagem EGFR positiva, Figuras 28D e 26D, respectivamente) e equivalente para lipossomas e imunolipossomas, o que demonstra que não houve qualquer melhora no *uptake* devido à presença do anticorpo na superfície dos imunolipossomas nesta linhagem celular. Além disso, a intensidade de fluorescência de Dio permaneceu baixa para lipossomas e imunolipossomas (cerca de 2500 unidades arbitrárias *vs* cerca de 13000 unidades arbitrárias para os imunolipossomas em linhagem EGFR positiva, Figuras 28E e 26E, respectivamente).

5.6 Avaliação da liberação in vitro

Sistemas de liberação capazes de sustentar a liberação de fármacos têm recebido atenção na indústria farmacêutica devido a vantagens comparado aos sistemas convencionais, tais como prolongar a ação do fármaco, reduzir efeitos adversos e também pela possibilidade de redução do número de administrações (CHUNG et al., 2009). No caso do 5-FU, um fármaco de característica hidrofílica, é esperado que haja extravasamento do fármaco encapsulado no lipossoma após a remoção do fármaco não encapsulado devido a alteração no equilíbrio entre concentração de fármaco dentro e fora da vesícula (ÖZER et al., 1992; FRESTA et al., 1993; ELORZA et al., 1993). Sendo assim, optou-se por avaliar a liberação de 5-FU nos lipossomas e imunolipossomas totais, que continham 50% de fármaco livre, como descrito na caracterização dos sistemas (Tabela 5).

Na Figura 29, observam-se as curvas de liberação de 5-FU dos lipossomas comparadas à solução de 5-FU. Cerca de 85% do fármaco foi liberado nas primeiras 4 horas de estudo para os lipossomas e cerca de 90% para os imunolipossomas. Esta relativamente rápida velocidade de liberação está provavelmente relacionada à alterações no equilíbrio 5-FU encapsulado/5-FU livre quando o lipossoma é colocado em excesso de meio aquoso, como acontece no estudo de liberação. Sendo assim, a diluição do conteúdo de 5-FU livre acarreta na saída do fármaco encapsulado para o meio externo, de forma a equilibrar as concentrações de 5-FU dentro e fora da vesícula. Estes resultados estão de acordo a estudos prévios usando lipossomas e também outros sistemas de liberação (ELORZA et al., 1993; KAISER et al., 2003;

THOMAS et al., 2011; CLARES et al., 2013; ASHWANIKUMAR et al., 2014). Elorza et al (1993) avaliaram a liberação de 5-FU a partir de lipossomas formados por esfingomielina ou DSPC e observaram liberação de cerca de 80% do conteúdo em 60 min. Em um estudo mais recente, foi observado tempo de meia-vida de 4,5 h (cerca de 9 h para liberação de 80%) para liberação de 5-FU de lipossomas compostos por HSPC/Col 75/25 (mol/mol) após 9 h de estudo, seguindo-se a cinética de Higuchi (KAISER et al., 2003). Um resultado semelhante, ou seja, reportando a liberação de cerca de 80% do conteúdo após 10 h de estudo, foi obtida para magnetolipossomas compostos por Fe₃O₄:PC (3:4 massa/massa) preparados também pelo método clássico da hidratação do filme lipídico (CLARES et al., 2013). Lipossomas usando a mesma composição utilizada neste trabalho e encapsulação por método passivo (hidratação do filme lipídico) apresentaram liberação de cerca de 95% do seu conteúdo após 4 h de estudo (THOMAS et al., 2011). Em um outro estudo, houve liberação de cerca de 80% do 5-FU encapsulado em nanomicelas de ácido poliláctico co-glicolíco (PLGA) e polietilenimina após cerca de 8 h de estudo.

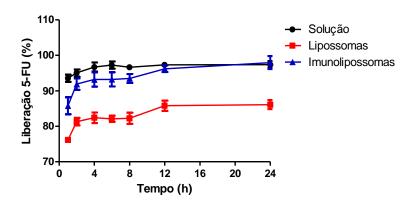


Figura 29: Curvas de liberação de 5-FU (%) em função do tempo a partir da solução, lipossomas e imunolipossomas usando o dispositivo Amicon (50 kDa) para separação da fração livre e encapsulada.

Para determinar a cinética de liberação do 5-FU dos lipossomas, foram testados 3 modelos cinéticos diferentes: ordem zero, primeira ordem e Higuchi. Obteve-se uma relação linear para os lipossomas e imunolipossomas quando a quantidade de 5-FU liberada foi plotada em função da raiz quadrada do tempo (Y= 11,403x+592,65, r=0,900; Y=13,511x+669,06, r=0,970, para lipossomas e

imunolipossomas, respectivamente). Isto indica que o modelo de Higuchi pode ser usado para descrever a cinética de liberação do 5-FU. O modelo de Higuchi foi o primeiro modelo matemático usado para descrever a liberação de fármacos de sistemas matriciais. Quando o experimento de liberação é realizado adequadamente, em condições de *sink*, a cinética de Higuchi sugere que a quantidade inicial de fármacos de uma matriz (lipossoma) é muito maior que a solubilidade do fármaco e que a difusão do mesmo acontece em uma dimensão, com taxa de difusão constante (DASH et al., 2010).

O estudo de liberação do 5-FU dos lipossomas deve ser considerado como uma etapa de caracterização do sistema de liberação. Ele é útil, por exemplo, para o controle de qualidade das formulações. A rápida liberação do 5-FU nestes estudos não deve ser relacionada, no entanto, a uma rápida penetração do fármaco na pele. Também não se pode inferir que, uma vez aplicado na pele, o 5-FU será liberado rapidamente do lipossoma. Isto porque na administração cutânea, diferente da administração por via endovenosa, o sistema de liberação não é colocado em contato com excesso de meio aquoso. Desta forma, a velocidade de liberação do fármaco do lipossoma depende da velocidade de penetração do fármaco livre na pele. Os estudos de penetração cutânea do 5-FU a partir dos sistemas de liberação desenvolvidos estão apresentados nos próximos itens.

5.7 Estudo in vitro de penetração cutânea

A pele de porco foi escolhida para ser utilizada como modelo de membrana nos estudos *in vitro* devido a sua similaridade fisiológica a pele humana (BARBERO, FRASCH, 2009). O estrato córneo, por exemplo, principal barreira a penetração cutânea de substâncias, apresenta espessura semelhante ao estrato córneo humano. Para verificar a influência dos lipossomas na penetração cutânea do 5-FU, na ausência e presença da iontoforese, o 5-FU foi avaliado, após 6 h de experimento, em diferentes estratos: estrato córneo, epiderme viável (onde os tumores cutâneos se encontram) e solução receptora (correspondente a circulação sistêmica).

A Figura 30 mostra a quantidade de 5-FU acumulada na epiderme viável e na solução receptora. Nesta etapa, optou-se por comparar soluções de diferentes concentrações de 5-FU (130 μg/mL e 500 μg/mL), visando escolher aquela que pudesse ser quantificada de forma precisa e exata nos estratos da pele.

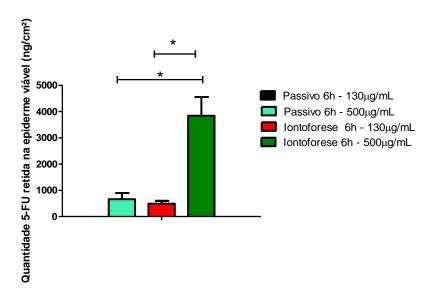


Figura 30: Quantidade de 5-FU retida na epiderme viável para soluções de 5-FU nas concentrações de 130 μg/mL e 500 μg/mL após experimento de penetração passiva ou iontoforese por 6 h. Teste estatístico One-way ANOVA com pós teste de Tukey * (p<0,05).

Na Figura 30, observa-se que foi possível quantificar 5-FU na epiderme viável após 6 h da administração passiva e iontoforética quando 500 μg/mL do fármaco foram usados na solução doadora. O mesmo não foi observado para a penetração passiva a partir da solução que continha 130 μg/mL de 5-FU, a qual ficou abaixo do limite de quantificação do método analítico. A quantificação na solução receptora (2404±508 ng/mL) só foi possível após 6 h de tratamento usando iontoforese para a solução mais concentrada de 5-FU. Desta forma, optou-se por realizar os demais experimentos com formulações contendo 500 μg/mL de 5-FU de forma a aliar uma quantificação consistente na pele com uma dose passível de ser incorporada nas dispersões lipossomais.

Merino et al (1999) estudou a contribuição do fluxo (J) eletromigratório e eletrosmótico para soluções de 5-FU em diferentes pHs comparado à penetração passiva. Naquela ocasião foi observado que em pH 7,4, no qual o fármaco se encontra 25% ionizado (pH do nosso trabalho), a contribuição da iontoforese anódica e catódica, determinadas por iontoforese reversa, foram semelhantes, de aproximadamente 145 nmol/cm²/h (19 μg/cm²/h) a partir de uma solução a 50 mM (6,5 mg/mL). Considerando-se esta informação e baseando-se no fato do potencial zeta dos lipossomas/imunolipossomas deste trabalho estar próximo a neutralidade, optou-

se por estudar apenas a influência da iontoforese anódica nas formulações e não a da catódica.

Pode-se observar na Figura 30 que a iontoforese aumentou cerca de 8 vezes a quantidade de 5-FU que penetrou na epiderme viável. Ainda, o aumento da concentração de 5-FU de 130 µg/mL para 500 µg/mL aumentou proporcionalmente a quantidade de fármaco que permeou a pele por iontoforese, sendo este aumento de aproximadamente 4 vezes.

A Tabela 11 mostra a quantidade de 5-FU que permeou o estrato córneo e que ficou acumulada na epiderme viável após diferentes tempos de iontoforese a partir da solução de 5-FU a 500 µg/mL.

Tabela 11. Permeação e retenção do 5-FU na pele em função do tempo de iontoforese a partir da solução de 5-FU a 500 μg/mL

Tempo (h)	5-FU (ng/cm²)		
	Estrato córneo	Epiderme viável	Solução receptora
1	*	976 ± 102	*
6	*	3840 ± 710	2404 ± 508

^{*} Abaixo do limite de quantificação do método analítico

Pode-se observar na Tabela 11 que é possível modular a quantidade de fármaco que acumula na epiderme viável sem alterar a intensidade da corrente elétrica, apenas aumentando o tempo de aplicação da iontoforese. Ou seja, a quantidade de 5-FU que penetra na pele é proporcional ao tempo de experimento (Tabela 11) e a concentração de fármaco no doador (Figura 30). Apenas 1 h de iontoforese foi capaz de acumular na epiderme viável uma quantidade de 5-FU equivalente aquela obtida após 6 h de experimento passivo (Figura 30).

