UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos
antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da
eficácia contra o câncer de mama**

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

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Josimar de Oliveira Eloy

Orientadora: Profa. Dra. Juliana
Maldonado Marchetti

Co-orientador: Prof. Dr. Robert J.
Lee (The Ohio State University)

**Versão corrigida da Tese de Doutorado o apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 13/07/2016. A versão
original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.**

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.

Eloy, Josimar de Oliveira

Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama. Ribeirão Preto, 2016.
110 p.; 30cm.

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

Orientador: Marchetti, Juliana Maldonado

1. Lipossomas. 2. Imunolipossomas. 3. Câncer de mama.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Josimar de Oliveira Eloy

Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama

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

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana
Maldonado Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por desde muito pequeno me apoiar incondicionalmente nos estudos, sendo parceira e confidente em todos os momentos, sempre muito carinhosa e presente;

À minha esposa Raquel, por compartilhar comigo sua vida e me mostrar o caminho da felicidade, que é ao seu lado;

A Deus, por me inspirar, guiar e proteger.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre apoiarem meus estudos e por confiarem nos caminhos que escolhi, e especialmente à minha mãe, por vibrar a cada conquista e por demonstrar amor incondicional;

À minha esposa Raquel, por compartilhar comigo sua vida, dando todo o suporte afetivo e também profissional que preciso. Obrigado pelo amor, por cada palavra de carinho e apoio durante o doutorado, bem como por todas as discussões, correções e ajuda experimental;

Ao meu irmão Bruno, por dividir comigo a paixão pelas ciências farmacêuticas e por sempre me apoiar;

À minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti, por sempre confiar em mim, me tratando com respeito, humildade e amizade, compartilhando seus conhecimentos, estimulando que eu batalhe sempre pelos meus sonhos;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Robert J. Lee, da Ohio State University, por me orientador durante o estágio sanduíche, pelos grandes ensinamentos e inúmeras oportunidades, que sem dúvida me engrandeceram profissionalmente;

Aos meus colegas de laboratório, José Fernando Topan, Juliana Barcellos, Giovanni Raspantini, Mayara Trevisani, Erika Vargas, Patrícia Mazureki, Livia Depieri, Livia Borghetti, Margarete Moreno, Marcelo Kravicz; Larissa Bueno, Bryant Yung, Hong Li, Jilong Li, Xingwei, Yang e Lauren Cosby pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho;

Aos funcionários do laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Henrique Diniz, José Orestes Del Ciampo e em especial à amiga Fabíola Praça, pela imensa ajuda técnico-científica e intelectual, bem como pelo coleguismo e respeito ao longo destes anos;

À Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez por permitir o uso de seu laboratório para realização de experimentos em cultura celular;

Ao Prof. Dr. Daniel Tiezzi, da FMRP, pela colaboração com estudos *in vivo* e doação da linhagem celular 4T1;

Ao Prof. Dr. Luciano Neder Serafini, da FMRP, por permitir o seu laboratório para realização de análises histológicas;

A Profa. Regina Torchetti Toloi, por me fornecer a linhagem celular SKBR3;

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

Ao Dr. Heriton Antonio, pela colaboração na realização de estudos *in vivo*;

Ao funcionários Clóvis Junior, Fabiana de Moraes , Eduardo Tozatto, da FCFRP, e Deise Chesca da FMRP, pela ajuda com as análises, respectivamente, de infravermelho, citometria de fluxo, microscopia confocal e de histologia;

Ao Dr. Fabiano Saggioro, do HCRP, pela ajuda com a interpretação das análises histológicas;

A FAPESP, pelo apoio deste projeto com bolsa de doutorado no Brasil e no exterior (Processos nº 12/10388-3 e 13/05362-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP))

RESUMO

ELOY, J.O. **Lipossomas e imunolipossomas contendo fármacos antitumorais: desenvolvimento, caracterização e avaliação da eficácia contra o câncer de mama.** 2016. 110f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O câncer de mama representa um grave problema de saúde pública. Dentre os fármacos empregados, destaca-se o paclitaxel, um agente citotóxico eficaz, porém associado a severos efeitos colaterais. A metformina hidrocloreto tem obtido resultados promissores para o tratamento de neoplasias, porém é bastante hidrofílica, fator limitante da biodisponibilidade. A rapamicina tem demonstrado sinergismo com paclitaxel e potente atividade antitumoral. Todavia, é um fármaco lipofílico e possui desvantagens. Sistemas nanoestruturados de fármacos como lipossomas PEGlados são largamente empregados para a melhora da farmacocinética e potencialização da ação terapêutica. Ademais, a funcionalização de lipossomas com anticorpos monoclonais pode permitir a entrega seletiva do fármaco encapsulado à célula alvo. No presente trabalho objetivou-se desenvolver e caracterizar lipossomas e imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe, contendo paclitaxel, metformina hidrocloreto e/ou rapamicina, bem como avaliar as formulações através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram que a metformina hidrocloreto foi encapsulada com baixa eficiência, menor que 20%, ao passo que paclitaxel e rapamicina puderam ser co-encapsulados com adequados valores de eficiência de encapsulação, equivalente a 56,32% para paclitaxel e 73,31% para rapamicina, e tamanho de partícula nanométrico, de 136,95 nm em composição biocompatível baseada em SPC:Col:DSPE-PEG(2000). Os dois fármacos apresentaram liberação lenta, e foram convertidos às formas molecular e amorfa, respectivamente para paclitaxel e rapamicina quando encapsulados. Os imunolipossomas foram funcionalizados com elevada eficiência com trastuzumabe e mantiveram o tamanho nanométrico, com adequados valores de encapsulação dos fármacos. Ainda, mostrou-se o sinergismo entre paclitaxel e rapamicina co-encapsulados em lipossomas em células triplo negativas (4T1) e houve sinergismo entre os dois fármacos, mediado pelo anticorpo em imunolipossomas frente à linhagem celular HER2 positiva (SKBR3), em virtude do aumento do *uptake* celular mediado pelo trastuzumabe. Finalmente, os resultados obtidos *in vitro* foram confirmados *in vivo*, sendo que os lipossomas com paclitaxel e rapamicina co-encapsulados foram capazes de controlar o crescimento tumoral em modelo de câncer de mama triplo negativo, ao passo que o imunolipossoma com os dois fármacos permitiu o controle do crescimento de tumores xenográficos HER2 positivos, cuja média de volume tumoral correspondeu a 25,27%, 44,38% e 47,78% das médias dos volumes tumorais de controle negativo, positivo e lipossoma, respectivamente. Portanto, a formulação desenvolvida nesse trabalho tem potencial para ser avaliada em estudos clínicos.

Palavras-chave: lipossoma, imunolipossoma, paclitaxel, rapamicina, metformina, trastuzumabe, câncer de mama.

ABSTRACT

ELOY, J.O. **Liposomes and immunoliposomes containing antitumor drugs: development, characterization and evaluation of the efficacy against breast cancer.** 2016. 110f Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Breast cancer represents a severe public health problem. Among the drugs used in the treatment, paclitaxel is an effective cytotoxic drug, but associated with side effects. Hydrochloride metformin has shown promising results for cancer treatment, however it is very hydrophilic, a limiting factor for bioavailability. Rapamycin has demonstrated synergism with paclitaxel and potent anticancer activity, though it is a lipophilic drug with drawbacks that compromise its bioavailability. Nanostructured drug delivery systems, such as PEGylated liposomes are largely employed for pharmacokinetics improvement and enhancement of therapeutic effect. Furthermore, the functionalization of liposomes with monoclonal antibodies enables the selective delivery of the loaded drug to the target cell. In the present work, we aimed to develop and characterize liposomes and immunoliposomes functionalized with trastuzumab, containing paclitaxel, hydrochloride metformin and/or rapamycin, as well as to evaluate the formulations through *in vitro* and *in vivo* studies. The results showed that hydrochloride metformin was encapsulated with low efficiency, less than 20%, on the other hand paclitaxel and rapamycin could be co-loaded with suitable values of encapsulation efficiency, 56.32% for paclitaxel and 73.31% for rapamycin and nanometric particle size, 136.95 nm, based on a SPC:Chol:DSPE-PEG(2000) composition. The two drugs displayed slow release, and were converted to molecular and amorphous form, respectively for paclitaxel and rapamycin when encapsulated. The immunoliposomes were developed with high efficiency with trastuzumab and kept the nanometric size, with adequate encapsulation of drugs. Moreover, herein it was shown the synergism between paclitaxel and rapamycin co-loaded in liposomes in triple negative cells (4T1) and there was synergism between the two drugs mediated by the antibody in immunoliposomes in the HER2-positive cell line (SKBR3), due to the improved cell uptake mediated by trastuzumab. Finally, the results obtained *in vitro* were confirmed *in vivo*. Co-loaded paclitaxel and rapamycin were able to control tumor growth in a triple negative breast cancer animal model, while the immunoliposome containing the two drugs allowed for better control of tumor growth in a HER2-positive breast xenograft model, whose average tumor volume corresponded to 25.27%, 44.38% and 47.78% of the tumor volumes of positive control, negative control and liposome, respectively. Therefore, the formulation developed herein has potential to be evaluated in clinical trials.

Keywords: liposome, immunoliposome, paclitaxel, rapamycin, metformin, trastuzumab, breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do paclitaxel	06
Figura 2. Estrutura química da metformina hidrocloreto.	07
Figura 3. Representação da via mTOR. A ligação entre receptor e ligante ativa a via PI3K/Akt/mTOR. O mTOR regula as atividades dos reguladores de tradução 4E-BP1 e da quinase p70. Akt também ativa outros alvos implicados na sobrevivência e inibição da apoptose, incluindo NF κ B e Bad (adaptado de MITA et al., 2003).	08
Figura 4. Estrutura química da rapamicina.	09
Figura 5. Representação esquemática da estrutura básica do lipossoma unilamelar (a) e lipossoma multilamelar (b) (adaptado de SPUCH; NAVARRO, 2011).	11
Figura 6. Mecanismo hipotético de internalização e liberação intercelular de lipossomas pH sensíveis (adaptado de SIMOES et al., 2004).	13
Figura 7. Representação esquemática de um imunolipossoma (adaptado de FENG et al., 2010).	15
Figura 8. Reação entre maleimida presente no lipídeo DSPE-PEG-Mal e proteína (trastuzumabe) tiolada para formação do imunolipossoma (adaptado de Thermofisher).	27
Figura 9. Curvas analíticas de PAC (A), MET (B) e RAP (C).	40
Figura 10. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação de paclitaxel (%) em formulações preparadas com SPC, SPC/Col nas proporções respectivas de 10:1, 10:0,5 ou 10:2 e SPC/Col/DSPE-PEG (2000) 10:2:0,5 em pH 7,4.	45
Figura 11. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação (%) de PAC em formulações preparadas com DOPE em pH 7,4, DOPE /AO 5:2 e 4:1, em pH 7,4, DOPE/AO 4:1 em pH 8,0, 8,5 ou 9,0, DOPE/AO 4:1 em solução contendo 0,1, 0,5 ou 3,0% de tween 80.	48
Figura 12. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação de lipossomas de DPPC:Col (10:1) preparados em diferentes razões de fármaco para lipídio.	51
Figura 13. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e	52

eficiência de encapsulação de lipossomas de SPC contendo RAP preparados em diferentes razões de fármaco para lipídio.