Estes resultados estão em concordância com trabalhos anteriores que avaliaram o efeito do uso da iontoforese para o aumento da penetração cutânea de 5-FU (MERINO et al., 1999; FANG et al., 2004). Fang et al (2004) avaliaram o efeito do uso de iontoforese, combinado ou não à eletroporação, em pele intacta ou na ausência de barreira (estrato córneo) para verificar o aumento da permeação de 5-FU através da pele. Os autores observaram que não houve penetração cutânea significativa de

soluções de 5-FU, usadas na concentração de 3000 µg/mL através da pele (quantificação no compartimento receptor) quando a permeação pelo método passivo foi avaliada após 6 h. Segundo os autores, isso se deve à baixa partição de 5-FU hidrofílico para a matriz da pele lipofílica, o que resulta em baixas taxas de permeação de 5-FU. Neste mesmo trabalho, o uso da iontoforese foi capaz de aumentar significativamente a permeação de 5-FU, o que está em concordância com nossos resultados.

Na Figura 31 estão representadas as quantidades de 5-FU acumuladas na epiderme viável e na solução receptora após 6 h de experimentos de permeação passiva e iontoforética dos lipossomas e dos imunolipossomas contendo 5-FU a 500 µg/mL.

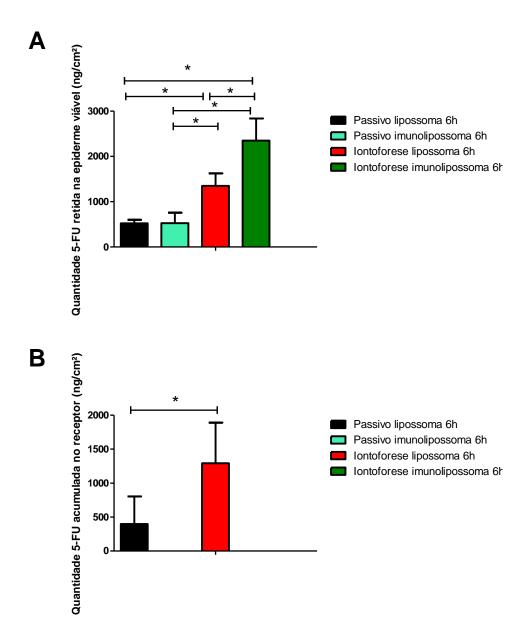


Figura 31: Quantidade de 5-FU retida na epiderme viável (A) e acumulada no compartimento receptor (B) para lipossomas e imunolipossomas de 5-FU na concentração de 500 μg/mL após experimento de penetração passiva ou iontoforese por 6 h. A quantidade de 5-FU obtida no estrato córneo não pôde ser quantificada pelo método analítico utilizado (abaixo do LOQ). Teste estatístico One-way ANOVA com pós teste de Tukey, sendo a significância estatística estabelecida como p < 0,05 (*).

Em 6 h de experimento, a encapsulação de 5-FU no lipossoma diminui de 660 \pm 240 ng/mL para 524 \pm 76 ng/mL (1,2 vezes) a penetração passiva e de 3840 \pm 710 ng/mL para 1351 \pm 276 ng/mL (2,8 vezes) a penetração iontoforética do 5-FU na

epiderme viável. Esta redução na penetração teve consequência na permeação. Isto é, a quantidade de 5-FU na solução receptora também foi menor a partir dos lipossomas (Figura 31) quando comparado com o fármaco em solução (Tabela 11). Esta menor quantidade de fármaco na solução receptora é interessante para se diminuir efeitos tóxicos, uma vez que os tumores cutâneos estão geralmente localizados na epiderme viável.

A menor quantidade de fármaco na epiderme viável resultante da encapsulação não era esperada, uma vez que os lipossomas são sistemas de liberação conhecidos facilitar a penetração de fármacos hidrofílicos para a (CHAROENPUTTAKUN et al., 2015). Mas nossos resultados podem ser explicados pela alta estabilidade e provável rigidez dos lipossomas desenvolvidos, que são compostos por DSPC de alta temperatura de transição e estabilizados pela presença de colesterol (ESSA et al., 2004). Também reforçam a ideia de que o mecanismo pelo qual os lipossomas convencionais aumentam a penetração cutânea de fármacos está relacionado à fusão dos lipossomas na superfície da pele (ABRAHAM & DOWNING, 1990). Lipossomas mais rígidos e estáveis devem ter mais dificuldade para fundir na superfície da pele, aumentando o seu controle sobre a velocidade de liberação do fármaco. Mais especificamente, se o lipossoma funde no estrato córneo, deixa de ser o elemento controlador da liberação do fármaco, passando esta função para a mistura de lipídeos do estrato córneo. Nossos resultados indicam que lipossomas mais rígidos, como os desenvolvidos neste trabalho, parecem não fundir rapidamente quando em contato com o estrato córneo.

O uso de lipossomas, porém, possui finalidades muito mais abrangentes do que apenas o aumento da penetração cutânea *in vitro*. As vantagens do uso de nanocarreadores incluem a redução de efeitos colaterais, melhora do índice terapêutico e adesão do paciente ao tratamento, quando administrado por via sistêmica (ELOY et al., 2014). Deve-se considerar também que na via tópica, a aplicação *in vivo* se concentra na área do tumor, enquanto que em estudos *in vitro* a pele empregada está saudável. No SCC, queratinócitos atípicos estão presentes em todas as camadas da epiderme, podendo haver também queratinização defeituosa, citoplasma com vacúolos e núcleos presentes nas células do estrato córneo (HAQUE et al., 2015). O tumor, portanto, altera as características da pele, fazendo com que as nanopartículas se acumulem com mais facilidade no interstício tumoral do que o fármaco livre, o qual é mais facilmente degradado. O interstício tumoral, portanto,

permite um maior efeito de permeabilidade e retenção (EPR), com possibilidade de acumular partículas de até 2000 nm (ELOY et al., 2014; MORTESEN et al., 2013). Além disso, a presença do anticorpo na superfície dos imunolipossomas facilita o *uptake* celular, conforme demonstrado nos estudos de microscopia confocal e citometria de fluxo.

Ainda, a irritação cutânea relacionada ao 5-FU é uma preocupação, porque reduz a adesão do paciente ao tratamento, e está relacionada a alta absorção percutânea do fármaco (GUPTA, 2002; WERSCHLER, 2008). Loven et al (2002) compararam a eficácia e tolerabilidade de cremes de 5-FU 0,5% e 5% aplicados topicamente em um estudo randomizado com pacientes que apresentavam seis ou mais lesões de queratose actínica. Os pacientes foram tratados durante 4 semanas com o creme de 0,5% (aplicado 1 vez ao dia) e 5% (aplicado 2 vezes ao dia) em lados opostos da face. Os autores observaram a redução das lesões de 11,3 para 2,5 e 10,3 para 4,2 para o creme na concentração de 0,5% e 5%, respectivamente, o que foi estatisticamente significativo (p=0.044). Os dois tratamentos demonstraram perfis similares de irritação cutânea observada pelos pesquisadores, porém os pacientes tratados com o creme de 0,5% reportaram menos intensidade desses sintomas. Os autores relacionam estes resultados com a absorção transcutânea do 5-FU, inferindo que a absorção mais extensa do creme com maior concentração de 5-FU diminui sua tolerância pelos pacientes (LEVY et al., 2001). No estudo de Levy et al (2001), os autores compararam formulações contendo 0,5% de 5-FU em microesferas e em creme comercial a 5% quanto ao fluxo e absorção percutânea em pele humana de cadáver. O fluxo para o creme comercial a 5% foi de 20-40 vezes maior do que as microesferas a 0,5%, o que sugere a exposição sistêmica após a aplicação do creme comercial de alta concentração.

A Figura 31 A mostra que não houve diferença estatística entre a quantidade de 5-FU retida na epiderme viável para lipossomas e imunolipossomas com tratamento passivo (p=0,49). Isso se deve ao tamanho semelhante de lipossomas (143,4 ±11,4 nm) e imunolipossomas (164,6 ± 5,7 nm), o que está de acordo com estudos de VERMA et al. (2003) que relacionaram o tamanho dos lipossomas e o grau de polidispersividade com a penetração cutânea.

O uso combinado de imunolipossomas e iontoforese foi capaz de aumentar a quantidade de 5-FU retida na epiderme viável (p< 0,05) e evitar a permeação para o compartimento receptor, quando comparado ao uso de lipossomas com iontoforese.

Isso se deve à presença de receptores para cetuximabe na epiderme viável, que causam a acumulação de imunolipossomas nesta camada da pele e impedem a passagem destes para o compartimento receptor. Esta hipótese se baseia na presença de EGFR nas camadas da epiderme viável e sua ausência no estrato córneo, o que explica a não detecção de 5-FU no estrato córneo (GUSTERSON & HUNTER, 2009). Não foram encontrados trabalhos na literatura com o uso de imunolipossomas aplicados topicamente, corroborando o ineditismo deste trabalho, porém foi encontrado pedido de patente para o uso de imunoconjugados de fotossensibilizadores cuja aplicação tópica foi sugerida (PCT/US2004/006985).

A quantificação de fármacos nos diferentes estratos da pele pode ser aliada a medida de resistividade do estrato córneo para se entender melhor a influência da aplicação da iontoforese na pele. A resistividade elétrica é um indicador do estado estrutural do estrato córneo (TANG et al., 2001). Reduções neste parâmetro sugerem uma maior permeabilidade da pele ou alterações em sua estrutura, capazes de facilitar a penetração cutânea de fármacos. A Figura 32 mostra as alterações na resistividade da pele causadas após aplicação passiva e iontoforética da solução de 5-FU, dos lipossomas e imunolipossomas contendo o fármaco.

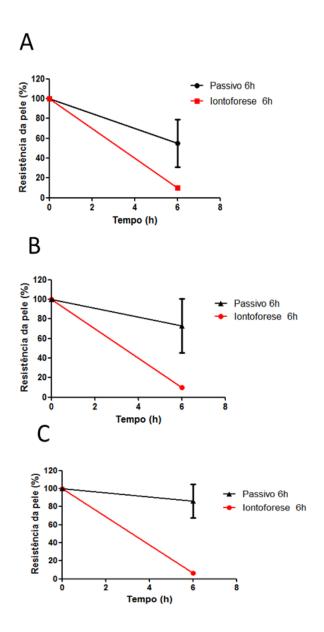


Figura 32: Resistência das peles ao final dos experimentos usando soluções de 5-FU na concentração de 500 μg/mL após experimento de penetração passiva ou iontoforese por 6 h para A) solução, B) lipossomas e C) imunolipossomas.

A aplicação passiva da solução de 5-FU reduziu a resistividade da pele em 40%, enquanto a administração passiva do lipossoma alterou este parâmetro em apenas 10-15% (Figura 32). Este resultado sugere que os lipídeos do lipossoma entram em alguma extensão no estrato córneo e recompõem alterações em sua estrutura causadas pelo acúmulo do 5-FU. Sabe-se que o 5-FU é irritante para a pele, o que limita sua aplicação tópica no tratamento de lesões de pele, cancerosas ou não (GUPTA et al., 2002; WERSCHELER et al., 2008). Desta forma, a encapsulação do

5-FU no lipossoma ou imunolipossoma pode reduzir essa irritação.