Figura 14. Perfis de liberação *in vitro* de paclitaxel a partir da formulação comercial e formulações lipossômicas obtidos através do método de diálise em membrana de acetato de celulose (50 kDa), em 50 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C. 55

Figura 15. Perfis *in vitro* de liberação de paclitaxel a partir da formulação comercial e formulações lipossômicas obtidos através da ultrafiltração com tubos Amicon, em 50 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C. 57

Figura 16. Perfis *in vitro* de liberação de paclitaxel a partir da formulação lipossômica composta por DOPE e AO, obtidos através da diálise ou ultrafiltração em membrana de acetato de celulose (50 kDa), em 50 mL de tampão fosfato pH 5,0 contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C. 58

Figura 17. Resultados obtidos no estudo *in vitro* de liberação em membrana de diálise realizado em dissolutor, a 150 rpm, em meio tampão fosfato pH 7,4 com 1% de LSNa. 59

Figura 18. Resultados obtidos na avaliação da morfologia de lipossomas composto por SPC:Col:DSPE-PEG (2000):PAC:RAP (10:2:0,5:1:0,33) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com aceleração de 100 kV e aumento de 100000 vezes. 60

Figura 19. Resultados da avaliação da estabilidade da formulação composta por SPC:Col:DSPE-PEG (2000):PAC:RAP (10:2:0,5:1:0,33): eficiência de encapsulação e tamanho de partícula. 60

Figura 20. Espectro de FTIR de 4550 a 450 cm⁻¹ para os fármacos PAC, RAP, lipossomas de PAC e RAP, lipossomas contendo PAC/RAP e lipossomas branco. No espectro foram indicadas com setas as bandas C=O de grupos ésteres em 1725 cm⁻¹, ligação amida ao redor 1647 cm⁻¹, vibração de estiramento da ligação C-N em aproximadamente 1240 cm⁻¹ de PAC e C=O, C=C e C-H adjacente à carbonila de RAP. 62

Figura 21. Curvas de DSC de 15 a 250°C, sob taxa de aquecimento de 63

10°C/min. Picos endotérmicos estão voltados para a parte superior no gráfico.

Figura 22. Curvas de TGA de 15 a 250°C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min. 63

Figura 23. Representação do protocolo de preparo de imunolipossoma. Adaptado de ELOY et al., 2016b 65

Figura 24. Representação gráfica dos cromatogramas obtidos à partir da eluição de imunolipossomas em colunas CL-4B usando PBS pH 7,4, com quantificação de proteínas pelo método BCA. Frações de 4-6 são atribuídas aos imunolipossomas. A: imunolipossoma branco, B: imunolipossoma contendo PAC, C: imunolipossoma contendo RAP e D: imunolipossoma contendo PAC/RAP co-encapsulados. 65

Figura 25. Resultados obtidos nos estudos para verificação da integridade de trastuzumabe (trastuzumabe, imunolipossoma branco, imunolipossoma de PAC, imunolipossoma de RAP e imunolipossoma com PAC/RAP co-encapsulados) utilizando a técnica de eletroforese em SDS-PAGE sob condições redutoras a 175 V por 30 min. 66

Figura 26. Resultados da avaliação da morfologia de imunolipossomas composto por SPC:Col:DSPE-PEG (2000):RAP:PAC (10:2:0,5:1:0,33) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com aceleração de 100 kV e aumento de 100000 vezes. 67

Figura 27. Fotomicrografias das células 4T1 (A) e SKBR3 (B) cultivadas em meio RPMI completo com 10% de FBS, com 1% de solução de antibiótico/antimicótico, a 37°C com 5% de CO₂. Objetiva de 10x em microscópio óptico invertido. 68

Figura 28. Fotomicrografias mostrando o uptake pelas células 4T1 e SKBR3 após 24 horas de tratamento de lipossomas e imunolipossomas. A e B correspondem a lipossoma e imunolipossoma aplicados à célula 4T1, enquanto C e D correspondem a lipossoma e imunolipossoma aplicados à célula SKBR3. I corresponde fluorescência de DAPI, II de Dio e III corresponde à sobreposição dos dois marcadores. Objetiva de 63X foi empregada e os mesmos parâmetros de intensidade do laser e exposição foram utilizados. 73

Figura 29. Resultados obtidos na quantificação de fluorescência de Dio de lipossoma e imunolipossoma após 24 horas de tratamento nas linhagens 4T1 e SKBR3 pelo software Leica LAS X.	74
Figura 30. Resultados obtidos na avaliação do uptake celular de lipossomas e imunolipossomas por células 4T1 (A) e SKBR3 (B) após 24 h. I, controle de célula sem tratamento após 24h; II, células tratadas com lipossomas após 24h; III, células tratadas com imunolipossomas após 24h.	76
Figura 31. Porcentagem das células positivas para Dio e negativas para iodeto de propídio (Q4), tratadas com lipossoma e imunolipossoma após 24 h de incubação em células 4T1 e SKBR3.	76
Figura 32. Intensidade de fluorescência de Dio (intensidade de uptake) no quadrante Q4 de lipossoma e imunolipossoma após 24 h de incubação em células 4T1 e SKBR3.	77
Figura 33. Camundongo BALB-C com tumores de mama desenvolvidos após 14 dias de injeção de células 4T1.	78
Figura 34. Resultados obtidos na avaliação da eficácia terapêutica de grupos controle negativo, controle positivo com soluções dos fármacos e lipossomas em camundongos BALB/C com tumores de mama desenvolvidos com a célula 4T1. Os gráficos representam o acompanhamento do volume tumoral percentual (volume tumoral no momento da medida em relação ao volume tumoral inicial). As doses de PAC e RAP foram respectivamente de 5 mg/kg and 15 mg/kg administradas a cada 3 dias, totalizado 5 administrações no total. * ($p < 0,1$), **($p < 0,05$) e ***($p < 0,001$) (teste t de student).	79
Figura 35. Fotografia dos tumores de cada grupo experimental extraídos na biópsia ao final do estudo <i>in vivo</i> .	80
Figura 36. Ensaio imunohistoquímico com tumores de mama, realizado com teste do anticorpo anti-Ki67. a – controle negativo, b – PAC (solução), c – RAP (solução), d - PAC/RAP (solução), e - PAC (lipossoma), f - RAP (lipossoma) e g - PAC/RAP (lipossoma).	81
Figura 37. Registro da massa corporal dos animais ao longo do estudo <i>in vivo</i> .	82
Figura 38. Curva de sobrevivência dos animais ao longo do estudo <i>in vivo</i> .	83

Figura 39. Tumor xenográfico de câncer de mama induzido com a linhagem celular SKBR3 por injeção intramamária após 18 dias.	83
Figura 40. Curva de crescimento tumoral em modelo xenográfico desenvolvido com a linhagem celular SKBR3. Grupos administrados (2 vezes por semana, totalizando 6 administrações): controle negativo (salina), controle positivo (PAC e RAP, 5 e 15 mg/kg), lipossoma (PAC e RAP, 5 e 15 mg/kg) e imunolipossoma (PAC e RAP, 5 e 15 mg/kg). Teste estatístico two-way ANOVA com pós teste Bonferroni, $p < 0,1$ *, $p < 0,01$ ** e $p < 0,001$ ***. CP = controle positivo, L = lipossoma e IM = imunolipossoma.	85
Figura 41. Fotos dos tumores xenográficos HER2 positivos removidos ao final da última medida do volume tumoral. I - controle negativo, II - controle positivo, III - lipossoma e IV - imunolipossoma.	86
Figura 42. Registro da massa corporal dos camundongos ao longo do estudo in vivo em modelo xenográfico HER2 positivo.	87
Figura 43. Gráfico de sobrevivência dos camundongos ao longo do estudo in vivo.	87
Figura 44. Fotomicrografia de cortes histológicos dos grupos A (controle negativo), B (controle positivo), C (lipossoma) e D (imunolipossoma), marcados com hematoxilina-eosina (HE). As setas indicam células em mitose.	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Precisão (A) e exatidão (B) do método cromatográfico utilizado na análise de PAC	41
Tabela 2 – Precisão (A) e exatidão (B) do método cromatográfico utilizado na análise de MET	41
Tabela 3 – Precisão (A) e exatidão (B) do método cromatográfico utilizado na análise de RAP	41
Tabela 4 – Resultados de tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta para lipossomas preparados com SPC, Col, conjugados ou não ao DSPE-PEG (2000).	43
Tabela 5 – Resultados de eficiência de encapsulação para lipossomas preparados com SPC, Col, conjugados ou não ao DSPE-PEG (2000).	44
Tabela 6 – Resultados de tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta para lipossomas preparados DOPE, DOPE e AO, em diferentes razões e meios de hidratação.	46
Tabela 7 – Resultados de eficiência de encapsulação para lipossomas preparados com DOPE, DOPE e AO, em diferentes razões e meios de hidratação.	46
Tabela 8 – Resultados de tamanho de partícula (TP), potencial zeta (PZ) e porcentagem de encapsulação (EE) para lipossomas contendo MET preparados com diferentes composições lipídicas.	49
Tabela 9 – Resultados de tamanho de partícula (TP), polidispersividade (Pdl), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) para lipossomas contendo RAP preparados com diferentes composições lipídicas.	53
Tabela 10 – Desenvolvimento de imunolipossoma contendo PAC e/ou RAP: avaliação de eficiência de funcionalização, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta.	67
Tabela 11 – Valores de IC50 determinados pelo método do MTT para as linhagens celulares 4T1 e SKBR3.	69
Tabela 12 – Valores de índice de combinação (CI) para PAC e RAP em solução, lipossoma e imunolipossoma para as linhagens celulares 4T1 e SKBR3.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AO	Ácido oleico
CHEMS	Colesteril hemisuccinato
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Col	Colesterol
CV	Coeficiente de variação
DiO	3,3'-Diocetadeciloxacarbocianina perclorato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DPPC	Dipalmitoilposfatidilcolina
DP	Desvio padrão
DSC	Calorímetro Exploratório Diferencial
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DSPE-PEG-2000	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)-2000]
DSPE-PEG-Mal	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[maleimida(polietileno glicol)-2000] (sal de amônio)
EE	Eficiência de encapsulação
EPR	Enhanced Permeation and Retention
FTIR	Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier
HE	Hematoxilina-eosina
HER2	Receptor epidermal humano 2
IC50	<i>Half maximum inhibitory concentration</i>
ICH	International Council for Harmonisation
LsNa	Lauril Sulfato de Sódio
MET	Metformina hidrocloreto
mTOR	Via alvo da rapamicina
MTT	Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
PAC	Paclitaxel
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenimina
RAP	Rapamicina

RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RNAm	RNA mensageiro
SPC	Fosfatidilcolina de óleo de soja
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de Mama	2
1.2 Tratamento	3
1.3 Sistemas de Liberação de Fármacos: Lipossomas e Imunolipossomas	9
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material	20
3.1.1 Substâncias químicas	20
3.1.2 Linhagens celulares	21
3.1.3 Equipamentos e acessórios	21
3.2 Métodos	23
3.2.1 Validação de método analítico para quantificação de PAC, MET ou RAP	23
3.2.1.1 Seletividade	23
3.2.1.2 Linearidade	24
3.2.1.3 Precisão e exatidão	24
3.2.1.4 Limite de detecção e quantificação	25
3.2.2 Desenvolvimento dos lipossomas contendo PAC, MET, RAP ou PAC e RAP co-encapsulados	25
3.2.3. Desenvolvimento de imunolipossomas	26
3.2.4 Caracterização morfológica e físico-química dos sistemas desenvolvidos	27
3.2.4.1 Determinação da eficiência de encapsulação de MET, RAP e/ou PAC	27
3.2.4.2 Avaliação da eficiência de conjugação de anticorpo aos lipossomas	28
3.2.4.3 Avaliação da integridade primária do anticorpo por SDS-PAGE	29
3.2.4.4 Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersividade	29
3.2.4.5 Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética	29
3.2.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	30
3.2.4.7 Análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	30
3.2.4.8 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC)	30
3.2.4.9 Análises termogravimétricas (TGA)	30
3.2.4.10 Estabilidade coloidal	31
3.2.4.11 Perfil <i>in vitro</i> de liberação de fármacos	31
3.2.5 Experimentos em cultura celular	32
3.2.5.1 Avaliação de citotoxicidade nas linhagens celulares 4T1 e SKBR3)	32