Na iontoforese, por outro lado, o transporte de moléculas ocorre principalmente pelos anexos cutâneos, tais como folículos pilosos e glândulas sudoríparas, que atuam como vias alternativas de baixa resistência ao transporte de moléculas exógenas (GRATIERI et al., 2008). Além disso, pode haver transporte de íons através da via intercelular visto que a resistência do estrato córneo é reduzida quando este é submetido a corrente elétrica de baixa intensidade da iontoforese. Esta queda pode ocorrer devido à formação de poros aquosos, ou seja, regiões polares na lamela lipídica (BARRY 2002). Isso explica a queda da resistividade da pele em cerca de 90% após o uso da iontoforese, ilustrada na Figura 32, na presença ou ausência dos lipossomas.

A via folicular e apêndices são consideradas as principais vias de penetração de fármacos com o uso de iontoforese, devido a reduzida resistência à passagem da corrente elétrica. Os folículos pilosos são uma invaginação da epiderme que se estendem para as camadas profundas da derme, sendo uma área de potencial absorção de fármacos (GELFUSO et al., 2015; HUBER et al., 2015).

A Figura 33 mostra a quantidade de 5-FU retida no folículo pilosos após 6 h de iontoforese da aplicação cutânea da solução, do lipossoma e do imunolipossoma de 5-FU. Como se pode observar na Figura 33A, não houve diferença estatística para quantidade de 5-FU no folículo para as três formulações estudadas. Porém, a quantidade de 5-FU analisada nos folículos pilosos foi de aproximadamente 500 ng/cm², o que corresponde a cerca de 13%, 37% e 21% da quantidade de 5-FU retida na epiderme viável para a solução, lipossomas e imunolipossomas de 5-FU, respectivamente (Figura 33B). Desta forma, nota-se que o sistema de liberação contribuiu para o direcionamento da retenção do fármaco para os folículos pilosos após a aplicação da iontoforese.

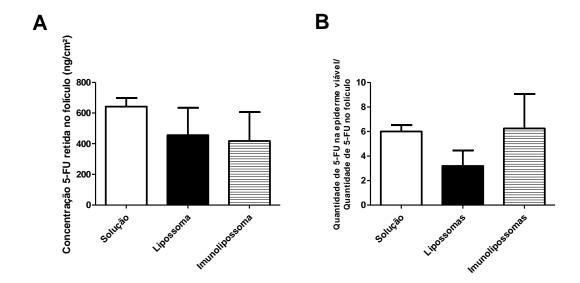


Figura 33: 5-FU nos folículos pilosos após aplicação da iontoforese (0,5 mA/cm² por 6 h) usando soluções, lipossomas e imunolipossomas de 5-FU na concentração de 500 μg/mL. A) Concentração de 5-FU no folículo (p=0,40, Teste estatístico one-way ANOVA). B) Relação entre a quantidade de 5-FU na epiderme viável e no folículo.

5.8 Estudo in vivo em modelo xenográfico de SCC

O uso de modelos animais (Figura 34) tem como finalidade entender a fisiopatologia do câncer, incluindo a identificação de novos alvos terapêuticos, que podem ser usados associados à quimioterápicos convencionais ou moléculas direcionadoras (*targeting*) (RUGGERI et al., 2014). Os estudos *in vitro* de penetração cutânea não levam em consideração a massa tumoral, que pode dificultar a entrada do fármaco e sua consequente captura pelas células tumorais.

No estudo *in vivo* foram empregadas células A431 de carcinoma celular escamoso de pele, frequentemente usadas na literatura para avaliação da eficácia de formulações em modelo xenográfico (SKVORTSOVA et al., 2010; ZUCO et al., 2010). O modelo xenográfico se caracteriza pela implantação de células tumorais humanas em camundongos imunossuprimidos pela via subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular e, portanto, são bastante representativos de tumores humanos (RUGGERI et al., 2014). Os animais utilizados para implante das células tumorais foram camundongos Swiss *nude*, que não possuem timo ou o possuem como timo rudimentar e, portanto, apresentam deficiência de imunidade celular por linfócitos-T, tolerando a integração de heterotransplantes.

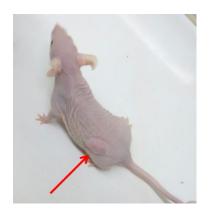


Figura 34: Modelo xenografico com células A431 injetadas subcutaneamente em camundongos *Swiss nude*. Imagem do tumor desenvolvido no animal 12 dias após a injeção, medindo aproximadamente 100 mm³.

Para avaliar a influência das formulações desenvolvidas no *uptake* pelas células tumorais *in vivo*, elas foram administradas por duas vias de administração diferentes: subcutânea e tópica. Devido aos melhores resultados de penetração cutânea do 5-FU com o auxílio da iontoforese em relação a penetração passiva (Figuras 30 e 31), a administração tópica foi aplicada em associação com a iontoforese.

5.8.1. Tratamento do SCC por via subcutânea

A administração subcutânea das formulações foi realizada como sugerido por Misak et al (2013). Por esta via, optou-se pela dose de 10 mg/kg de 5-FU baseado em estudos prévios que demonstraram que doses mais elevadas causaram perda de massa corpórea de até 20% nos animais, enquanto que doses de 10 mg/kg foram consideradas a quantidade máxima tolerada e com eficácia terapêutica para o tratamento de outros tipos de carcinoma celular escamoso (THOMAS et al., 2011; AMAGASE et al., 1989; CODACCI-PISANELLI et al., 1995; TIAN et al., 2012).

Os resultados obtidos com relação ao volume tumoral dos grupos tratados por injeção subcutânea das formulações estão mostrados na Figura 35. Os volumes tumorais observados ao final do estudo foram de 970±460 mm³, 859±302 mm³, 806±217 mm³ e 364±273 mm³ para os grupos PBS (controle negativo), solução de 5-FU, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma contendo 5-FU, respectivamente. Foi observada diferença estatística (p<0,05) para os imunolipossomas comparados ao controle negativo e a solução de 5-FU a partir de 15 dias de tratamento. Também

observou-se diferença estatística entre lipossomas e imunolipossomas (p<0,05) a partir de 18 dias de tratamento.

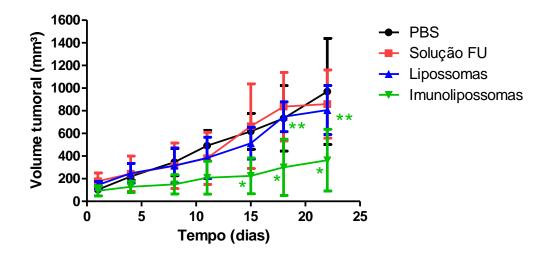


Figura 35: Volumes tumorais de células A431 injetadas em camundongos *Swiss nude* obtidos com o tratamento por injeção subcutânea de PBS (controle negativo), solução 5-FU, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU. As doses utilizadas foram 10 mg/kg de 5-FU e 20 μg de cetuximabe por μmol de lipídeo, aplicadas subcutaneamente a cada 3-4 dias no total de 6 doses. Teste estatístico twoway ANOVA com pós-teste de Bonferroni indicado no texto (* p<0,05 imunolipossomas vs. PBS e solução de 5-FU; ** p<0,05 imunolipossomas vs. lipossoma).

Imunolipossomas anti-EGFR preparados usando fragmentos Fab de cetuximab (IMC-C225) e ligados covalentemente a lipossomas contendo doxorrubicina, epirubicina e vinorelbina também mostraram resultados superiores aos apresentados por lipossomas convencionais quando administrados por via endovenosa (MAMOT et al., 2005). Não foram encontrados na literatura trabalhos semelhantes ao nosso que estudaram a administração subcutânea de imunolipossomas para tratamento de tumores sólidos, o que, mais uma vez, denota a inovação do presente trabalho.

As fotografias dos tumores removidos por biópsia ao final do estudo de administração das formulações por via subcutânea estão apresentadas na Figura 36. Vale notar que houve morte de um animal do grupo PBS (Grupo I) durante o estudo.

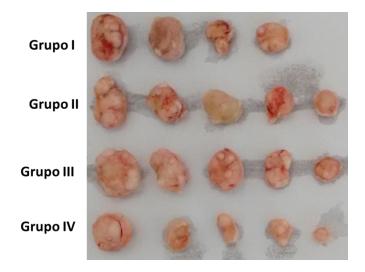


Figura 36: Fotografia dos tumores, após biópsia, ao final do tratamento por via subcutânea com PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV).

A massa corpórea dos animais foi acompanhada durante o estudo, visando avaliar possíveis efeitos tóxicos da aplicação das formulações (Figura 37). Não foi possível observar diferenças na massa corpórea dos animais ao longo do estudo, o que está de acordo com observações prévias de que a dose de 5-FU utilizada (10 mg/kg) não é capaz de causar perda de peso nos animais (CODACCI-PISANELLI et al., 1995).

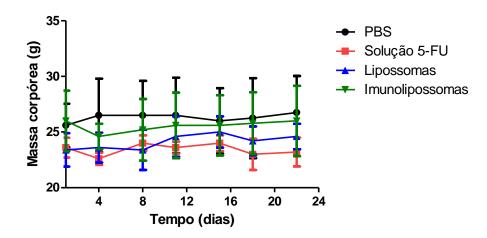


Figura 37: Massa corporal dos camundongos durante o estudo *in vivo* com tratamento subcutâneo de formulações contendo 10 mg/kg de 5-FU administradas a cada 3-4 dias num total de 6 doses.

A avaliação histológica dos tumores foi feita por coloração com hematoxilinaeosina e com anticorpo anti Ki-67. Na Figura 38 estão representadas as imagens após coloração com HE. Não houve alterações fenotípicas nos tumores para os diferentes grupos avaliados. As setas vermelhas indicam presença de mitoses. Os tumores apresentaram aspecto pouco diferenciado.

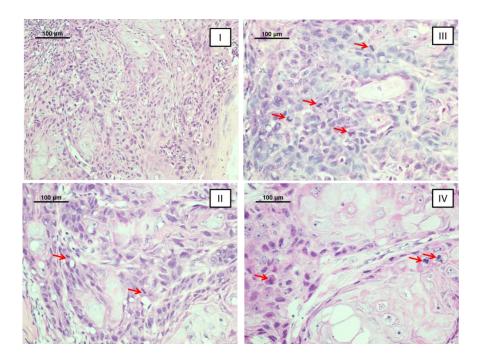


Figura 38: Imagens representativas de cortes histológicos dos grupos PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV) corados com hematoxilina-eosina. As setas vermelhas indicam a presença de mitoses.

A determinação do índice mitótico por coloração com HE não tem se mostrado tão eficiente quanto o uso do anticorpo anti Ki-67 (DUREGON et al., 2014). A expressão da proteína anti Ki-67 está estritamente associada à proliferação celular. Na intérfase, o antígeno pode ser detectado exclusivamente no núcleo, enquanto que na mitose a maior parte da proteína está na superfície dos cromossomos. Pelo fato da proteína Ki-67 estar presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S e G2), mas ausente no período G0, ela é um excelente marcador de porcentagem de crescimento de uma determinada população e, portanto, relaciona-se ao curso clínico da doença (SCHOLZEN & GERDES, 2000).

A marcação com o anticorpo anti Ki-67 foi então utilizada como ferramenta para avaliar o prognóstico/ índice de proliferação dos tumores extraídos dos grupos estudados (Figura 39).