3.2.5.2 Determinação do índice de combinação (CI)	32
3.2.5.3 Microscopia confocal.....	33
3.2.5.4 Citometria de fluxo	33
3.2.6 Estudos <i>in vivo</i>	34
3.2.6.1 Animais.....	34
3.2.6.2 Estudo de eficácia antitumoral em tumores triplo negativos de soluções de PAC ou RAP, lipossomas de PAC ou RAP, e lipossomas de PAC/RAP co-encapsulados	34
3.2.6.3 Estudo de eficácia antitumoral em tumores HER2 positivos de solução de PAC e RAP, lipossoma de PAC e RAP, e imunolipossoma de PAC e RAP.....	35
3.2.6.4 Avaliação histológica por coloração com hematoxilina-eosina (HE)	35
3.2.6.5 Avaliação imunohistoquímica com anticorpo anti Ki-67	36
3.2.6.6 Análises estatísticas.....	37
 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 38
4.1 Desenvolvimento e validação analítica de métodos para quantificação de PAC, MET ou RAP em lipossomas e imunolipossomas.....	39
4.2. Desenvolvimento de lipossomas contendo MET, RAP e/ou PAC	42
4.2.1 Desenvolvimento de lipossomas contendo PAC	42
4.2.2 Desenvolvimento de lipossomas contendo MET	49
4.2.3 Desenvolvimento de lipossomas contendo RAP e/ou PAC.....	51
4.3 Caracterização de lipossomas: liberação <i>in vitro</i>	54
4.3.1 Caracterização de lipossomas convencionais e pH sensíveis contendo PAC e comparação dos métodos da diálise e ultrafiltração	54
4.3.2 Caracterização de lipossomas convencionais contendo PAC e/ou RAP pela técnica da diálise	58
4.4 Caracterização de formulações: microscopia eletrônica de transmissão e estabilidade	59
4.5 Caracterização de lipossomas: FTIR	61
4.6 Caracterização de lipossomas: análises calorimétricas	62
4.7 Desenvolvimento e caracterização de imunolipossomas: funcionalização de lipossomas contendo PAC e/ou RAP com o anticorpo monoclonal trastuzumabe.....	64
4.8 Avaliação em cultura celular de lipossomas e imunolipossomas	67
4.8.1 Citotoxicidade nas linhagens celulares 4T1 e SKBR3.....	67
4.8.2 Avaliação do uptake celular em células 4T1 e SKBR3 : microscopia confocal e citometria de fluxo	71
4.9 Avaliação antitumoral de soluções, lipossomas e imunolipossomas <i>in</i> <i>vivo</i>	77
4.9.1 Estudo <i>in vivo</i> de eficácia antitumoral em modelo com tumores do tipo triplo negativos	77
4.9.2 Estudo <i>in vivo</i> de eficácia antitumoral em modelo xenográfico do tipo HER2 positivo.....	83
 5. CONCLUSÃO	 91
 6. REFERÊNCIAS.....	 94

1.1 Câncer de Mama

O câncer é uma enfermidade crônica, caracterizada pelo crescimento celular desordenado, resultante de alterações no código genético. Entre 5% a 10% das neoplasias são resultados diretos da herança de genes relacionados ao câncer, mas grande parte envolve danos ao material genético, de origem física, química ou biológica, que se acumulam ao longo da vida (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007).

Neste grupo heterogêneo de doenças, merece destaque o câncer de mama, que representa um grave problema de saúde pública. O câncer de mama é o mais incidente em mulheres, totalizando 25% do total de casos de câncer mundialmente em 2012, com aproximadamente 1,7 milhão de casos novos naquele ano. Representa a quinta causa de morte por câncer em geral (522.000 óbitos) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres (WHO 2012). No Brasil, também após os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais prevalente. Para o ano de 2014 foram estimados 57.120 casos novos, representando uma taxa de incidência de 56,1 casos por 100.000 mulheres (INCA 2014). Destaca-se que em países em desenvolvimento o câncer de mama causa mais mortes que a tuberculose e a AIDS, com o agravante de que nesses países existe menor acesso da população ao sistema de saúde e também às estratégias de prevenção (ANDERSON et al., 2007).

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento do câncer de mama. Dentre estes, a gordura corporal e, especificamente a deposição abdominal, podem exercer um papel importante no aumento da incidência, o que foi comprovado por um estudo que analisou 99.039 mulheres na pós-menopausa, nos Estados Unidos, e observou um aumento no risco de câncer de mama em mulheres que ganharam mais de 20 kg na idade adulta e também naquelas com índice de massa corpórea (IMC) a partir de 25kg/m^2 e circunferência abdominal ≥ 97 cm (AHN et al., 2007). Um maior ganho de estatura obtido até a idade adulta também pode correlacionar-se a riscos aumentados do desenvolvimento do câncer de mama, fenômeno este explicado pela maior exposição deste grupo de mulheres ao hormônio do crescimento, havendo, portanto, maior possibilidade de erros durante a replicação do DNA (NAVES; QUINTANILHA; INUMARU, 2008). A ingestão de álcool

Introdução

também representa um fator de risco para o câncer de mama, tanto em mulheres na pré-menopausa quanto na pós-menopausa, já que este pode agir como agente carcinogênico (TERRY et al., 2007). Por último, a associação dos fatores relatados está relacionada com o aumento de incidência de casos do câncer de mama no período pós-menopausa, primeira gestação após os 30 anos e sedentarismo (PORTER, 2008; BRAY, MACCARRON, PARKIN, 2004).

A severidade do câncer de mama, refletida por altos números de mortalidade em decorrência da patologia em todo o mundo, está relacionada ao surgimento de metástases, devido ao alto grau de malignidade apresentado por estes tumores (CHANG et al., 2007). Em sua fase metastática, verifica-se um aumento de 70% na mortalidade, sendo a principal causa de morte em pacientes com este tipo de patologia (MARSDEN, 2012). Um fator agravante deste quadro é que a metástase pode permanecer indetectável por meses até anos, resultando em recorrência no sítio primário da doença e/ou no desenvolvimento de lesões metastáticas em locais distantes (ALLAN et al., 2008). O tumor de mama metastático, desenvolvido por 30 a 40% dos pacientes, representa um grave problema, considerando que a maior parte dos pacientes morre devido aos tumores metastáticos e não devido ao tumor inicial. Neste contexto, o objetivo da terapia visa à redução da progressão da doença, de modo a aumentar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência (CHOLLET et al., 2006; ZHENG et al., 2010). Por este motivo, justifica-se o desenvolvimento de medicamentos e estratégias terapêuticas que consigam erradicar o tumor em seus estágios iniciais, impedindo a progressão para a fase metastática, associada ao um prognóstico desfavorável.

1.2 Tratamento

O tratamento do câncer de mama primário é complexo e depende da análise das características bioquímicas do tumor, já que esta doença é bastante heterogênea, o que influencia diretamente o tipo de tratamento mais adequado. O tratamento se inicia por meio de intervenções cirúrgicas, que abrangem a mastectomia total ou parcial, bem como a remoção dos gânglios linfáticos de regiões adjacentes. São utilizados ainda, tratamentos radioterápicos e diversos tratamentos

Introdução

quimioterápicos, incluindo as terapias citotóxicas e hormonais e, mais recentemente, as terapias imunoterápicas, entre outras (TANAKA et al., 2009).

A presença de marcadores específicos tem sido investigada nos últimos anos e os principais grupos identificados são o receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor epidermal humano 2 (HER2). A combinação destes marcadores permite uma subclassificação em categorias individuais com características bastante específicas, RE+ (RE+/HER2-), HER2+ (RE-/HER2+), triplo negativo (RE-/RP-/HER2-) e triplo positivo (RE+/RP+/HER2+) (BERTOS; PARK, 2011).

Os tumores que expressam RE podem responder à terapia hormonal, ou antiestrogênica, que incluem os inibidores da aromatase ou os antagonistas de RE (JORDAN; BRODIE, 2007). A terapia hormonal tem se mostrado bastante eficaz na redução do risco de reincidência deste tipo de tumor, bem como no aumento do número de pacientes que atingem 10 anos de sobrevivência após o diagnóstico (AAPRO, 2001). Em estágios iniciais do câncer de mama, o tamoxifeno, um antagonista de RE, produz 25% de redução nas taxas de recidiva e uma redução de 17% das taxas de mortalidade. Entretanto, um sério problema associado a essa terapia é o desenvolvimento de resistência durante o tratamento, observado em quase todos os pacientes tratados com este fármaco durante várias semanas ou meses (ZEIZIG; RÜCKERL; FICHTNER, 2004). O subtipo RP, geralmente correlacionado com o subtipo RE, tem menor significância clínica. O subtipo RP parece não se beneficiar de uma terapia hormonal (BARTLETT, 2011).

O HER2 é um receptor com domínio intracelular do tipo tirosina quinase, e um domínio extracelular ligante, e está envolvido em importantes etapas no crescimento e diferenciação celular. Como gene chave na sobrevivência celular, sua superexpressão pode levar à transformação maligna e associar-se diretamente a um prognóstico clínico desfavorável dos cânceres de mama, ovário, gástrico, próstata, entre outros (TAI; MAHATO; CHENG, 2010). A superexpressão de HER2 está presente em aproximadamente 25% de todos os casos de câncer de mama e geralmente está associada a um tumor com fenótipo mais agressivo e resistência aumentada à terapia endócrina (ENGEL; KACLAMANI, 2007). Estudos mostraram que a inibição da expressão de HER2 induziu apoptose significativa em células do

Introdução

câncer de mama, por isso, o HER2 tornou-se um alvo lógico para a terapia desta neoplasia (FALTUS, 2004; YANG, 2004).

Um importante marco no tratamento do câncer de mama foi o desenvolvimento do anticorpo monoclonal humanizado contra HER2, chamado trastuzumabe (Herceptin®), que foi aprovado em 1998 pelo FDA para o tratamento do câncer de mama HER2-positivo (SHAWYER; SLAMON; ULRICH, 2002). A terapia adjuvante com o trastuzumabe melhora significativamente a sobrevivência geral comparada à quimioterapia. No câncer de mama metastático, o trastuzumabe é aprovado em combinação com paclitaxel, o que melhora consideravelmente a taxa de resposta, o tempo de progressão da doença e a sobrevida em pacientes com câncer de mama HER2-positivo (CHANG et al., 2010). Por último, o trastuzumabe é considerado uma revolução no tratamento do câncer de mama, sendo que uma porção significativa de pacientes com doença metastática alcançam remissão a longo prazo após a terapia (YEO et al., 2015).

A quimioterapia é utilizada no tratamento de câncer de mama com presença de metástase, quando a patologia evolui para um estado que ameaça a qualidade de vida, por exemplo, quando órgãos viscerais são afetados. A escolha do fármaco ou do regime terapêutico é bastante criteriosa, e envolve, dentre outros fatores, o período em que o paciente ficou sem tratamento, que pode predizer a resistência a fármacos, a idade, o estado geral do paciente e a função de alguns órgãos, como rins, fígado e medula óssea. Os agentes usados são bastante variados e incluem as antraciclinas (epirubicina e doxorrubicina), os taxanos (paclitaxel e docetaxel) ou ainda, outros agentes terapêuticos, como a capecitabina, vinorelbina, gencitabina e os fármacos compostos de platina (cisplatina e carboplatina) (JOHNSTON et al., 2011).

Os taxanos, como o paclitaxel (Figura 01), são considerados um dos grupos de compostos mais ativos em uso na clínica para o tratamento do câncer de mama e seu mecanismo de ação se dá através da estabilização dos microtúbulos celulares prevenindo a despolimerização, impedindo, assim, a segregação mitótica e interrompendo o ciclo celular, levando à apoptose (GHERSI et al., 2003). Apesar de o paclitaxel ser um dos compostos mais importantes empregados hoje na terapia do câncer de mama, uma formulação adequada para este fármaco ainda representa um problema. O paclitaxel é um fármaco lipofílico com baixo índice terapêutico. A

Introdução

preparação comercial injetável disponível no mercado, Taxol[®], é uma solução estéril de paclitaxel em Cremophor EL[®] (óleo de mamona polietoxilado) e álcool desidratado. O tratamento empregando esta formulação está associado a reações de hipersensibilidade causadas pelo tensoativo, apesar da pré-medicação com corticoides e anti-histamínicos. Deste modo, o desenvolvimento de um sistema de liberação seguro e eficaz para o paclitaxel é de extrema importância (KOULDELKA, 2010). Ademais, a formulação requer frascos não plastificados, devido ao vazamento do plastificante dietilexilftalato, causado pelo contato da formulação com a embalagem plástica (YOSHIZAWA et al., 2011).

Figura 01. Estrutura química do paclitaxel.