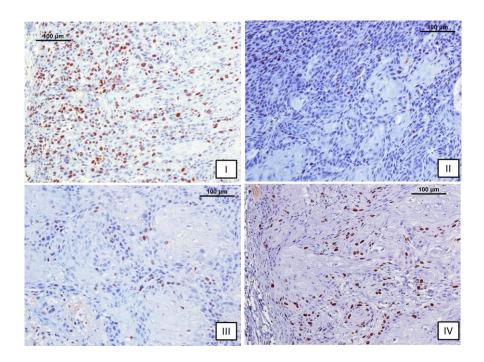


Figura 39: Imagens representativas de cortes histológicos corados com anticorpo anti Ki-67 dos grupos PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV) com aumento de 200X. Os núcleos castanhos indicam a presença de proliferação celular.

Foi realizada a contagem de 500 células para a determinação da porcentagem de Ki-67 e os valores de 34,4%, 13,0%, 14,6% e 20,8% foram obtidos para os grupos PBS (I), solução de 5-FU (II), lipossoma contendo 5-FU (III) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (IV), respectivamente (Figura 39). O grupo controle negativo (I) apresenta quantidade de núcleos castanhos marcadamente superior aos grupos tratados com solução de 5-FU (II), lipossomas (III) e imunolipossomas (IV), o que indica que os tratamentos foram capazes não só de reduzir o tamanho dos tumores como também diminuir sua proliferação celular.

5.8.2 Tratamento de SCC por via tópica

O tratamento tópico de lesões pré-cancerosas, como a queratose actínica (WERSCHLER, 2008) e de tumores pouco agressivos, como o carcinoma basocelular

(GROSS et al., 2007) já são uma realidade na clínica com o uso de cremes convencionais de 5-FU disponíveis comercialmente. Por exemplo, a taxa de resposta para as diferentes concentrações do creme de 5-FU (0,5%, 1% e 5%) é usualmente alta, em torno de 87%, conforme descrito em um estudo de meta-análise de 7 estudos usando 5-FU administrado topicamente por 2-4 semanas.

No entanto, para o tratamento de tumores mais agressivos, como o SCC, formulações mais eficazes, que combinem 5-FU e cetuximabe podem ser interessantes para controlar o crescimento de tumores que não podem ser removidos cirurgicamente ou para pacientes que não são candidatos à quimioterapia sistêmica. Neste contexto, a *European Association of Dermato-Oncology* (EADO) e *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (EORTC) recomendam como primeira linha de tratamento de SCC cutâneo a completa remoção dos tumores, com margem mínima de 5 mm para os tumores de baixo risco e para tumores com mais de 6 mm e aspectos patológicos de maior risco, tais como invasão subcutânea, invasão perineural, recorrência e áreas de alto risco, margem de 10 mm (STRATIGOS et al., 2016).

A necessidade de cirurgia com margem de segurança pode gerar problemas morfológicos e funcionais. Por exemplo, em áreas como os lábios, a cirurgia para a remoção do SCC deve abranger uma área suficientemente grande para evitar a recorrência do tumor, o que pode gerar dificuldades para cicatrização da ferida, além de deficiências morfológicas e funcionais, o que sugere a necessidade de cirurgia e posterior tratamento tópico

O tratamento tópico do SCC com quimioterápicos convencionais é inovador e foi pouco explorado até o momento.

Os resultados obtidos com relação ao volume tumoral dos grupos de animais tratados por administração tópica associada a iontoforese das formulações estão mostrados na Figura 40. Os volumes tumorais observados ao final do estudo foram de 1073±512 mm³, 517±485 mm³, 390±217 mm³, 437±353 mm³ e 167±93 mm³ para os grupos controle negativo (não tratado), solução de 5-FU, solução de 5-FU e cetuximabe, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma contendo 5-FU, respectivamente. Foi observada diferença estatística (p<0,05) para a solução de 5-FU e lipossomas, quando comparados ao controle negativo, a partir de 22 dias de tratamento. A solução de 5-FU e cetuximabe apresentou diferença estatística em relação ao controle já a partir de 18 dias de tratamento e o tratamento com o

imunolipossoma foi ainda mais rápido, com regressão do volume tumoral em relação ao controle negativo a partir de 15 dias de tratamento. Desta forma, observa-se que os imunolipossomas foram capazes de reduzir o crescimento tumoral comparado ao controle negativo mais precocemente comparados aos demais tipos de tratamentos. Além disso, observou-se diferença estatística (p<0,05) para os imunolipossomas comparados à solução de 5-FU a partir de 22 dias de tratamento.

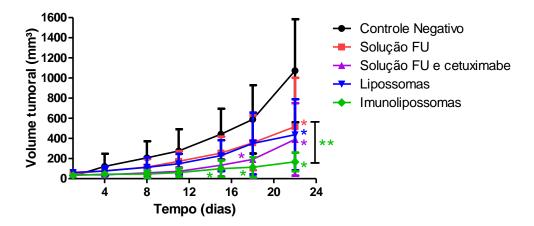


Figura 40: Volumes tumorais de células A431 injetadas em camundongos *Swiss nude* obtidos com o tratamento tópico usando iontoforese com solução 5-FU, solução 5-FU e cetuximabe, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU em relação ao grupo de animais não tratados (controle negativo). As formulações continham 500 μg/mL de 5-FU e 20 μg de cetuximabe por μmol de lipídeo, aplicadas topicamente a cada 3-4 dias no total de 6 doses. Teste estatístico two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni indicado no texto (* p<0,05 vs. PBS, ** solução de 5-FU vs. imunolipossomas).

Ao final do estudo, os animais foram sacrificados e os tumores removidos para análise histológica e imunohistoquímica. Na Figura 41 nota-se de forma bastante evidente o volume tumoral maior para o grupo controle negativo, principalmente quando comparado aos tumores de volumes reduzidos do grupo que recebeu os imunolipossomas. Houve morte de um animal do grupo controle negativo durante o estudo.

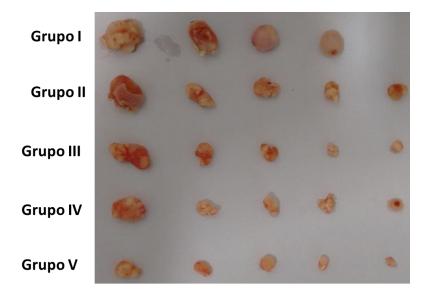


Figura 41: Fotografia dos tumores dos grupos tratados por iontoforese: controle não tratado (I), solução de 5-FU (II), solução de 5-FU e cetuximabe (III), lipossoma contendo 5-FU (IV) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (V), extraídos ao final do estudo (6 doses de tratamentos) após biópsia.

A massa corpórea dos animais foi medida durante todo estudo, visando avaliar possíveis efeitos tóxicos da aplicação das formulações (Figura 42). Não foi observada diferença significativa na massa corpórea dos camundongos ao longo do estudo.

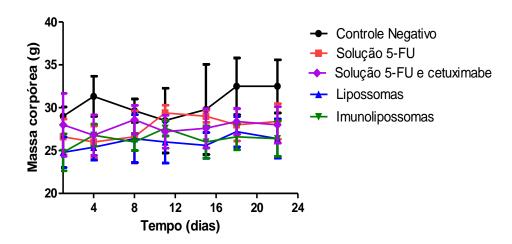


Figura 42: Massa corporal dos camundongos durante o estudo *in vivo* com tratamento tópico com iontoforese de formulações administradas a cada 3-4 dias num total de 6 doses.

De maneira geral, o volume dos tumores não tratados (controle), seja nos grupos submetidos ao tratamento tópico ou subcutâneo, foi de aproximadamente 1000 mm³ ao final do período de tratamento (p>0,05), independentemente do volume inicial. Ao comparar os resultados obtidos pelas duas vias, através de teste estatístico plotando todos os volumes tumorais obtidos ao longo do estudo para as formulações estudadas, houve diferença estatística para a solução de 5-FU e lipossomas administrados pelas duas vias, sendo que o tratamento tópico se mostrou mais eficaz no controle do crescimento tumoral (p< 0,05). Sendo assim, o volume final dos tumores tratados por via tópica foi significativamente menor (p<0,05) do que os tratados por via subcutânea para a solução de 5-FU e para o lipossoma contendo 5-FU. Para o tratamento usando imunolipossomas, porém, não houve diferença estatística no volume final dos tumores tratados por via tópica e subcutânea. Deve-se levar em consideração, no entanto, que o volume do tumor não é o único indicativo de efetividade do tratamento. O aparecimento células mais diferenciadas queratinizadas é característico da diferenciação das células tumorais, o que reduz seu potencial de agressividade, mas elas ocupam um volume que é levado em consideração quando toda a massa de células é medida. Desta forma, a avaliação histológica dos tumores é importante para verificar a presença de células diferenciadas (de menor agressividade) e indiferenciadas (de maior agressividade).

A avaliação histológica dos tumores foi feita por coloração com hematoxilinaeosina e com anticorpo anti Ki-67 (Figuras 43 e 44).

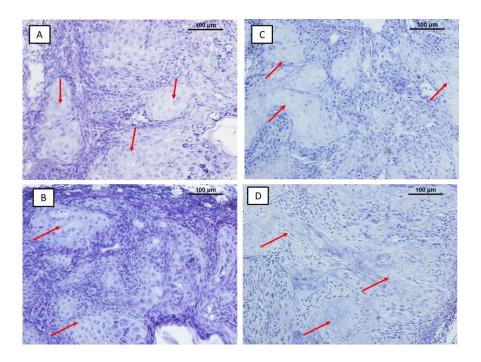


Figura 43: Imagens representativas de cortes histológicos dos grupos tratados topicamente por iontoforese com solução 5-FU (A), solução de 5-FU e cetuximabe (B), lipossoma contendo 5-FU (C) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (D) corados com hematoxilina-eosina com aumento de 200X. As setas vermelhas indicam áreas com queratinização.

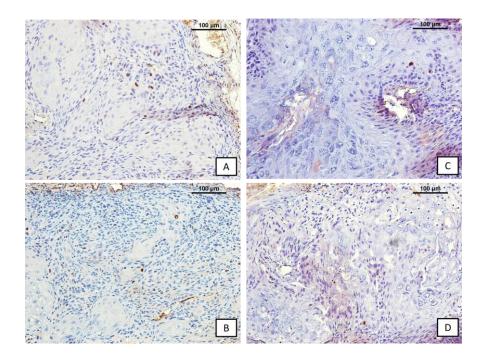


Figura 44: Imagens representativas de cortes histológicos corados com anticorpo anti Ki-67 dos grupos tratados topicamente por iontoforese com solução 5-FU (A), solução

de 5-FU e cetuximabe (B), lipossoma contendo 5-FU (C) e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU (D) com aumento de 200X. Os núcleos castanhos indicam a presença de proliferação celular.

Os tumores tratados topicamente com o uso de iontoforese apresentaram aspecto histológico com diferenciação moderada. Se comparado aos grupos tratados pela via subcutânea (Figura 38), que apresentavam células pouco diferenciadas, o tratamento tópico foi capaz de reduzir a agressividade dos tumores.