Outros fármacos, além dos quimioterápicos tradicionais, recentemente têm ganhado atenção como opções para o tratamento do câncer de mama. O diabetes do tipo 2 é um fator de risco para diversas doenças malignas, como o câncer de mama, já que a transformação maligna está associada com taxas aumentadas do transporte de glicose e de glicólise, além de aumento da gliconeogênese, levando a mobilização de açúcar para a célula cancerígena em rápido processo de multiplicação. Por outro lado, o tratamento da diabetes com metformina hidrocloreto (Figura 02), um derivado de biguanida de característica hidrofílica, está associado com redução no risco do câncer e melhora na resposta do câncer de mama à quimioterapia (ALJADA; MOUSA, 2011).

Os mecanismos envolvidos estão relacionados à ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que inibe a síntese de proteínas e a gliconeogênese durante o estresse celular (ALJADA; MOUSA, 2011). Em alguns estudos a metformina hidrocloreto foi capaz de reprimir significativamente o crescimento de um

Introdução

grande número de linhagens celulares, incluindo células de câncer de mama. Em ratos, a metformina também reduziu o crescimento de tumores xenográficos desenvolvidos a partir de linhagens celulares de câncer de mama e suprimiu o desenvolvimento de tumores mamários em ratos transgênicos. Adicionalmente, demonstrou-se que este fármaco interage sinergicamente com o anticorpo monoclonal anti-HER2 para eliminar as linhagens tronco/progenitoras de células de carcinoma de mama com o gene HER2 amplificado. Todavia, estudos adicionais são necessários para comprovar a utilidade da combinação da terapia do trastuzumabe com a metformina hidrocloreto (ALJADA; MOUSA, 2011). Porém, a metformina hidrocloreto (Figura 2) é uma molécula pequena e hidrofílica, podendo apresentar diversas desvantagens, incluindo a baixa biodisponibilidade, limitando sua eficácia (ELOY et al., 2014a).

Figura 02. Estrutura química da metformina hidrocloreto.

A via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), representada na Figura 03, tem papel central na regulação da tradução do RNA mensageiro (RNAm), síntese proteica, metabolismo da glicose e síntese lipídica, e está envolvida na transformação maligna (VICIER et al., 2014). Consequentemente, as propriedades antitumorais da rapamicina (Figura 04), também conhecida como sirolimus, um antibiótico macrolídico lipofílico e potente inibidor mTOR, foram extensivamente exploradas em estudos pré-clínicos e clínicos em câncer de mama e os resultados mostraram a melhora do prognóstico de pacientes (VICIER et al., 2014; BLANCO et al., 2014). Estudos clínicos já demonstram que derivados de rapamicina podem superar a resistência ao trastuzumabe, desenvolvida por muitos pacientes (VICIER et al., 2014).

Introdução

Figura 03. Representação da via mTOR. A ligação entre receptor e ligante ativa a via PI3K/Akt/mTOR. O mTOR regula as atividades dos reguladores de tradução 4E-BP1 e da quinase p70. Akt também ativa outros alvos implicados na sobrevivência e inibição da apoptose, incluindo NFκB e Bad (adaptado de MITA et al., 2003).

O sinergismo entre rapamicina e vários quimioterápicos já foi demonstrado, com aumento da eficácia observado com o paclitaxel. Particularmente, a rapamicina já foi reportada por melhorar a resistência ao tratamento com paclitaxel, agindo como um agente reversor de resistência (MONDESIRE et al., 2004; VANDERWEELE et al., 2004). Sabidamente a rapamicina pode superar a resistência a fármacos substratos da glicoproteína P, como o paclitaxel, através da capacidade da rapamicina em inibir esta proteína (YOSHIZAWA et al., 2014; PAWARODE et al., 2006). Estudos clínicos de fase I e II demonstraram que o fármaco everolimus, derivado da rapamicina, combinado com paclitaxel e trastuzumabe, foi bem tolerado e apresentou resultados promissores de atividade antitumoral em pacientes com câncer de mama HER2 positivo. Esta combinação está atualmente sendo investigada no estudo clínico de fase III, BOLERO-1 (ANDRE et al., 2010; HURVITZ et al., 2013). Além destes, vários outros estudos de combinação entre paclitaxel e derivados de rapamicina já foram completados ou estão em andamento

(<https://clinicaltrials.gov>). Todavia, a rapamicina apresenta problemas, como a baixa solubilidade aquosa, limitando a biodisponibilidade oral. Além disso, o fármaco sofre sequestro por eritrócitos e é quimicamente instável, o que em conjunto limita o emprego na terapia do câncer (YATSCOFF 1996; MITA et al., 2003)

Figura 04. Estrutura química da rapamicina.

1.3 Sistemas de Liberação de Fármacos: Lipossomas e Imunolipossomas

Os efeitos colaterais são um dos principais problemas relativos aos fármacos antineoplásicos empregados no tratamento do câncer de mama na atualidade, a exemplo da formulação convencional de paclitaxel, o Taxol[®]. Com o intuito de resolver este problema e melhorar a eficiência dos tratamentos quimioterápicos, duas estratégias podem ser empregadas. A primeira delas é o caminho mais lento e caro, que é o desenvolvimento de novas moléculas, mais específicas e seguras (LI; WALLACE, 2008). A segunda estratégia envolve o desenvolvimento de sistemas nanocarreadores (KARATHANASIS, 2008). Esta é uma alternativa que vem sendo amplamente explorada, em virtude dos menores custos e tempo requeridos para seu desenvolvimento.

Os sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia têm ganhado espaço crescente na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos porque permitem diversas vantagens em relação aos usos convencionais dos fármacos. Estes sistemas podem reduzir os efeitos colaterais do fármaco, aumentar o tempo de circulação deste no sangue, permitindo a redução de dose, além de facilitar a sua administração, garantir ou melhorar a adesão do paciente à terapia, diminuir a toxicidade do fármaco e aumentar sua biodisponibilidade. No sítio alvo, os nanocarreadores podem acumular-se em maiores concentrações que o fármaco

Introdução

convencional, devido ao menor tamanho, aumentando, potencialmente, a eficácia terapêutica do fármaco em questão (SARAIVA et al., 2011).

Diversos sistemas nanocarreadores de fármacos estão sendo estudados para o tratamento de neoplasias, como sistemas lipídicos, lipossomas e partículas lipídicas sólidas, sistemas poliméricos, micelas, dendrímeros, nanocápsulas e nanoesferas e sistemas inorgânicos, como as nanopartículas cerâmicas (ORIVE, 2005). Neste contexto, novas formulações têm sido desenvolvidas para melhorar a eficácia e diminuir a toxicidade associada com o paclitaxel. Nab-paclitaxel é uma formulação livre de solvente, aprovada pelo FDA para uso nos Estados Unidos, composta por nanopartículas de albumina ligadas ao fármaco, com diâmetro na ordem de 130 nanômetros (Abraxane[®], Abraxis Bioscience), que foi desenvolvida para evitar a toxicidade do Cremophor EL[®] usado na formulação convencional do paclitaxel. Em um estudo clínico de fase III, o nab-paclitaxel demonstrou altas taxas de resposta, melhor segurança e menos efeitos colaterais comparado ao paclitaxel convencional, além de aumentar a taxa sobrevivência dos pacientes (VISHNU; ROY, 2011).

Dentre os sistemas de liberação, um dos mais seguros e efetivos são os lipossomas, que são estruturas vesiculares compostas por bicamada lipídica unilamelar ou multilamelar, cercando um compartimento interno aquoso, e uma camada externa fosfolipídica lipofílica relativamente impermeável (Figura 05). Lipossomas têm recebido considerável atenção como sistemas carreadores de fármacos devido à sua biocompatibilidade, atoxicidade, e pelo fato importante de permitirem encapsular moléculas hidrofílicas (como a metformina hidrocloreto) e lipofílicas (como o paclitaxel e rapamicina), protegendo o seu conteúdo da degradação por enzimas plasmáticas (SPUCH; NAVARRO, 2011).

Introdução

Figura 05: Representação esquemática da estrutura básica do lipossoma unilamelar (a) e lipossoma multilamelar (b) (adaptado de SPUCH; NAVARRO, 2011).

Deve-se considerar os lipossomas são os sistemas de liberação mais comumente empregados, sendo que os avanços na pesquisa levaram ao desenvolvimento de diversos produtos para medicina humana, disponíveis atualmente no mercado para tratamento de diversas doenças, particularmente o câncer. Além disso, muitas outras formulações lipossômicas de fármacos encontram-se atualmente em diferentes estágios de testes clínicos (ALLEN e CULLIS, 2013).

Apesar das formulações lipossômicas serem consideradas das mais promissoras como sistemas de liberação de fármacos, em função da associação do fármaco com o carreador lipídico, que resulta em melhora acentuada da farmacocinética do fármaco, os lipossomas convencionais são rapidamente eliminados pelo sistema reticular endotelial. Este inconveniente pode ser resolvido pela modificação da superfície do lipossoma com polímeros flexíveis hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), permitindo o mascaramento da fagocitose por macrófagos, o que causa a circulação sanguínea por tempos maiores. Assim, a nanopartícula passivamente se acumula no tumor sólido através do efeito de

Introdução

retenção e permeabilidade aumentadas dos vasos sanguíneos fenestrados que irrigam o tumor (efeito EPR, *Enhanced Permeation and Retention*) (MATSUMURA e MAEDA, 1986; FANG et al., 2011).

Especificamente para o paclitaxel, foram desenvolvidas diferentes formulações como lipossomas convencionais, lipossomas estereamente estabilizados, ou seja, PEGlados, lipossomas catiônicos, magnetolipossomas e imunolipossomas, as quais têm se mostrado mais efetivos que a formulação convencional (KOULDELKA, 2010; CROSASSO et al., 2000; ZHANG et al., 2005; YANG et al., 2007a; YANG et al., 2007b). Apesar de haver menor número de relatos na literatura, lipossomas contendo rapamicina também já foram descritos demonstrando a importância do uso de lipossomas para a liberação sustentada deste fármaco (HAERI et al., 2011).

A associação entre paclitaxel e rapamicina em sistemas de liberação foi reportada por BLANCO et al., (2014), que co-encapsularam rapamicina e paclitaxel em nanopartículas poliméricas. Os resultados mostraram que a abordagem de combinar os fármacos no sistema de liberação, capaz de liberá-los ao mesmo tempo, no mesmo local e em quantidades específicas, permite o sinergismo entre os fármacos para a inibição tumoral. Todavia, até antes da realização do estudo que compõe a presente tese não havia publicação reportando a co-encapsulação de paclitaxel e rapamicina em lipossomas, uma potencial estratégia para o tratamento do câncer (ELOY et al., 2016a).

Dentre as estratégias para a potencialização da biodisponibilidade de fármacos encapsulados tem ganhado destaque o uso de técnicas que possibilitem que os lipossomas liberem o fármaco no ambiente intracelular. Lipossomas desta classe são conhecidos como pH sensíveis, pois são estáveis em pH fisiológico (7,4), porém sofrem desestabilização e adquirem propriedades fusogênicas e liberam seu conteúdo sob condições ácidas, como por exemplo aquela encontrada em lisossomas no interior celular (Figura 06) (KARANTH, MURPHY, 2007).

Figura 06. Mecanismo hipotético de internalização e liberação intercelular de lipossomas pH sensíveis (adaptado de SIMOES et al., 2004).

Dentre os lipídios que podem ser aplicados na formulação de lipossomas pH sensíveis, o mais comum é o dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), que em ambiente aquoso não forma a bicamada lipídica, em função da sua geometria cônica. Por outro lado, a intercalação de grupamentos ácidos fracos, como o colesterol hemisuccinato (CHEMS) ou o ácido oleico (AO) permitem repulsão eletrostática entre os grupamentos polares do DOPE e formação da bicamada, com consequente organização da estrutura em forma de lipossoma. Uma vez sob condições ácidas, como por exemplo no interior de tumores sólidos, o grupamento ácido fraco sofre protonação, perdendo sua carga, o que desestabiliza a vesícula, levando a desestabilização e fusão dos lipossomas. Neste contexto, lipossomas pH sensíveis contendo DOPE já demonstraram um grande potencial em aumentar a liberação citoplasmática de fármacos para várias doenças, com destaque para o câncer (SUDIMACK et al., 2002; KARANTH, MURPHY, 2007).

Outra vantagem dos sistemas de liberação nanoestruturados, como os lipossomas, que merece destaque é a possibilidade de permitir a liberação do

Introdução

fármaco no sítio alvo de maneira específica, o que pode servir como estratégia para redução dos efeitos colaterais do mesmo e para permitir a administração do medicamento em menores doses (PARK et al., 2001). A sítio-especificidade pode ser alcançada por meio da presença de ligantes específicos na superfície do sistema nanocarreador, que se ligam a receptores específicos do alvo terapêutico, como as células tumorais. Este direcionamento ativo do fármaco ao seu alvo terapêutico aumenta a seletividade da liberação da molécula (HIRSJARVI; PASSIRANI; BENOIT, 2011).

O planejamento das nanopartículas funcionalizadas leva em consideração os receptores superexpressos na superfície da célula alvo, e assim diversos ligantes têm sido reportados para a funcionalização, por exemplo, folato, transferrina, peptídeos de transdução de membrana, sacarídeos e particularmente anticorpos monoclonais (PETRILLI e ELOY et al., 2014). A conjugação à superfície de lipossomas com anticorpos monoclonais, originando imunolipossomas, específicos para um antígeno altamente expresso no alvo terapêutico do fármaco é uma estratégia bastante vantajosa, já que permite a liberação do conteúdo dos lipossomas seletivamente às células cancerosas, minimizando a citotoxicidade do fármaco em tecidos normais com baixa expressão do antígeno, reduzindo efeitos colaterais e permitindo a administração do medicamento em menores doses (PARK et al., 2001). Anticorpos ligados à superfície de nanocarreadores tem relevância no tratamento do câncer de mama, visto que a alta expressão de HER2 e a acessibilidade dos seus domínios extracelulares tornam-no um alvo ideal para a liberação sítio-específica de fármacos antitumorais. Apesar de não existirem ligantes naturais para o HER2, ligantes artificiais, como o trastuzumabe, têm sido desenvolvidos e aplicados em vários sistemas de liberação sítio-específicos (TAI; MAHATO; CHENG, 2010).

Neste contexto, a conjugação à superfície de lipossomas com anticorpos monoclonais, originando imunolipossomas (exemplificados na Figura 07) pode representar uma estratégia eficaz para o tratamento do câncer de mama. Por exemplo, imunolipossomas funcionalizados com o anticorpo anti-HER2 contendo doxorubicina, para o câncer de mama, se mostraram superiores a lipossomas, fármaco livre e anticorpo livre em estudos *in vivo* (PARK et al., 2002). Imunolipossomas PEGlados carreando paclitaxel e funcionalizados com o anticorpo

Introdução

anti-HER2 foram desenvolvidos por YANG et al. (2007b) e promoveram liberação intracelular eficiente do fármaco através de endocitose mediada por receptor. No mesmo ano, os autores publicaram um estudo comparativo de lipossomas e imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe, contendo paclitaxel, avaliado em modelo xenográfico HER2 negativo e positivo. A conclusão foi que o imunolipossoma melhorou o efeito antitumoral de paclitaxel nos tumores HER2 positivos, em função da endocitose da nanoestrutura mediada por interação anticorpo e receptor (YANG et al., 2007c).

SAPRA e SHOR, em 2013, revisaram a avaliação pré-clínica e clínica de imunolipossomas e concluíram que um número muito limitado de imunolipossomas chegou efetivamente a estudos clínicos, o que motiva pesquisas adicionais para que esta classe de sistemas de liberação possa efetivamente chegar ao mercado. Destaca-se que imunolipossomas carreadores de metformina hidrocloreto ou rapamicina, associados ou não a paclitaxel, ainda não foram descritos, e representam um aspecto inovador do presente trabalho.

Figura 07. Representação esquemática de um imunolipossoma (adaptado de FENG et al., 2010).

Objetivos

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi o desenvolvimento de lipossomas carreadores de paclitaxel, associado ou não a metformina hidrocloreto ou rapamicina, visando ao tratamento de câncer de mama. Ainda, contempla-se o preparo de imunolipossomas, através da ligação covalente de lipossomas com o anticorpo monoclonal trastuzumabe. Propõe-se o desenvolvimento e caracterização físico-química dos sistemas desenvolvidos, bem como a avaliação da atividade anticâncer em estudos *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Validação de método analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrofotometria para quantificação, respectivamente, de paclitaxel, metformina hidrocloreto ou rapamicina, em lipossomas e imunolipossomas;
- Desenvolvimento de lipossomas contendo paclitaxel: comparação de formulações convencionais e pH sensíveis;
- Desenvolvimento de lipossomas contendo metformina hidrocloreto ou rapamicina;
- Desenvolvimento de lipossomas contendo paclitaxel e rapamicina co-encapsulados;
- Desenvolvimento de imunolipossomas, contendo paclitaxel e/ou rapamicina;
- Avaliação da eficiência de funcionalização e integridade do anticorpo de imunolipossomas;
- Caracterização físico-química dos sistemas obtidos utilizando distribuição de tamanho de partícula e polidispersividade, potencial zeta, espectroscopia do infravermelho, análises calorimétricas,

Objetivos

microscopia eletrônica de transmissão e perfil *in vitro* de liberação (comparação das técnicas da diálise e ultrafiltração para paclitaxel);

- Avaliação da citotoxicidade e índice de combinação de paclitaxel e rapamicina das formulações nas linhagens celulares 4T1 (triplo negativa) e SKBR3 (HER2 positiva);
- Avaliação do *uptake* das nanopartículas por microscopia confocal e citometria de fluxo em linhagem celular 4T1 e SKBR3;
- Avaliação *in vivo* da eficácia antitumoral em camundongos com câncer de mama induzidos com a linhagem 4T1 (avaliação da curva de crescimento tumoral, peso dos animais e sobrevivência ao longo do estudo);
- Avaliação *in vivo* da eficácia antitumoral em camundongos imunossuprimidos com câncer de mama induzidos com a linhagem SKBR3 (avaliação da curva de crescimento tumoral, peso dos animais e sobrevivência ao longo do estudo);
- Análise imunohistoquímica dos tumores pela técnica do anticorpo anti-KI67 e análise histológica pela técnica da coloração com hematoxilina-eosina (HE).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Substâncias químicas

- Acetonitrila, grau HPLC – J.T.Baker;
- Ácido bicinconínico, BCA (kit) – Fisher;
- Ácido clorídrico P.A. – Synth;
- Ácido oleico (AO) – Sigma;
- Água MilliQ (filtro Gradient) – Millipore;
- Anticorpo Rb Anti-Ki-6 (SP6) Mab – Spring;
- Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) – Sigma;
- Clorofórmio –Fisher;
- Colesterol (Col) – Sigma;
- Coluna dessalinizadora PD-10 - Life;
- Coluna C-18, 5µm, 250 mm – Merck;
- Coomassie blue – Biorad;
- Dioctadeciloxacarbocianina perclorato (DiO) – Sigma;
- Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) – Lipoid;
- Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma;
- Dipalmitoilposfatidilcolina (DPPC) – Lipoid;
- 1,2-distearol-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenoglicol)-2000] (DSPE-PEG 2000) – Avanti;
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N[maleimida(polietileno glicol)-2000] (sal de amônio) (DSPE-PEG-Mal) – LaySan Bio;
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) – Lipoid;
- Etanol absoluto – Fisher;
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. – Synth;
- Fosfatidilcolina de óleo de soja (SPC) – Lipoid;
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HPC) – Lipoid;
- Gel pronto Tris-HCl – Biorad;
- Hidróxido de sódio P.A. – Synth;
- Kit para imunohistoquímica REVEAL Biotin Free Polyvalent DAB - Spring;

Material e Métodos

- Lauril sulfato de sódio (LSNa) – Henrifarma;
- 2-mercaptoetanol – Biorad;
- Metanol, grau HPLC – J.T.Baker;
- Metformina hidrocloreto (MET) – Merck;
- Paclitaxel (PAC) - APIchem;
- Paclitaxel P.A – Sigma;
- Padrão Precision Plus Protein Dual Color – Biorad;
- Polietilenimina (PEI) – Sigma;
- Prolong Diamond – Life;
- Rapamicina (RAP) – Fisher;
- Reagente de Traut – Fisher;
- Meio de cultura RPMI 1640 – Gibco;
- Sefarose 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 Laemmli 4X – Biorad;
- Tampão Tris/ Glicina/ SDS 10X – Biorad;
- Trastuzumabe (Herceptin®) – gentilmente cedido pelo Hospital das Clínicas da FMRP e pelo Hospital da Ohio State University;
- Tripsina 0,25% - Gibco;
- Triton X-100 – Sigma;
- Xilol – Fisher.

3.1.2 Linhagens celulares

- SK-BR-3 (ATCC®HTB-30™) - ATCC
- 4T1 (ATCC®CRL-2539™) - ATCC

3.1.3 Equipamentos e acessórios

Material e Métodos

- Agitador de tubos MS1 minishaker - IKA;
- Agitador magnético Lab disk - IKA;
- Agitador magnético MAG MULTI - Marte;
- Agitador ultraturrax – IKA;
- Analisador termogravimétrico 4000 – Perkin Elmer;
- Balança analítica Adventurer™ - Ohaus;
- Balança semi-analítica AS 2000C - Marte;
- Banho-Maria Q 335D - Quimis;
- Banho ultrassônico – Quimis;
- Calorímetro Exploratório Diferencial (DSC) Jade – Perkin Elmer;
- Câmera acoplada ao microscópio óptico Axiocam HRC – Zeiss;
- Centrífuga – Eppendorf;
- Citômetro de fluxo - FACSCanto I;
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência constituído por uma bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10AVP injetor Rheodyne e integrador Chromatopac modelo C-R6A - Shimadzu;
- Cubas eletroforéticas Mini-PROTEAN - Bio-Rad;
- Dissolutor SR8 Plus - Hanson Corporation;
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) IRPrestige-21 – Shimadzu;
- Espectrofotômetro de UV-VIS UV160U – Shimadzu;
- Estufa de cultivo celular – Thermo;
- Extrusora – Northern lipids;
- Homogeneizador a alta pressão C8 – Avestin;
- Leitor de placa de Elisa – Thermo;
- Leitor de tamanho de partícula e potencial zeta Zetasizer 3000 HSA - Malvern Instruments;
- Medidor de pH DM 20 - Digimed;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 20 a 200 µL, 100 a 1000 µL e 1 a 5 mL – Finn timer;
- Microscópio confocal SP8 – Leica;
- Microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CX2 – JEOL;

- Microscópio invertido - Leica;
- Microscópio óptico Axioplan 2 Image - Zeiss
- Micróto mo rotativo HM 315R – Microm;
- Rotaevaporador RE 500 – Yamato.

3.2. Métodos

3.2.1 Validação de método analítico para quantificação de PAC, MET ou RAP

Para a análise de PAC, foi empregado o método por CLAE descrito por YANG et al., 2007a. A análise foi realizada com coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm), com fase móvel composta por acetonitrila e água (50:50, v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, temperatura controlada de 25°C e detecção no UV (comprimento de onda de 227 nm). Para a quantificação de MET em lipossomas, empregou-se o método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com fase móvel composta por acetonitrila:água, 50:50 contendo 3 mM de LSNa, sob o fluxo de 1,6 mL min⁻¹, em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm) com injeção de 20 µL a 25°C e comprimento de onda de 236 nm, cujas condições foram determinadas experimentalmente, seguindo os estudos de GABR, PADWAL, BROCKS (2010) com alterações. Para a análise de RAP, empregou-se método espectrofotométrico, no comprimento de onda de 277 nm.

Para a validação de cada método foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação, seguindo as especificações da ANVISA e recomendações do ICH Harmonised Tripartite Guideline.

3.2.1.1 Seletividade

A seletividade foi determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras de fármaco acrescidas de quantidades apropriadas dos excipientes empregados nos lipossomas e análise das formulações sem o fármaco (placebos). No caso do método para quantificação de RAP, também foi avaliada a influência de

PAC como interferente no método, considerando o posterior preparo de lipossomas contendo PAC e RAP co-encapsulados.