O teste imunohistoquímico com ki-67 mostrou valores de 2,2%, 2%, 0,87% e 0,2% de Ki-67, após contagem de 500 células, para os grupos tratados topicamente com solução de 5-FU, solução de 5-FU e cetuximabe, lipossoma contendo 5-FU e imunolipossoma de cetuximabe contendo 5-FU, respectivamente. Todas as porcentagens de ki-67 obtidas com o tratamento tópico foram inferiores às obtidas com o tratamento subcutâneo, o que indica que o tratamento tópico foi mais efetivo para a redução do potencial de proliferação dos tumores.

Neste trabalho, lipossomas contendo 5-FU e imunolipossomas com cetuximabe contendo 5-FU foram desenvolvidos com sucesso. Os sistemas de liberação apresentaram tamanho nanométrico inferior a 180 nm, baixa polidispersividade, eficiência de encapsulação do 5-FU relativamente alta, alta eficiência de conjugação do cetuximabe e estabilidade. Em células A431, o cetuximabe mostrou potencial citotóxico após 120 h de incubação e houve sinergismo quando 5-FU e cetuximabe foram combinados em imunolipossomas. Além disso, o uso de imunolipossomas resultou em maior porcentagem de internalização nas células EGFR positivas do que os lipossomas, mas não em células EGFR negativas. A encapsulação do 5-FU nos lipossomas diminuiu a penetração do fármaco através da pele, in vitro, o que sugere maior tolerabilidade e menores efeitos adversos em relação a administração do 5-FU em solução. A iontoforese aumentou mais de 5 vezes a penetração do 5-FU na pele. Sua associação aos imunolipossomas direcionou a penetração do 5-FU para a epiderme viável, local este onde os tumores cutâneos se desenvolvem. Nos estudos in vivo em modelo xenográfico de SCC de pele com superexpressão de EGFR, o tratamento tópico associado a iontoforese foi mais efetivo do que o tratamento subcutâneo. Em ambos tratamentos, no entanto, houve melhor controle do crescimento tumoral quando imunolipossomas foram aplicados e não houve perda de massa corpórea nos animais. A análise histológica revelou potencial de proliferação celular bastante reduzido para os diferentes tratamentos comparado ao grupo controle negativo. Os estudos pré-clínicos efetuados neste trabalho foram bem-sucedidos, o que pode balizar o planejamento de futuros estudos clínicos empregando iontoforese associada a imunolipossomas contendo cetuximabe e 5-FU para o tratamento de SCC de pele.

ABRAHAM, W.; WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Fusion patterns of liposomes formed from stratum corneum lipids. **J. Invest. Dermatol.**, v. 90, p. 259-262, 1988.

ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 975-983, 2001.

ALSARRA, I.A.; ALARIFI, M.N. Validated liquid chromatographic determination of 5-fluorouracil in human plasma. **J. Chromatog. B**, v. 804, p. 435-439, 2004.

AMAGASE, H.; KAKIMOTO, M.; HASHIMOTO, K.; FUWA, T.; TSUKAGOSHI, S. Epidermal growth fator receptor-mediated selective. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 80, p. 670-678, 1989.

ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. **J. Control. Release,** v. 77, p. 17–25, 2001.

ASHWANIKUMAR, N.; KUMAR, N.A.; NAIR, S.A.; KUMAR, G.S.V. Dual drug delivery of 5-fluorouracil (5-FU) and methotrexate (MTX) through random copolymeric nanomicelles of PLGA and polyethylenimine demonstrating enhanced cell uptake and cytotoxicity. **Colloids Surf. B**, v. 122, p. 520-528, 2014.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, p. 238–252, 1965.

BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. **Toxicol. Vitr.**, v. 23, p. 1-13, 2009.

BARENHOLZ, Y. Doxil®—The first fda-approved nano-drug: Lessons learned. J. Control. Release, v. 160, p. 117–134, 2012.

BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MENÉNDEZ-GUTÍERREZ, M.P.; FALCÓ, A.; SACEDA, M.; CATANIA, M.; MICOL, V. Immunoliposomes: A Multipurpose Strategy in Breast Cancer Targeted Therapy, Breast Cancer - Current and Alternative Therapeutic Modalities, Prof. Esra Gunduz (Ed.), 2011 ISBN: 978-953-307-776-5, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/breast-cancer-current-and-alternative-therapeuticmodalities/ immunoliposomes-a-multipurpose-strategy-in-breast-cancer-targeted-therapy

BARRY, B. W. Delivery routes in skin: a novel approach. **Adv. Drug Delivery Rev**. v. 54, p. 31-40, 2002.

BARTH, A. B.; PEREIRA, R. L.; DE VARGAS, B. A.; VOLPATO, N. M. A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations. **Biomed. Chromatog.**, v. 25, p. 1132–1137, 2011.

BAUMAN, J.E.; EATON, K.D.; MARTINS, R.G. Treatment of Recurrent Squamous Cell Carcinoma of the Skin With Cetuximab. **Arch. Dermatol.**, v. 143, p. 889-892, 2007.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências- Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre: Artmed Editora, 2ªed, 2002.

BERNARDI, D. S.. Influência da iontoforese na imunização transcutânea utilizando lipossomas e nanopartículas metálicas. Ribeirão Preto: **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2015.

BOLFARINI, G.C.; SIQUEIRA-MOURA, M.P.; DEMETS, G.J.F.; MORAIS, P. C.; Tedesco, A. C. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbituril zinc phthalocyanine complex on melanoma. **J. Photochem. Photobiol B: Biol**, v. 115, p. 1-4, 2012.

BONNER, J.A.; HARARI, P.M.; GIRALT, J.; AZARNIA, N.; SHIN, D.M.; COHEN, R.B.; JONES, C.U.; SUR, R.; RABEN, D.; JASSEM, J.; OVE, R.; KIES, M.S.; BASELGA, J.; YOUSSOUFIAN, H.; AMELLAL, N.; ROWINSKY, E.K.; ANG, K.K.Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous- Cell Carcinoma of the Head and Neck. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 567-578, 2006.

BOUWSTRA, J.A., DE VRIES, M.A., GOORIS, G.S., BRAS, W., BRUSSEE, J., PONEC, M. Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier. **J. Control. Release**, v. 15, p. 209–220, 1991.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012.

BUIRET, G.; COMBE, C.; FAVREL, V.; POMMIER, P.; MARTIN, L.; ECOCHARD, R.; FAYETTE, J.; TARTAS, S.; RAMADE, A.; CERUSE, P. A Retrospective, multicenter study of the tolerance of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil followed by radiotherapy with concomitant cetuximab in 46 cases of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 77, p. 430-437, 2010.

CASTILE, J.D.; TAYLOR, K.M.G. Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze–thaw extrusion. **Int. J. Pharm.**, v. 188, p. 87–95, 1999.

CH'NG, S.; LOW, I.; NG, D.; BRASCH, H.; SULLIVAN, M.; DAVIS, P.; TAN, S.T. Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. **Hum. Pathol.**, v. 39, p. 344-349, 2008.

CHAROENPUTTAKUN, P.; LI, S.K.; NGAWHIRUNPAT, T. Iontophoretic delivery of lipophilic and hydrophilic drugs from lipid nanoparticles across human skin. **Int.** J. Pharm., v. 495, p. 318-328, 2015.

CHEN, H.M.; YU, C.H.; LIN, H.P.; YANG, H., KUO, R.C.; KUO, Y.S.; CHIANG, C.P. Successful treatment of an early invasive oral squamous cell carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. **J. Dent. Sci.**, v. 5, p. 36-40, 2010.

CHEN, Y.; WU, Q.; ZHANG, Z.; YUAN, L.; LIU, X.; ZHOU, L. Preparation of Curcumin-Loaded Liposomes and Evaluation of Their Skin Permeation and Pharmacodynamics. **Molecules**, v. 17, p. 5972-5987, 2012.

CHINEMBIRI, T.N.; GERBER, M.; DU PLESSIS, L.; DU PREEZ, J.; DU PLESSIS, J. Topical Delivery of 5-Fluorouracil from Pheroid™Formulations and the In Vitro Efficacy Against Human Melanoma. AAPSPharmaSciTech, v. 16, p. 1390-1398, 2015.

CHOU, T.C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CHOW, A.; BROWN, B.D.; MERAD, M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 788-798, 2011.

ClinicalTrials.gov, accessed Nov/2016.

CHUNG, T.W.; LIN, S.Y.; LIU, D.Z.; TYAN, Y.C.; YANG, J.S. Sustained release of 5-FU from Poloxamer gels interpenetrated by crosslinking chitosan network. **Int. J. Pharm.**, v. 382, p. 39-44, 2009.

CLARES, B.; BIEDMA-ORTIZ, R.A.; SÁEZ-FERNÁNDEZ, E.; PRADOS, J.C.; MELGUIZO, C.; CABEZA, L.; ORTIZ, R.; ARIAS, J.L. Nano-engineering of 5-

fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 85, p. 329-338, 2013.

CODACCI-PISANELLI, G.; VAN DER WILT, C.L.; PINEDO, H.M.; NOORDHUIS, P.; BRAAKHUIS, B.J.; VAN LAAR, J.A.; PETERS, G.J. Antitumour activity, toxicity and inhibition of thymidylate synthase of prolonged administration of 5fluorouracil in mice. **Eur. J. Cancer**, v. 31A, p. 1517-1525, 1995.

COHEN, M.H.; CHEN, H.; SHORD, S.; FUCHS, C.; HE, K.; ZHAO, H.; SICKAFUSE, S.; KEEGAN, P.; PAZDUR, R. Approval Summary: Cetuximab in Combination With Cisplatin or Carboplatin and 5-Fluorouracil for the First-Line Treatment of Patients With Recurrent Locoregional or Metastatic Squamous Cell Head and Neck Cancer. **Oncologist**, v. 18, p. 460-466, 2013.

COSCO, D.; PAOLINO, D.; MAIUOLO, J.; DI MARZIO, L.; CARAFA, M.; VENTURA, C.A.; FRESTA, M. Ultradeformable liposomes as multidrug carrier of resveratrol and 5-fluorouracil for their topical delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 489, p. 1-10, 2015.

CRANMER, L.D.; ENGELHARDT, C.; MORGAN, S.S. Treatment of unresectable and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. **Oncologist**, v. 15, p. 1320-1328, 2010.

CUNNINGHAM, D.; HUMBLET, Y.; SIENA, S.; KHAYAT, D.; BLEIBERG, H.; SANTORO, A.; BETS, D.; MUESER, M.; HARSTRICK, A.; VERSLYPE, C.; CHAU, I.; CUTSEM, E.V. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, p. 337-345, 2004. DE MATTOS, A.C.; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M. Development and validation of an HPLC method for the determination of fluorouracil in polymeric nanoparticles. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.49, p. 117-126, 2013.

DUREGON, E.; MOLINARO, L.; VOLANTE, M.; VENTURA, L.; RIGHI, L.; BOLLA, S.; TERZOLO, M.; SAPINO, A.; PAPOTTI, M.G. Comparative diagnostic and prognostic performances of the hematoxylin-eosin and phospho-histone H3 mitotic count and Ki-67 index in adrenocortical carcinoma. **Modern Pathology**, v. 27, p. 1246-1254, 2014. EGBARIA, K.; WEINER, N. Liposomes as a topical drug delivery system. **Adv. Drug**

ELORZA, B.; ELORZA, M.A.; FRUTOS, G.; CHANTRES, J.R. Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods: study of drug release. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1153, p. 135-142, 1993.