3.2.1.2 Linearidade

A partir da solução estoque de cada fármaco foram preparadas soluções em concentrações de 0,5, 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para PAC, 0,25; 0,50; 1,0; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para MET, e de 0,50; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para RAP. As curvas analíticas foram construídas relacionando os valores da concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$, no eixo das abscissas com os valores das áreas para PAC e MET e absorvância para RAP obtidas no eixo das ordenadas. O intervalo linear foi calculado através da verificação da proporcionalidade entre a concentração e a resposta a partir do cálculo do coeficiente linear (b), do coeficiente angular (a) e do coeficiente de correlação (r) (r mínimo aceitável foi de 0,99).

3.2.1.3 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e precisão intermediária. A exatidão foi avaliada intra e interensaio. Para avaliar estes parâmetros, foram utilizadas soluções de padrão de PAC (0,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), MET (0,25; 1,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ou RAP (0,50; 1,0 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para a determinação da repetibilidade e da exatidão intraensaio, as análises de 10 replicatas foram realizadas em um mesmo dia, já a exatidão interensaios e precisão intermediária foram avaliadas em triplicata, por três dias consecutivos. Os resultados da precisão do método foram apresentados através do coeficiente de variação (CV), calculado pela razão do desvio padrão com a média dos valores obtidos.

Os resultados da precisão do método foram apresentados através do coeficiente de variação (CV) obtido pela Equação 1.

$$CV\% = \frac{s}{X} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: s = desvio padrão; X = média dos valores obtidos

Os resultados da exatidão intra e interensaios foram obtidos através da Equação 2.

$$E = \frac{\text{valor obtido} - \text{valorteórico}}{\text{valorteórico}} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

3.2.1.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção foi determinado através do sinal / ruído da linha de base através da Equação 3

$$LD = DP_a \times \frac{3}{IC} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: DP_a = desvio padrão médio do intercepto com o eixo y de no mínimo 3 curvas padrão e IC = inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração obtida com precisão e exatidão.

3.2.2 Desenvolvimento dos lipossomas contendo PAC, MET, RAP ou PAC e RAP co-encapsulados

Os lipossomas compostos por SPC e Col (convencionais), contendo ou não DSPE-PEG-2000, e os lipossomas compostos por DOPE e AO (pH sensíveis), foram preparados de forma a conter PAC e lipídios na razão molar de 1:33, de acordo ao trabalho prévio de YANG et al. (2007a). A razão em quantidade molar de SPC e de Col, para os lipossomas convencionais, e de DOPE e AO, para os lipossomas pH sensíveis, foram determinadas experimentalmente, enquanto que a quantidade de DSPE-PEG (2000) manteve-se fixa para os lipossomas convencionais, equivalendo a 5 mol%. Os lipídios empregados no preparo de lipossomas contendo MET foram SPC, DSPC, DPPC, DOPE e AO, contendo ou não Col e DSPE-PEG (2000).

Estudou-se a razão de fármaco/lipídio e a adição de lipídio com carga negativa, AO, e positiva, PEI, para a otimização da encapsulação. No caso da encapsulação de RAP, os lipídios empregados foram SPC, DSPC, DPPC, DOPE e AO, contendo ou não Col e DSPE-PEG (2000). A melhor razão de fármaco para lipídio foi determinada. Por último, preparou-se lipossoma composto por SPC, Col, DSPE-PEG (2000) contendo PAC e RAP co-encapsulados.

O preparo dos lipossomas seguiu o método clássico da hidratação do filme lipídico descrito por BANGHAM et al., 1965. No caso dos fármacos lipofílicos, PAC e RAP, os lipídios e os fármacos foram dissolvidos em 2 mL clorofórmio, o qual foi removido por pressão reduzida em rotaevaporador de forma a restar fina película após 30 min a 65°C, sendo na sequência hidratados durante 30 min a 150 rpm por fase aquosa constituída por tampão fosfato (pH 7,4) No caso do fármaco hidrofílico MET, este foi dissolvido na fase aquosa composta por tampão fosfato, pH 7,4, que posteriormente foi empregada para hidratação do filme lipídico.

Em seguida, as formulações foram submetidas à homogeneização em ultrassom por 10 min e foram homogeneizadas em homogeneizador de alta pressão (Avestin), a 1000 bar, por 30 min para MET, ou foram extruídas sob pressão 5 vezes em membrana de 0,2 µm e 3 vezes em membrana de 0,1 µm, para PAC e RAP. Os fármacos não encapsulados foram separados por centrifugação a 1000 rpm por 10 min, filtração em 0,44 µm (filtros PVDF) e por cromatografia de gel filtração em coluna CL-4B.

3.2.3 Desenvolvimento de imunolipossomas

A funcionalização de lipossomas (Figura 08) contendo PAC e/ou RAP seguiu o método descrito por YANG et al, 2007 (b) e LAGINHA et al., 2005 com modificações. Inicialmente, foram preparados lipossomas com SPC, Col e DSPE-PEG-Maleimida (MAL) para encapsulação dos fármacos, empregando o mesmo protocolo descrito anteriormente. Paralelamente, o anticorpo trastuzumabe foi diluído em tampão PBS pH 8,0 contendo EDTA (5mM) e o pH da solução foi ajustado a 8,0 com NaOH (0,1 N). À solução de trastuzumabe, 1mg/mL, foi adicionado a solução do reagente de Traut (2 mg/mL), na proporção de 40:1 em relação ao anticorpo. Esta solução foi incubada por 1h a 37°C para permitir a tiolação. A separação do

anticorpo tiolado do reagente de Traut foi realizada em cromatografia de gel filtração, empregando coluna PD-10, com eluente PBS-EDTA pH 8,0. Após determinação da concentração de trastuzumabe em cada alíquota por ensaio BCA, as frações contendo o anticorpo foram combinadas e adicionadas ao lipossoma previamente preparado. A mistura foi incubada *overnight* e por último o imunolipossoma foi purificado em coluna CL4-B para separação do lipossoma e fármaco livre, com eluição utilizando tampão PBS, pH 7,4.

Figura 08. Reação entre maleimida presente no lipídeo DSPE-PEG-Mal e proteína (trastuzumabe) tiolada para formação do imunolipossoma (adaptado de Thermofisher).

3.2.4 Caracterização morfológica e físico-química dos sistemas desenvolvidos

3.2.4.1 Determinação da eficiência de encapsulação de MET, RAP e/ou PAC

Para análise da eficiência de encapsulação o fármaco encapsulado foi separado do fármaco não encapsulado por centrifugação a 1000 rpm por 10 min, filtração (0,45 μ m) e cromatografia de gel filtração. A fração lipossomal foi então rompida com DMSO na proporção de 1:10 (v/v), para analisar RAP e/ou PAC. No caso da análise do lipossoma total, não foi realizada de separação do fármaco não encapsulado. As amostras foram diluídas com acetonitrila (proporção de 1:10 (v/v)), no caso de PAC ou RAP. Em seguida, as amostras foram submetidas ao banho ultrassônico por 10 min, filtradas (0,45 μ m) e analisadas pelo respectivo método analítico (ELOY et al., 2016a). A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada através da equação 4:

$$EE (\%) = [(\text{quantidade de fármaco na fração lipossômica } (\mu\text{g})) / (\text{quantidade de fármaco na fração total } (\mu\text{g}))] \times 100$$

Equação (4)

Para a análise da eficiência de encapsulação de MET, foi empregado o método indireto, com o uso de tubos Amicon[®] (50kDa) (adaptado de OLIVEIRA et al., 2016). Assim, o lipossoma total foi acrescido de Triton[®] para rompimento, 5% v/v, submetido a banho ultrassônico por 10 min, e solubilizado em acetonitrila:água (50:50, v/v), filtradas (0,45 μm) e analisado em CLAE, de acordo ao método já citado. Para a quantificação da alíquota livre de MET, o lipossoma foi submetido à centrifugação (3000 rpm, por 15 min) em tubos Amicon[®] (50kDa). O filtrado foi então diluído em acetonitrila:água (50:50, v/v) e analisado por CLAE. O cálculo da eficiência de encapsulação foi realizado de acordo à equação 5.

$$EE (\%) = [(\text{quantidade de fármaco na fração total } (\mu\text{g})) - (\text{quantidade de fármaco na fração filtrada em Amicon}^{\text{®}} (\mu\text{g})) / (\text{quantidade de fármaco na fração total } (\mu\text{g}))] \times 100$$

Equação (5)

3.2.4.2 Avaliação da eficiência de conjugação de anticorpo aos lipossomas

A eficiência de conjugação de trastuzumabe aos lipossomas foi determinada pelo ensaio do BCA. Em resumo, preparou-se o reagente de trabalho, através da mistura dos reagentes A e B, na proporção 50:1. Em placa de 96 poços, adicionaram-se 25 μL de cada padrão de albumina (20 – 2000 $\mu\text{g/mL}$) para a curva padrão e 25 μL de amostra. Em cada poço, pipetaram-se 200 μL de reagente de trabalho e em seguida a placa foi homogeneizada por 30 segundos e incubada a 37°C por 30 min. Após resfriamento, a absorbância foi lida em 562 nm em leitor de placas. A eficiência de conjugação foi calculada através da porcentagem de anticorpo quantificado no imunolipossoma em relação ao total de anticorpo empregado no experimento.

3.2.4.3 Avaliação da integridade primária do anticorpo por SDS-PAGE

A integridade do anticorpo nos imunolipossomas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, segundo procedimento descrito por YANG et al., 2007 (b) e no protocolo do fabricante (Bio-Rad). As amostras foram previamente incubadas com 2-mercapto-etanol, agente redutor, tampão de amostra Laemmli e incubadas a 60°C por 10 minutos para desnaturação. Empregaram-se cubas eletroforéticas Mini-PROTEAN e tampão de corrida contendo Tris/glicina/SDS para eletroforese a 175 V por 30 min. O padrão de proteínas usado foi o Precision Plus Dual Color Protein (Bio-Rad). Após coloração com corante azul de Coomassie, os géis foram descorados com água deionizada por três lavagens de 30 min cada e fotografados.

3.2.4.4 Análise do tamanho de partícula e índice de polidispersividade

O tamanho de partícula das formulações e o índice de polidispersividade foram determinados à temperatura controlada de 25°C por meio de medidas de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*), usando laser de HeNe operando a 4mW e comprimento de onda de 633 nm. O equipamento realiza as medições não invasivas por “*backscatter optics*” (NIBS), feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição da cubeta é automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise. As dispersões foram diluídas em água Milli Q (100 vezes) e colocadas em celas de 1 cm de caminho óptico.

3.2.4.5 Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética

A carga superficial das dispersões foi medida como potencial zeta, determinado pela mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises foram realizadas pelo equipamento Zetasizer 3000HSa.

3.2.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As amostras (lipossoma e imunolipossoma contendo PAC e RAP) foram diluídas previamente em tampão PBS pH 7,4 de forma que a concentração final de lipídeos obtida foi de 0,5 mg/mL. Em seguida foram colocadas na grade de cobre de 200 mesh e deixadas em repouso até adsorção, e então o excesso foi removido com papel de filtro. Subsequentemente, uma gota de uma solução a 1% (p/v) de acetato de uranila foi adicionado para contrastação negativa. Depois de 2 minutos o excesso foi removido e a amostra foi seca à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura com aceleração de 100 kV e aumento de 100000 vezes (CHEN et al., 2014).

3.2.4.7 Análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de lipossomas previamente liofilizados com sacarose (razão de lipídio para açúcar, 1:5) foram misturadas com brometo de potássio e comprimidas em prensa hidráulica. A varredura foi obtida em resolução de 2 cm^{-1} , de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.4.8 Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As amostras de lipossomas previamente liofilizadas foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas de 15°C a 250°C em razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob pressão de nitrogênio de $3\text{ kgf}/\text{cm}^2$. A calibração foi realizada utilizando índio e *n*-octadecano como materiais de referência.