Deliv. Rev, v.5, p. 287-300, 1990.

ELOY, J.O.; DE SOUZA, M.C.; PETRILLI, R.; BARCELLOS, J.P.A.; LEE, R.J.; MARCHETTI, J.M. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids Surf. B**, v. 123, p. 345-63, 2014.

ELOY, J.O. Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama. Ribeirão Preto: **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2016.

ESSA, E.A.; BONNER, M.C.; BARRY, B.W. Electrically assisted skin delivery of liposomal estradiol; phospholipid as damage retardant. **J. Control. Release**, v. 95, p. 535-546, 2004.

FANG, J.Y.; SUNG, K.C.; LIN, H.H.; FANG, C.L. Transdermal iontophoretic delivery of enoxacin from various liposome-encapsulated formulations. **J. Control. Release**, v. 60, p. 1-10, 1999.

FASEHHE, H.; ZARRINRAD, G.; TAVANGAR, S.M.; GHAFFARI, S.H.; FAGHIHI, S. The inhibitory effect of disulfiram encapsulated PLGA NPs on tumor growth: Different administration routes. **Matt. Sci. Eng. C**, v. 63, p. 587-595, 2016.

FDA, F. and D. A., & Food and Drug Administration. (2013). Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services.

FRESTA, M.; VILLARI, A.; PUGLISI, G;, CAVALLARO, G. 5-Fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties. **Int. J. Pharm.**, v. 99, p. 145–156, 1993.

GABIZON, A.; CATANE, R.; UZIELY, B.; KAUFMAN, B.; SAFRA, T.; COHEN, R.; MARTIN, F.; HUANG, A.; BARENHOLZ, Y. Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. **Cancer Res.**, v. 54, p. 987-992, 1994.

GAO, W.; VECCHIO, D.; LI, J.; ZHU, J.; ZHANG, Q.; FU, V.; LI, J.; THAMPHIWATANA, S.; LU, D.; ZHANG, L. Hydrogel Containing Nanoparticle-Stabilized Liposomes for Topical Antimicrobial Delivery. **ACS Nano**, v. 8, p. 2900-2907, 2014.

GELFUSO, G.M., GRATIERI, T., SOUZA, J. G., THOMAZINE, J. A., LOPEZ, R. F. V., The influence of positive or negative charges in passive and iontophoretic skin penetration of porphyrins used in photodynamic therapy. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 77, p. 249-256, 2011.

GELFUSO, G.M.; BARROS, M.A.O.; DELGADO-CHARRO, M.B.; GUY, R.H.; LOPEZ, R.F.V. lontophoresis of minoxidil sulphate loaded microparticles, a strategy for follicular drug targeting?. **Colloids Surf. B**, v. 134, p. 408-412, 2015.

GIACCHERO, D.; BARRIÈRE, J.; BENEZARY, K.; GUILLOT, B.; DUTRIAUX, C.; MORTIER, L.; LACOUR, J.P.; THYSS, A.; PEYRADE, Y. Efficacy of Cetuximab for

Unresectable or Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma - A Report of Eight. Cases Clin. Onc., v. 23, p. 716-721, 2011.

GLAVAS-DODOV, M.; FREDRO-KUMBARADZI, E.; GORACINOVA, K.; SIMONOSKA, M.; CALIS, S.; TRAJKOVIC-JOLEVSKA, S.; HINCAL, A.A. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5- FU. **Int. J. Pharm.**, *291*, 79–86, 2005.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G.M.; LOPEZ, R.F.V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1490-1498, 2008.

GRATIERI, T.; KALIA, Y.N. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. **Adv Drug Deliv Rev.**, v.65, p. 315-329, 2012.

GROSS, K.; KIRCIK, L.; KRICORIAN, G. 5% 5-Fluorouracil cream for the treatment of small superficial basal cell carcinoma: Efficacy, tolerability, cosmetic outcome, and patient satisfaction. **Dermatol Surg.**, v. 33, p. 433-439, 2007.

GROVES, T.R.; FARRIS, R.; ANDERSON, J.E.; ALEXENDER, T.C; KIFFER, F.; CARTER, G.; WANG, J.; BOERMA, M.; ALLEN, A.R. 5-Fluorouracil chemotherapy upregulates cytokines and alters hippocampal dendritic complexity in aged mice. **Behav. Brain Res.**, v. 316, p. 215-224, 2017.

GUPTA, A.K. The management of actinic keratosis in the United States with topical 5-fluorouracil: a pharmacoeconomic evaluation. **Cutis**, v. 70, p. 30-36, 2002.

GIJSENS, A.; DERYCKE, A.; MISSIAEN, L.; DE VOS, D.; HUWYLER, J.; EBERLE, A.; DE WITTE, P. Targeting the photocytotoxic compound AIPcS4 to HeLa cells by transferrin conjugated PEG-liposomes. **Int. J. Cancer**, v. 101, p. 78-85, 2002.

GUSTERSON, B.A.; HUNTER, K.D. Should we be surprised at the paucity of response to EGFR inhibitors?. **The Lancet Oncology**, v. 10, p. 522-527, 2009.

GUY, R.; KALIA, Y.N.; DELGADO-CHARRO, M.B.; MERINO, V.; LÓPEZ, A. MARRO, D. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **J. Control. Release**, v. 64, p. 129-132, 2000.

HADDAD, R.; NESHER, E.; WEISS, J.; SKORNICK, Y.; KASHTAN, H. Photodynamic therapy for Bowen's disease and squamous cell carcinoma of the skin. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 225-230, 2004.

HADIAN, Z.; SAHARI, M.A.; MOGHIMI, H.R.; BARZEGAR, M. Formulation, Characterization and Optimization of Liposomes Containing Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids; A Methodology Approach. Iran. J. Pharm. Res., v. 13, p. 393-404, 2014.

HAQUE, T.; RAHMAN, K.M.; THURSTON, D.E.; HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. **Eur. J. Pharm. Sci**, v. 77, p. 279-289, 2015.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatol. Ther.**, v.17, p.6-15, 2004.

HUBER, L.A.; PEREIRA, T.A.; RAMOS, D.N.; REZENDE, L.C.D.; EMERY, F.S.; SOBRAL, L.M.; LEOPOLDINO, A.M.; LOPEZ, R.F.V. Topical Skin Cancer Therapy Using Doxorubicin-Loaded Cationic Lipid Nanoparticles and Iontophoresis. **J. Biomed.**Nanotechnol., v. 11, p. 1-14, 2015.

International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline.

Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Current Step 4 version, 2005.

IVEY, J.W.; BONAKDAR, M.; KANITKAR, A.; DAVALOS, R.V.; VERBRIDGE, S.S. Improving cancer therapies by targeting the physical and chemical hallmarks of the tumor microenvironment. **Cancer Lett.**, v. 380, p. 330-339, 2016.

IYER, A.K.; SU, Y.; FENG, J.; LAN, X.; ZHU, X.; LIU, Y.; GAO, D.; SEO, Y.; VANBROCKIN, H.F.; BROADDUS, V.C.; LIU, B.; HE, J. The effect of internalizing human single chain antibody fragment on liposome targeting to epithelioid and sarcomatoid mesothelioma. **Biomaterials**, v. 32, p. 2605-2613, 2011.

JAAFARI, A.; TILAOUI, M.; MOUSE, H.A.; M'BARK, L.A.; ABOUFATIMA, R.; CHAIT, A.; LEPOIVRE, M.; ZYAD, A. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, p. 534-540, 2012.

JOHNSON, T.M.; ROWE, D.E.; NELSON, B.R.; SWANSON, N.A. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 26, p. 467-484, 1992.

JORAHOLMEN, M.W.; SKALKO-BASNET, N.; ACHARYA, G.; BASNET, P. Resveratrol-loaded liposomes for topical treatment of the vaginal inflammation and infections, **Eur. J. Pharm. Sci.,** v. 79, p. 112-121, 2015.

KAISER, N.; KIMPLER, A.; MASSING, U.; BURGER, A.M.; FIERBIG, H.H.; BRANDL, M.; SCHUBERT, R. 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. **Int. J. Pharm.**, v. 256, p. 123-131, 2003. KAJIMOTO, K.; YAMAMOTO, M.; WATANABE, M.; KIGASAWA, K.; KANAMURA, K.;

HARASHIMA, H.; KOGURE, K. Noninvasive and persistent transfollicular drug

delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. **Int J Pharm.**, v. 403, p. 57–65, 2011.

KAKUMANU, S.; TAGNE, J.B.; WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomedicine:NBM**, v. 7, p. 277-283, 2011.

KALAPURAKAL, S.J.; MALONE, J.; ROBBINS, K.T.; BUESCHER, L.; GODWIN, J.; RAO, K. Cetuximab in refractory skin cancer treatment. **J. Cancer**, v. 3, p. 257-261, 2012.

KARATHANASIS, E.; CHAN, L.; BALUSU, S.R.; D'ORSI, C.J. Multifunctional nanocarriers for mammographic quantification of tumor dosing and prognosis of breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 29, p. 4815 – 4822, 2008.

KEIL, F.; SELZER, E.; BERGHOLD, A.; REINISCH, S.; KAPP, K.S.; DE VRIES, A.; GREIL, R.; BACHTIARY, B.; TINCHON, C.; ANDERHUBER, W.; BURIN, M.; KASPAREK, A.K.; ELSAßER, W.; KAINZ, H.; RIEDL, R.; KOPP, M.; KORNEK, G. Induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil followed by radiotherapy with cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. **Eur. J. Cancer**, v. 49, p. 352-359, 2013.

KONING, G.A.; KAMPS, J.A.A.M.; SCHERPHOF, G.L. Efficient intracellular delivery of 5-fluorodeoxyuridine into colon cancer cells by targeted immunoliposomes. **Cancer Detec. Prev.**, v. 26, p. 209-307, 2002.

LAGINHA, K.; MUMBENGEGWI, D.; ALLEN, T. Liposomes targeted via two different antibodies: Assay, B-cell binding and cytotoxicity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1711, p. 25-32, 2005.

LANE, M.E. Skin penetration enhancers. Int. J. Pharm., v. 447, p. 12-21, 2013.

LEE, S.J.; KIM, S.Y.; CHUNG, J.H.; OH, S.J.; RYU, J.S.; HONG, Y.S.; KIM, T.W.; MOON, D.H. Induction of thymidine kinase 1 after 5-fluorouracil as a mechanism for 30-deoxy-30-[18F]fluorothymidine flare. **Biochem. Pharmacol.**, v. 80, p. 1528-1536, 2010.

LEMOS, C.N.; DE SOUZA, J.G.; Simão, P.S.; Lopez, R.F.V.. Iontophoresis Improved Growth Reduction of Invasive Squamous Cell Carcinoma in Topical Photodynamic Therapy. **Plos One**, v. 11, p. e0145922, 2016.

LEVY, S.; FURST, K.; CHERN, W. A comparison of the skin permeation of three topical 0.5% Fluorouracil formulations with that of a 5% formulation. **Clin. Ther.**, v. 23, p. 901–907, 2001.

LI, C.; WALLACE, S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 886 – 898, 2008.

LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; WANG, C.; HUANG, Z.; LUO, X.; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian J. Pharm. Sci.**, v. 10, p. 81-98, 2015.

LIMASALE, Y.D.P.; TEZCANER, A.; ÖZEN, C.; KESKIN, D.; BANERJEE, S. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells. **Int. J. Pharm.**, v. 479, p. 364-373, 2015.

LIU, S.; XIE, B.; WEI, W.; HUI, M.; SU, Z. Design and preparation of chimeric hyaluronidase as a chaperone for the subcutaneous administration of biopharmaceuticals. **Biochem Eng J**, v. 112, p. 32-41, 2016.

LOPEZ, R.F.V. Estudo de um sistema de liberação para o ácido 5-aminolevulínico por iontoforese para aplicação na terapia fotodinâmica de câncer de pele. Ribeirão Preto: **Tese (Doutorado)** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2000.

LOPEZ, R. F.; LANGE, N.; GUY, R.; BENTLEY M.V. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.56, p.77– 94, 2004.

LOVEN, K.; STEIN, L.; FURST, K.; LEVY, S. Evaluation of the Efficacy and Tolerability of Applied to Each Side of the Face in Patients with Actinic Keratosis, **Clin. Ther.**, v. 24, p. 4–5, 2002.

LU, Y.; LI, X.; LU, H.; FAN, Z. 1, 9-Pyrazoloanthrones Downregulate HIF-1α and Sensitize Cancer Cells to Cetuximab-Mediated Anti-EGFR Therapy. **PLoS ONE**,v. 5, p. e15823, 2010.

LU, Y.G.; WANG, Y.Y.; YANG, Y.D.; ZHANG, X.C.; GAO, Y.; ZHANG, J.B.; LI, G.L. Efficacy of topical ALA-PDT combined with excision in the treatment of skin malignant tumor. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 11, p. 122-126, 2014.

MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, **Adv. Enzyme Regul.**, v. 41, p. 189–207, 2001.

MADY, M.M.; DARWISH, M.M. Effect of chitosan coating on the characteristics of DPPC liposomes. **J. Adv. Res.**, v. 1, p. 187-191, 2010.

MAGHRABY, G.M.; BARRY, B.W.; WILLIAMS, A.C. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 34, p. 203-222, 2008.

MAMOT, C.; DRUMMOND, D.C.; NOBLE, C.O.; KALLAB, V.; GUO, Z.; HONG, K.; KIRPOTIN, D.B.; PARK, J.W. Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted

Immunoliposomes Significantly Enhance the Efficacy of Multiple Anticancer Drugs In vivo. **Cancer Res.**, v. 65, p. 11631-11638, 2005.

MAMOT, C.; RITSCHARD, R.; WICKI, A.; STEHLE, G.; DIETERLE, T.; BUBENDORF, L.; HILKER, C.; DEUSTER, S.; HERRMANN, R.; ROCHLITZ, C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. **Lancet Oncol.**, v. 13, p. 1234-1241.

MANOJLOVIC, V.; WINKLER, K.; BUNJES, V.; NEUB, A.; SCHUBERT, R.; BUGARSKI, B.; LENEWEIT, G. Membrane interactions of ternary phospholipid/cholesterol bilayers and encapsulation efficiencies of a RIP II protein, **Colloids Surf. B**, v. *64*, 284–296, 2008.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Res.**, v. 46, p. 6387-6392, 1986.

MAUBEC, E.; DUVILLARD, P.; VELASCO, V.; CRRICKX, B.; AVRIL, M. F. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. **Anticancer Res**, v. 25, p. 1205-1210, 2005.

MCGILLIS, S.T.; FEIN, H. Topical Treatment Strategies for Non-Melanoma Skin Cancer and Precursor Lesions. **Semin Cutan Med Surg.**, v. 23, p. 174-183, 2004.

MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.54, p.S3-S17, 2002.

MERINO, V.; LÓPEZ, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Electrorepulsion versus electroosmosis: effect of pH on the iontophoretic flux of 5-fluorouracil. **Pharm. Res.**, v. 16, p. 758-761, 1999.

MESÍA, R.; RIVERA, F.; KAWECKI, A.. ROTTEY, S.; HITT, R.; KIENZER, H.; CUPISSOL, D., DE RAUCOURT, D.; BENASSO, M.; KORALEWSKI, P.; DELORD, J.P.; BOKEMEYER, C.; CURRAN, D.; GROSS, A.; ,VERMORKEN, J.B. Quality of life of patients receiving platinumbased chemotherapy plus cetuximab first line for recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Ann Oncol.**, v. 21, p. 1967–1973, 2010.

METTERLE, L.; NELSON, C.; PATEL, N. Intralesional 5-fluorouracil (FU) as a treatment for nonmelanoma skin cancer (NMSC): A review. **J Am Acad Dermatol.**, V. 74, P. 552-557, 2015.

MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S.; RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system: Studies on the in vitro release behavior. **J. Control. Release**, v. 69, p. 159-168, 2000.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration. I. Lotion dosage form, **Life Sci.**, v. 26, p. 1473-1477, 1980.

MILLA, P.; DOSIO, F.; CATTEL, L. PEGylation of Proteins and Liposomes: a Powerful and Flexible Strategy to Improve the Drug Delivery. **Curr. Drug Metab.**, v. 13, 105-119, 2012.

MISAK, H.; ZACHARIAS, N.; SONG, Z.; HWANG, S.; MAN, K.P.; ASMATULU, R.; YANG, S.Y. Skin cancer treatment by albumin-5-FU loaded magnetic nanocomposite spheres in a mouse model. **J. Biotechnol.**, v. 164, p. 130-136, 2013.

MORSE, L.G.; KENDRICK, C.; HOOPER, D.; WARD, H.; PARRY, E.; Treatment of squamous cell carcinoma with intralesional 5-Fluorouracil. **Dermatol. Surg.**, v. 29, p.1150-1153, 2003.

MORSE, L.G.; KENDRICK, C.; HOOPER, D.; WARD, H.; PARRY, E.; Treatment of squamous cell carcinoma with intralesional 5-Fluorouracil. **Dermatol. Surg.**, v. 29, p.1150-1153, 2003.

MORTESEN, J.H.; JEPPESEN, M.; PILGAARD, L.; AGGER, R.; DUROUX, M.; ZACHAR, V.; MOOS, T. Targeted Antiepidermal Growth Factor Receptor (Cetuximab) Immunoliposomes Enhance Cellular Uptake *In Vitro* and Exhibit Increased Accumulation in an Intracranial Model of Glioblastoma Multiforme. **J. Drug Deliv.,** p. 1-13, 2013.

NAKATA, E.; HUNTER, N.; MASON, K.; FAN, Z.; ANG, K.K.; MILAS, L. C225 Antiepidermal growth factor receptor antibody enhances the efficacy of docetaxel chemoradiotherapy. **J. Radiation Oncology Biol. Phys.**,v. 59, p. 1163-1173, 2004.

NOBS, L.; BUCHEGGER, F.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. Current Methods for Attaching Targeting Ligands to Liposomes and Nanoparticles. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, p. 1980-1992, 2004.

NUÑO-GONZÁLEZ, A.; VICENTE-MARTÍN, F.J.; PINEDO-MORALEDA, F.; LÓPEZ-ESTEBARANZ, J.L. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma. **Acta Dermosifiliogr.**, v. 103, p. 567-578, 2012.

OECD. (2004). Skin Absorption: in vitro Method. Test, (April), 1–8.

OGURA, M.; PALIWAL, S.; MITRAGORI, S. Low-Frequency Sonophoresis. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1218-23, 2008

OH, E.K.; JIN, S.E.; KIM, J.K.; PARK, J.S.; PARK, Y.; KIM, C.K. Retained topical delivery of 5-aminolevulinic acid using cationic ultradeformable liposomes for photodynamic therapy. **Eur. J. Pharm. Sci**, v. 44, p. 149-157, 2011.

OSTRENGA, J.; STEINMETZ, C.; POULSEN, B.; YETT, S. Significance of vehicle composition II. Prediction of optimal vehicle composition. **J. Pharm. Sci.**, v. 60, p. 1180–1183, 1971.

ÖZER, A.Y., Stability studies on 5-FU liposomes. **Drug Target. Deliv.**, v.1, p. 151–160, 1992.

PAN, X.; WU, G.; YANG, W.; BARTH, R. F.; TJARKS, W.; LEE, R. J. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via cholesterol-based membrane anchor for targeted delivery of a neutron capture therapy (NCT) agent to glioma cells. **Bioconjug. Chem.**, v. 18, p. 101-108, 2007.

PARK, J.W. et al. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. **J Control. Release**, v. 74, p. 95-113, 2001.

PARK, S.Y.; YOON, S.J.; FREIRE-DE-LIMA, L.; KIN, J.H.; HAKOMORI, S.I. Control of cell motility by interaction of gangliosides, tetraspanins, and epidermal growth factor receptor in A431 versus KB epidermoid tumor cells. **Carbohydr. Res.**, v. 344, p. 1479-1486, 2009.

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

PEREZ, M.J.A.; SCHILRREFF, P.; APEZTEGUIA, G.; CELES, F.S.; ZACCHINO, S.; DE OLIVEIRA, C.I.; ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. **Colloids Surf. B**, v. 139, p. 190-198, 2016.

PERK, L.R.; VISSER, G.W.; VOSJAN, M.J.; STIGTER-VAN- WALSUM, M.; TIJINK, B.M.; LEEMANS, C.R.; VAN DONGEN, G.A. 89Zr as a PET surrogate radioisotope for

scouting biodistribution of the therapeutic radiometals 90Y and 177Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. **J Nucl Med**.; v.46, p. 1898–1906, 2005.

PETRILLI, R.; ELOY, J.O.; MARCHETTI, J.M.; LOPEZ, R.F.V.; LEE, R.J. Targeted lipid nanoparticles for antisense oligonucleotide delivery. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 15, p. 847-855, 2014.

PETRILLI, R.; ELOY, J. O.; LOPEZ, R. F. V.; LEE, R. Cetuximab immunoliposomes enhance delivery of 5-FU to skin squamous carcinoma cell line. **Anti-cancer agents**Med. Chem., v. 16, 2016 (E-pub ahead of print, doi 10.2174/1871520616666160526110913).

Portal Google. Disponível em http://www.google.com/patents/US7691826. Acesso em 22 de novembro de 2016.

Portal INCA. Disponível em http://www.inca.com.br. Acesso em 22 de novembro de 2016.

Portal Neb. Disponível em < https://www.neb.com/~/media/NebUs/Files/Application%20Notes/Characterization%2 0of%20Glycans%20from%20Erbitux%20Rituxan%20and%20Enbrel%20using%20P NGase%20F%20Glycerol%20Free%20Recombinant.pdf>. Acesso em 22 de novembro de 2016.

Portal Piercenet. Disponível em < www.piercenet.com/method/overview-elisa>.

Acesso em 20 de novembro de 2015.