3.2.4.9 Análises termogravimétricas (TGA)

As amostras de lipossomas previamente liofilizadas foram pesadas e aquecidas de 15°C a 400°C a uma taxa $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob pressão de nitrogênio de $2\text{ kgf}/\text{cm}^2$.

3.2.4.10 Estabilidade coloidal

Lipossomas com PAC e RAP co-encapsulados foram avaliados com relação à estabilidade durante 30 dias, estocados a 4°C. Os parâmetros de eficiência de encapsulação e tamanho de partícula foram avaliados.

3.2.4.11 Perfil *in vitro* de liberação de fármacos

Para a análise do perfil de liberação das formulações de PAC, inicialmente, foram comparados as técnicas de diálise e ultrafiltração. Ambas foram executadas empregando-se 50 mL de meio fosfato de sódio pH 7,4 ou tampão pH 5,0 (para lipossomas preparados com DOPE:AO) contendo 1% de lauril sulfato de sódio, com velocidade de agitação de 150 rpm, em dissolutor. No método de diálise, descrito por YANG et al., 2007a e adaptado para o presente estudo, a membrana de acetato de celulose (12 a 14 kDa) foi acoplada a um tubo de PVC (DE SOUZA et al., 2015), formando uma câmara no qual foi acondicionada a formulação liofilizada, redispersa em 1mL de tampão PBS. O tubo foi então acoplado à haste do dissolutor e mergulhado na cuba contendo o meio de dissolução. Amostras de 1,0 mL foram coletadas da cuba nos tempos 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 e 78 (h), sendo o volume repostado com o meio de dissolução inicial. As amostras coletadas foram filtradas, diluídas com acetonitrila, e analisadas por CLAE, de acordo com as condições validadas. Para o estudo de perfil de liberação por ultrafiltração, descrito por BOYD (2003), as amostras liofilizadas foram adicionadas diretamente à cuba de dissolução e a agitação foi procedida com mini pás. Após a coleta das amostras, as mesmas foram acondicionadas em tubos Amicon e centrifugadas a 3000 rpm por 15 min para proceder a ultrafiltração, que separa o fármaco encapsulado do solúvel. O sobrenadante foi então diluído com acetonitrila e analisado por CLAE nas condições já descritas.

Para o estudo de liberação de PAC e RAP co-encapsulados adotou-se o método clássico da diálise. Soluções de PAC e RAP (preparadas em Cremophor EL40 e etanol desidratado) e lipossomas liofilizados contendo os dois fármacos, co-encapsulados ou não, foram avaliados com relação à liberação de acordo ao procedimento supracitado. As amostras para análise dos fármacos foram coletadas

até 72 h, diluídas em acetonitrila, filtradas, e analisadas por CLAE. No caso de PAC, empregou-se o método previamente descrito. Para a quantificação de RAP, um método por CLAE foi empregado, com o uso de fase móvel composta por água:acetonitrila (25:75, v/v), sob um fluxo de 1,6 mL/min, a 40°C, com injeção de 20 µL em coluna C18 Lichrospher®, com detecção em 277 nm.

3.2.5 Experimentos em cultura celular

3.2.5.1 Avaliação de citotoxicidade nas linhagens celulares 4T1 e SKBR3

As linhagens 4T1 e SKBR3 foram cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de antibiótico/antimicótico, a 37°C com atmosfera a 5% de CO₂, de acordo a recomendações da ATCC. Uma vez atingida 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e transferidas (10,000 células por poço) para placas de fundo chato 96 poços e incubadas por 24h a 37°C. Após a remoção do meio de cultura completo, os poços foram lavados com PBS pH 7,4 e os grupos experimentais diluídos em meio incompleto (sem FBS) foram aplicados nas placas, que foram incubadas a 37°C por 72h. Após incubação, os poços foram lavados com PBS e meio incompleto com solução de MTT (2,5 mg mL⁻¹) foi aplicado, seguido por incubação (4h a 37°C). Subsequentemente, o meio contendo MTT foi descartado e DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de formazan. A absorvância foi lida a 570 nm. A concentração resultante em 50% de morte celular (IC₅₀) foi calculada pelas curvas de concentração-efeito, considerando a densidade óptica do controle negativo (células não tratadas) como 100% (SHARMA et al., 1996).

3.2.5.2 Determinação do índice de combinação (CI)

O CI de PAC e RAP em solução, lipossoma ou imunolipossoma foi determinado de acordo ao método de CHOU e TALALAY (1984), calculado como segue:

$$CI: (D)_1/(Dx)_1+(D)_2/(Dx)_2 \quad \text{equação (6)}$$

Na equação, $(D)_1$ and $(D)_2$ representam as doses dos fármacos 1 e 2 necessárias para produzir o efeito de IC50 em combinação, ao passo que $(D_x)_1$ and $(D_x)_2$ são as doses dos fármacos 1 e 2 requeridos para produzir o efeito de IC50 individualmente. Uma média de $CI < 1$ indica sinergismo, $CI > 1$ indica antagonismo e uma média e CI igual a 1 indica aditividade (JAAFARI et al., 2012).

3.2.5.3 Microscopia confocal

Para a avaliação do *uptake* de lipossomas e imunolipossomas as formulações foram preparadas sem fármacos, contendo o marcador fluorescente de bicamadas lipídicas, Dio, encapsulado a 0,5 mol%. O preparo procedeu-se da mesma maneira que especificado anteriormente para lipossomas e imunolipossomas. Os experimentos foram realizados com a linhagem celular 4T1, triplo negativa, e SKBR3, HER2 positiva. Para isso, 1×10^6 células/poço foram plaqueadas em microplacas de 6 poços, contendo lamínulas esterilizadas de 22mm/22 mm e incubadas por 24 h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS pH 7,4 e incubadas com as amostras (100 µL) diluídas em meio incompleto por 24h. Após o tratamento, as células foram lavadas com tampão PBS e então se acrescentou 2 mL de paraformaldeído 1% nos poços. As placas foram mantidas *overnight* a 4°C, vedadas com vitafilme. Em seguida, os poços foram novamente lavados com tampão PBS e as lamínulas vertidas em lâminas de histologia contendo Prolong Diamond® com DAPI, para preservação da fluorescência e marcação de núcleo. As lâminas foram mantidas em repouso por 24h previamente a visualização em microscópio confocal Leica TCS SP8 ($\lambda_{exc} = 405$ nm, $\lambda_{em} = 413-472$ nm (DAPI) e $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 503-588$ nm (Dio), aumento de 63 vezes com objetiva de imersão em óleo).

3.2.5.4 Citometria de fluxo

Para as análises de citometria de fluxo, 1×10^6 células (4T1 e SKBR3)/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 com tampão PBS pH 7,4 e incubadas com as amostras diluídas (lipossomas e imunolipossomas

contendo Dio como agente fluorescente encapsulado) em meio incompleto por 24h. Após o tratamento as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas usando-se 300 µL de tripsina 0,25%, seguidas de neutralização com 1 mL meio completo, centrifugação e ressuspensão em PBS. As amostras então foram submetidas à análise em citômetro de fluxo, usando λ_{exc} = 488 nm, λ_{em} = 530/30 nm para Dio e λ_{exc} = 488 nm e λ_{em} = 670 para iodeto de propídio.

3.2.6 Estudos *in vivo*

3.2.6.1 Animais

Camundongos fêmea BALB/c (para a indução tumoral com a linhagem murina 4T1) ou camundongos fêmea imunossuprimidos *Swiss nude* (para a indução tumoral com a linhagem humana SKBR3), de 6-8 semanas de idade, foram empregados nos experimentos, sendo que todos os procedimentos foram realizados de acordo ao protocolo de manejo de animais aprovado pela Universidade de São Paulo, de acordo aos princípios éticos de cuidado com animais de experimentação (protocolo 14.1.883.53.6). Os animais foram acondicionados em grupos de 5 por caixa a 25°C com ciclos de 12h de claro e escuro, e alimentação e água foram fornecidos *ad libitum*.

3.2.6.2 Estudo de eficácia antitumoral em tumores triplo negativos de soluções de PAC ou RAP, lipossomas de PAC ou RAP, e lipossomas de PAC/RAP co-encapsulados

Visando à comparação da ação terapêutica de lipossomas e soluções dos fármacos, tumores intramamários foram desenvolvidos pela inoculação de células murinas de câncer de mama (4T1), na quantidade de (1×10^5), em uma mama direita e esquerda, de camundongos BALB/c. Após a injeção, o tempo para o aparecimento de tumores foi de 10-14 dias, a partir de quando o tratamento foi iniciado (MERAZ et al., 2014). As doses administradas de PAC e RAP foram respectivamente 5mg/kg e 15mg/kg, duas vezes por semana, totalizando 5 administrações (BLANCO et al., 2014). Os grupos receberam injeção intraperitoneal como segue: (I) salina (controle

negativo); (II) PAC solução; (III) PAC lipossoma; (IV) RAP solução; (V) RAP lipossoma; (VI) PAC RAP solução; (VII) PAC RAP lipossoma (n=5 em cada grupo). O volume tumoral e o peso corporal dos animais foram monitorados até o final do estudo, quando os animais foram sacrificados com sobredose anestésica. O comprimento e a largura dos tumores foram medidos duas vezes por semana, para o cálculo do volume tumoral pela equação 7 (MAEDA et al., 2004; PHOENIX, VUMBACA, CLAFFEY, 2009):

$$\text{Volume tumoral} = (\text{comprimento tumoral} \times \text{largura tumoral}^2)/2 \quad \text{equação (7)}$$

3.2.6.3 Estudo de eficácia antitumoral em tumores HER2 positivos de solução de PAC e RAP, lipossoma de PAC e RAP, e imunolipossoma de PAC e RAP.

Visando a comparação da ação terapêutica de solução de RAP e PAC, lipossoma e imunolipossoma contendo os dois fármacos co-encapsulados, tumores intramamários foram desenvolvidos pela inoculação de células humanas de câncer de mama (SKBR3), na quantidade de (1×10^6) em glândula mamária de camundongos *Swiss nude*. Após a injeção, o tempo para o aparecimento de tumores foi de 18 dias, a partir de quando o tratamento foi iniciado. As doses administradas de PAC e RAP foram respectivamente 5mg/kg e 15mg/kg, duas vezes por semana, totalizando 6 administrações (BLANCO et al., 2014). Os grupos receberam injeção intraperitoneal como segue: (I) salina (controle negativo); (II) PAC e RAP solução; (III) PAC e RAP lipossoma; (IV) PAC e RAP imunolipossoma. O volume tumoral e o peso corporal dos animais foram monitorados até o final do estudo, quando os animais foram sacrificados com sobredose anestésica e os tumores foram extraídos e fotografados. O cálculo do volume tumoral foi feito conforme descrito no item anterior.

3.2.6.4 Avaliação histológica por coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Os tumores foram retirados da formalina e deixados por 1 h imersos em etanol 80%. Em seguida, os tumores foram individualmente colocados em cassetes plásticos e desidratados, através de realização de 3 banhos com etanol absoluto, de

1 h cada, diafanização com 3 banhos em xilol, de 30 min cada. Em seguida, procederam-se 2 banhos com parafina a 62°C, de 30 min cada. O material então foi incluído em parafina e deixado à temperatura ambiente para endurecer. Na sequência, o material foi seccionado em micrótomo rotativo, obtendo-se cortes histológicos de 4µm de espessura, que foram recolhidos em lâminas de vidro. Para a coloração por HE, os cortes foram previamente desparafinados com 2 banhos de xilol de 10 min cada e hidratados com sequência de banhos de 5 min em álcool absoluto, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70% e água destilada. Na sequência, procedeu-se a coloração com hematoxilina de Ehlich por 5 a 10 min e lavagem com água por 10 min. A coloração com eosina a 0,5% foi feita por incubação por 5 min, e lavagem com água corrente. Foi procedida então a desidratação, com passagem sequencial por 1 min em álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, seguido por incubação por 5 min por 3 vezes com álcool absoluto, e lavagem com água. Ainda, realizou-se banho de xilol por 5 min e realizou-se a montagem da lâmina com resina. A observação das lâminas foi feita em microscópio convencional acoplado com câmera.