PRAÇA, F.S.G.; BENTLEY, M.V.L.B.; LARA, M.G.; PIERRE, M.B.R. Celecoxib determination in different layers of skin by a newly developed and validated HPLC-UV method. **Biomed. Chromatogr.**, v. 25, p. 1237-1244, 2011.

PUVANAKRISHNAN, P.; DIAGARADJANE, P.; KAZMI, S.; DUNN, A.K.; KRISHNAN, S.; TUNNELL, J.W. Narrow band imaging of squamous cell carcinoma tumors using topically delivered anti-EGFR antibody conjugated gold nanorods. **Lasers Surg. Med.**, v. 44, p. 310-317, 2012.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fuidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.

RATUSHNY, V.; ASTSATUROV, I.; BURTNESS, B.A.; GOLEMIS, E.A.; SILVERMAN, J.S. Targeting EGFR resistance networks in head and neck cancer. **Cell. Signal.**, v. 21, p. 1255-1268, 2009.

RAWAT, S.; VENGURLEKAR, S.; JAIN, R.S.; SRIKARTI, G. Transdermal Delivery by Iontophoresis. **Indian J Pharm Sci.**, V. 70, P. 5-10, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROCHA, M.S.T.; LUCCI, C.M.; LONGO, J.P.F.; GALERA, P.D.; SIMIONI, A.R.; LACAVA, Z.G.M.; TEDESCO, A.C.; AZEVEDO, R.B. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 8, p. 251-257, 2012.

RUGGERI, B.A.; CAMP, F.; MIKNYOCZKI, S. Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. **Biochem. Pharmacol.**, v. 87, p. 150-161, 2014.

SABITHA, M.; REJINOLD, N.S.; NAIR, A.; LAKSHMANAN, V.K.; NAIR, S.V.; JAYAKUMAR, R. Development and evaluation of 5-fluorouracil loaded chitin nanogels for treatment of skin cancer. **Carbohyd. Polym.**, v. 91, p. 48-57, 2013.

SAKATA, O.; FUJII, M.; KOIZUMI, N.; NAKADE, M.; KAMEYAMA, K.; WATANABE, Y. Effects of Oils and Emulsifiers on the Skin Penetration of Stearyl Glycyrrhetinate in Oilin-Water Emulsions. **Biol. Pharm Bull.**, v. 37, p. 486–9, 2014.

SALEHI, Z.; MASHAYEKHI, F.; SHAHOSSEINI, F. Significance of eIF4E expression in skin squamous cell carcinoma. **Cell Biol. Int.**, v.31, p.1400-1404, 2007.

SANSON, A.L.; SILVA, S.C.R.; MARTINS, M.C.G.; GIUSTI-PAIVA, A.; MAIA, P.P.; MARTINS, I. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 47, p. 363-371, 2011.

SCHNYDER, A.; KRÄHENBÜHL, S.; TÖRÖK, U.; DREWE, J.; HUWYLER, J. Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. **Biochem.**J., v. 377, p. 61-67, 2004.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the know and the unknow. **J. Cell Physio.**, v. 182, p. 311-322, 2000.

SEBER, S.; GONULTAS, A.; OZTURK, O.; YETISYIGIT, T.Recurrent squamous cell carcinoma of the skin treated successfully with single agent cetuximab therapy. **Onco Targets Ther.**, v. 9, p. 945-948, 2016.

SHENOY, V.S.; VIJAY, I.K; MURTHY, R.S. Tumour targeting: biological factors and formulation advances in injectable lipid nanoparticles, **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 411-422, 2005.

SHEW, R.L.; DEAMER, D.W. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes. **Biochim Biophys Acta.**, v. 816, p.1-8, 1985.

SIERON, A.; KAWCZYK-KRUPKA, A.; CEBULA, M.A.W.; SZYGULA, M.; ZIELEZNIK, W.; GRUK, M.; SUWALA-JURCZYK, S. Photodynamic therapy (PDT) using topicallyapplied _-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 311-317, 2004.

SKVORTSOVA, I.; SKVORTSOV, S.; RAJI, U.; STASYK, T.; RIESTERER, O.; SCHOTTDORF, E.V.; POPPER, B.A.; SCHIESTL, B.; EICHBERGER, P.; DEBBAGE, P.; NEHER, A.; BONN, G.K.; HUBER, L.A.; MILAS, L.; LUKAS, P. Epithelial-to-mesenchymal transition and c-myc expression are the determinants of cetuximab-induced enhancement of squamous cell carcinoma radioresponse. **Radiother. Oncol.**, v. 96, p. 108-115, 2010.

SOLOMON, B.; HAGEKYRIAKOU, J.; TRIVETT, M.K.; STACKER, S.A.; McARTUR, G.A.; CULLINANE, C. EGFR blockade with ZD1839 ("Iressa") potentiates the antitumor effects of single and multiple fractions of ionizing radiation in human A431 squamous cell carcinoma. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 55, p. 713-723, 2003.

STONER, K.L.; HARDER, H.; FALLOWFIELD, L.J.; JENKINS, V.A. Intravenous versus subcutaneous drug administration. Which do patients prefer? A systematic review. **Patient-Patient-Centered Outcomes Res.**, p. 1-9, 2014.

STRATIGOS, A.; GARBE, C.; LEBBE, C.; MALVEHY, J.; DEL MARMOL, V.; PEHAMBERGER, H.; PERIS, K.; BECKER, J.C.; ZALAUDEK, I.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.R.; BASTHOLT, L.; TESTORI, A.; GROB, J.J. On behalf of the European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology

(EADO), and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. **Eur. J. Cancer**, v. 51, p. 1989-2007, 2015.

SU, X.; YANG, N.; WITTRUP, K.D.; IVRINE, D.J. Synergistic Antitumor Activity from Two-Stage Delivery of Targeted Toxins and Endosome-Disrupting Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 1093-1102, 2013.

SUE, M. Cetuximab improves survival in advanced colorectal cancer. **Oncology Times UK: AACR Annual Meeting**, v. 4, p.13, 2007.

TANG, H.; MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Theoretical Description of Transdermal Transport of Hydrophilic Permeants: Application to Low-frequency Sonophoresis. **J. Pharm. Sci.**, v. 90, p. 545-568, 2001.

TAVEIRA, S.F.; NOMIZO, A.; LOPEZ, R.F.V. Effect of the iontophoresis of a chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity. **J. Control. Release**, v. 134, p. 35-40, 2009.

TESSELAAR, E.; SJÖBERG, F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. **Microvascular Res.**, v. 81, p. 88-96, 2011.

THOMAS, A.M.; KAPANEN, A.I.; HARE, J.I.; RAMSAY, E.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; BALLY, M.B. Development of a liposomal nanoparticle formulation of 5-Fluorouracil for parenteral administration: Formulation design, pharmacokinetics and efficacy. **J. Control. Release**, v. 150, p. 212-219, 2011.

TIAN, F.; FAN, T.; JIANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, X. A small interfering RNA targeting NF-_B p65 alone or combined with 5-FU inhibits growth of esophageal squamous cell carcinoma in nude mice. **Pathol. Res. Pract.**, v. 208, p. 32-38, 2012.

UHL, R.G.; STEVENSON, A.; SIDOROV, V. Towards improved gene delivery: Flip of cationic lipids in highly polarized liposomes. **Chem. Commun.**, p. 383–385, 2007.

United States Pharmacopoeia USP 34, 2010

UNIVERSIDADE DO TEXAS, Estados Unidos. Antibody-targeted photodynamic therapy. PCT/US2004/006985. 8 de março de 2004. 7 de março de 2003. 28 de julho de 2005.

URIBE, P.; GONZALEZ, S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy. **Pathology-Research and Practice**, v. 207, p. 337-342, 2011.

WANG, Y.; YANG, Y.; LU, Y. Surgery combined with topical photodynamic therapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the lip. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 14, p. 170-172, 2016.

VAN ETTEN, E.W.M.; KATE, M.T.T.; SNIJDERS, S.V.; BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Administration of Liposomal Agents and Blood Clearance Capacity of the Mononuclear Phagocyte System. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 42, p. 1677-1681, 1998.

VERMA, D.D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **Int. J. Pharm.**, v. 258, p. 141-151, 2003.

VERMOKEN, J.B.; MESIA, R.; RIVERA, F. et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 359, p. 1116–1127, 2008.

VIJAYAKUMAR, M. R.; KOSURU, R.; VUDDANDA, P.R.; SINGH, S.K.; SING, S. Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. J. Drug Deliv. Sci. Tec., v. 33, p. 125-135, 2016.

VUTLA, N.B.; BETLAGERI, G.V.; BANGA, A.K. Transdermal iontophoretic delivery of encephalin formulated in liposomes. **J. Pharm. Sci**, v. 85, p. 5-8, 1996.

WANG, Y.; YANG, Y.; LU, Y.Surgery combined with topical photodynamic therapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the lip. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.**, v. 14, p. 170-172, 2016.

WERSCHLER, W.P.; FAACS, F. Considerations for the use of fluorouracil cream 0,5% for the treatment of actinic keratosis in elderly patients. J. Clin. Aesthetic Dermatol., v. 1, p. 22-27, 2008.

WICKI, A.; RITSCHARD, R.; LOESCH, U.; DEUSTER, S.; ROCHLITZ, C.; MAMOT, C. Large-scale manufacturing of GMP-compliant anti-EGFR targeted nanocarriers: Production of doxorubicin-loaded anti-EGFR -immunoliposomes for a first-in-man clinical trial. **Int. J. Pharm.**, v. 484, p. 8-15, 2015.

WIKLANDER, O.P.B; NORDIN, J.Z.; O'LOUGHLIN, A.; GUSTAFSSON, Y.; CORSO, G.; MÄGER, I.; VANDER, P.; LEE, Y.; SORK, H.; SEOW, Y.; HELDRING, N.; ALVAREZ-ERVIT, L.; SMITH, C.E.; LE BLANC, K.; MACCHIARINI, P.; JUNGEBLUTH, P.; WOOD, M.J.A.; EL ANDALUSSI, S. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. J. Extracel. Vesicles, v. 4, p. 26316, 2015.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 603–618, 2004.

YANG, T. et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **J. Control. Release**, v. 120, p.169–177, 2007.

ZHANG, Z.; WO, Y.; ZHANG, Y.; WANG, D.; HE, R.; CHEN, H.; CUI, D. In vitro study of ethosome penetration in human skin and hypertrophic scar tissue. **Nanomedicine**, v. 8, p. 1026-1033, 2012

ZHANG, T.; ZHOU, S.; HU, L.; PENG, B.; LIU, Y.; LUO, X.; SONG, Y.; LIU, X.; DENG, Y. Polysialic acid-modifying liposomes for efficient delivery of epirubicin, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. **Int. J. Pharm.**, v. 515, p. 449-459, 2016.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; FAVINI, E.; TORTORETO, M.; CINCINELLI, R.; CROCE, A.C.; BUCCI, F.; PISANO, C.; ZUNINO, F. Efficacy of ST1968 (namitecan) on a topotecan-resistant squamous cell carcinoma. **Biochem. Pharmacol.**, v. 79, p. 535-541, 2010.