3.2.6.5 Avaliação imunohistoquímica com anticorpo anti Ki-67

Com o tecido previamente fixado e parafinado, procedeu-se a recuperação antigênica do tecido. Para tanto, as lâminas foram incubadas por 10 min em tampão citrato pH 6,0 por 30 min a 95-99°C, em banho Maria. As lâminas foram retiradas, deixadas resfriar por 5 min, lavadas em água destilada e deixadas em banho por 5 min com tampão de lavagem TBS com 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, realizado na sequência, foi feito 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, quando foi 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. Os cortes foram secos e então o reagente *HRP conjugate* foi aplicado e incubado por 15 min à temperatura ambiente, depois se prosseguiu a lavagem com o tampão de lavagem. Para a coloração do substrato cromógeno, o reagente DAB líquido foi diluído, conforme instruções da bula do fabricante (Spring), aplicado e incubado por 5 min à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em água destilada e em seguidas contra corados com hematoxilina-eosina. Por último, os tecidos foram desidratados em bateria de etanol e xilol e as lâminas foram permanentemente montadas. A observação das lâminas foi feita em microscópio convencional acoplado com câmera.

3.2.6.6 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD). O teste t de student ou two away ANOVA com pós teste de Bonferroni foram empregados e a significância estatística foi estabelecida como $p < 0,05$ (***), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,1$ (*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenvolvimento e validação analítica de métodos para quantificação de PAC, MET ou RAP em lipossomas e imunolipossomas

As condições empregadas para a análise de PAC, adaptadas do trabalho de YANG et al. 2007a, utilizando-se mesmas condições de fase móvel, estacionária e comprimento de onda, revelaram-se adequadas ao presente estudo, possibilitando a análise do fármaco com tempo de retenção equivalente a 10 min. Destaca-se que no comprimento de onda de 227 nm, empregado na análise cromatográfica, a RAP não interfere na quantificação.

Para a análise da MET, foram empregadas as mesmas condições analíticas utilizadas no método analítico do PAC, com exceção do comprimento de onda, que foi ajustado para 236 nm, o mesmo empregado em trabalho prévio (GABR, PADWAL, BROCKS, 2010). O fármaco, por outro lado, não ficou retido na coluna, nem mesmo com alterações na proporção de água e acetonitrila, o que pode ser explicado pelo caráter altamente polar de MET, que, conseqüentemente, não é retida em uma coluna cromatográfica C-18 por não interagir com as cadeias hidrofóbicas da mesma (GABR, PADWAL, BROCKS, 2010).

Face ao exposto, testou-se a estratégia da adição na fase móvel do tensoativo SDS, que fornece uma pseudo-fase estacionária que pode efetivamente separar compostos com base na partição destes entre a fase móvel aquosa e a coluna revestida com SDS (GABR, PADWAL, BROCKS, 2010). Para este experimento, foi adotado o mesmo tipo de fase móvel e fluxo empregados no referido trabalho, porém o fármaco ficou fortemente retido na coluna, exibindo um pico largo e com cauda após 20 min. Os experimentos subsequentes envolveram a diminuição da concentração de SDS empregada na análise, porém, não foi observado efeito em diminuição do tempo de retenção de MET. Alternativamente, elevou-se a proporção de acetonitrila em relação à água, para 50:50 (v/v), conseqüentemente aumentando a força cromatográfica, o que acarretou em diminuição do tempo de retenção do fármaco para 14 min. Outra estratégia adotada foi o aumento do fluxo da fase móvel progressivamente de 0,7 até 1,6 mLmin⁻¹, o que foi acompanhado por diminuição proporcional dos valores de tempo de retenção de MET, culminando com o tempo de retenção em 4,5 min para o maior fluxo testado.

Resultados e Discussão

Para a quantificação da rapamicina optou-se por um método espectrofotométrico na região do ultravioleta, sendo empregado o comprimento de onda de 277 nm, de máxima absorção do fármaco. Neste comprimento de onda o PAC não interfere na quantificação de RAP, por isso este método também é adequado para quantificar RAP em lipossomas com PAC co-encapsulado.

A primeira etapa da validação analítica de cada método correspondeu à avaliação da seletividade, de forma a garantir que os componentes da formulação e a adição dos outros fármacos não interfiram na quantificação (RIBANI et al., 2004). A análise das soluções dos fármacos contaminados com os adjuvantes empregados nas formulações evidenciaram a seletividade de cada método desenvolvido.

O método desenvolvido para quantificação de PAC apresentou linearidade na faixa de, 0,50 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após o ajuste dos dados por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados, os valores das áreas obtidas mostraram ser diretamente proporcionais à concentração de fármaco, com $r^2 = 0,9997$ (Figura 09). Para MET, concentrações desde 0,25 até 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram linearidade, com r^2 equivalente a 0,999. O método para quantificação de RAP apresentou linearidade na faixa de 0,50 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com r^2 equivalente a 0,9972.

Figura 09. Curvas analíticas de PAC (A), MET (B) e RAP (C).

Para a análise fidedigna do fármaco o método deve mostrar-se preciso, ou seja, apresentar pequena dispersão entre resultados de leitura de uma mesma concentração e exato, representado pelo grau de concordância entre resultados individuais em um mesmo ensaio, ou ensaios independentes, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005). Os resultados apresentados nas

Resultados e Discussão

Tabelas 01, 02 e 03 evidenciaram que os métodos desenvolvidos para quantificação de PAC, MET e RAP em lipossomas são precisos para ambas as determinações, tanto pela repetibilidade como precisão interensaio, e são exatos para um mesmo dia de análise (exatidão intraensaio) e para ensaios em dias diferentes (exatidão interensaio).

Tabela 01. Precisão (A) e exatidão (B) do método cromatográfico utilizado na análise de PAC

A				B			
<i>Repetibilidade</i>				<i>Exatidão Intraensaio</i>			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5	5,0	15,0	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5	5,0	15,0
n	10	10	10	n	10	10	10
CV(%)	6,21	1,30	0,76	E(%)	9,85	-5,00	0,55
<i>Precisão Intermediária</i>				<i>Exatidão Interensaio</i>			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5	5,0	15,0	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5	5,0	15,0
n	3	3	3	n	3	3	3
CV (%)	4,99	1,34	1,64	E(%)	5,88	-3,50	-0,66

Tabela 02. Precisão (A) e exatidão (B) do método cromatográfico utilizado na análise de MET

A				B			
<i>Repetibilidade</i>				<i>Exatidão Intraensaio</i>			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,0	10,0	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,0	10,0
n	10	10	10	n	10	10	10
CV(%)	2,70	3,64	5,01	E(%)	4,05	-7,63	1,46
<i>Precisão Intermediária</i>				<i>Exatidão Interensaio</i>			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,0	10,0	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,0	10,0
n	3	3	3	n	3	3	3
CV (%)	0,98	3,18	4,27	E(%)	6,08	-9,77	-0,99

Tabela 03. Precisão (A) e exatidão (B) do método cromatográfico utilizado na análise de RAP

A				B			
<i>Repetibilidade</i>				<i>Exatidão Intraensaio</i>			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,50	2,5	10,0	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,5	2,5	10,0
n	10	10	10	n	10	10	10
CV(%)	9,90	1,16	1,31	E(%)	10,43	-2,54	1,10
<i>Precisão Intermediária</i>				<i>Exatidão Interensaio</i>			
Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,0	10,0	Conc. teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,0	10,0
n	3	3	3	n	3	3	3
CV (%)	9,16	0,90	0,62	E(%)	10,98	-1,55	1,54

O limite de quantificação, equivalente ao menor nível determinado com precisão e exatidão aceitáveis, correspondeu a 0,5, 0,25 e 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente para PAC, MET e RAP. Concentrações abaixo desta foram analisadas e excluídas por não apresentarem exatidão adequada. Os limites de detecção de PAC, MET e RAP foram, respectivamente, 0,05, 0,02 e 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2 Desenvolvimento de lipossomas contendo MET, RAP e/ou PAC

4.2.1 Desenvolvimento de lipossomas contendo PAC

O delineamento das formulações lipossômicas contendo PAC seguiu trabalhos prévios da literatura, que estabeleceram que a razão molar de fármaco para lipídio, que resulta em maiores valores de eficiência de encapsulação e melhor estabilidade correspondem a razão de 1:33 (fármaco: lipídio) (CROSASSO et al., 2000; ZHANG et al., 2005). Concentrações mais elevadas de fármaco poderiam resultar em sua precipitação, por este motivo, não foram estudadas outras proporções entre fármaco e lipídio neste trabalho.

Os primeiros testes envolveram uma formulação contendo somente PAC e SPC, já reportada por YANG e colaboradores (2007a). Os tamanhos de partícula nanométricos (Tabela 04), como os apresentados pelas formulações desenvolvidas, influenciam a farmacocinética, pois afetam a distribuição tecidual e o *clearance* das partículas. Vesículas com tamanho reduzido, em geral menores que 200 nm, sabidamente aumentam a acumulação do fármaco através do efeito EPR, por isso, é vantajoso encapsular moléculas antitumorais em sistemas de liberação nanométricos (XU et al., 2005).

O desenvolvimento de lipossomas contendo PAC envolveu dois tipos de formulações, uma convencional, composta por SPC e Col, já descrita anteriormente na literatura (YANG et al., 2007a) e formulações do tipo pH sensíveis, preparadas com DOPE e AO, que até o presente momento não foram estudadas como carreadoras de paclitaxel. A formulação convencional foi conjugada ao lipídio PEGlado DSPE-PEG (2000), uma estratégia que pode conduzir ao aumento do tempo de circulação através da diminuição do reconhecimento pelo sistema mononuclear fagocitário, prolongando os níveis plasmáticos do fármaco, o que

potencializa a acumulação passiva pelo efeito EPR (TORCHILLIN; TRUBETSKOY, 1995). Os resultados de tamanho de partícula, polidispersividade, potencial zeta e eficiência de encapsulação foram apresentados nas Tabelas 04, 05, 06 e 07 e combinados nas Figuras 10 e 11.

Tabela 04. Resultados de tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta para lipossomas preparados com SPC, Col, conjugados ou não ao DSPE-PEG (2000).

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	Polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
SPC	198,7 ± 9,93	0,477 ± 0,09	1,54 ± 0,52
SPC/Col (10:0,5)	152,8 ± 7,98	0,532 ± 0,07	-4,40 ± 0,81
SPC/Col (10:1)	155,4 ± 5,47	0,439 ± 0,08	2,68 ± 0,74
SPC/Col (10:2)	169,4 ± 5,89	0,399 ± 0,11	-4,56 ± 0,25
SPC/Col/DSPE-PEG (10:2:0,5)	124,1 ± 4,57	0,489 ± 0,02	-1,26 ± 0,11

A estratégia de incorporar Col em lipossomas para melhorar a estabilidade *in vitro* e *in vivo* de lipossomas contendo PAC não é recente e já foi descrita em diversos trabalhos (CROSASSO et al., 2000; ZHANG et al., 2005; YANG et al., 2007a; KHAN et al., 2010). Para as formulações preparadas com SPC e Col, os resultados da Tabela 04 mostraram que a adição de Col aos lipossomas, em três proporções distintas, 10:0,5, 10:1,0 e 10:2 (SPC:Col), causou a redução do tamanho de partícula dos sistemas de liberação. Este efeito pode estar relacionado com o maior ponto de fusão do colesterol, que torna a vesícula lipídica mais rígida e possivelmente mais compacta. Observa-se, ainda, que os valores elevados de polidispersividade não foram influenciados pela adição de Col, mantendo-se elevados, bem como os valores de potencial zeta, que se mantiveram entre 1,54 mV a -4,56 mV, o que se considera dentro da faixa de neutralidade do equipamento, em função da ausência de carga da molécula de colesterol. A adição da molécula hidrofílica DSPE-PEG (2000) causou redução ainda maior do tamanho do lipossoma, o que pode ser explicado pela melhor hidratação do filme lipídico mais polar.

Tabela 05. Resultados de eficiência de encapsulação para lipossomas preparados com SPC, Col, conjugados ou não ao DSPE-PEG (2000).

Formulação	Encapsulação (%)
SPC	100,25 ± 5,89
SPC/Col (10:0,5)	60,01 ± 3,98
SPC/Col (10:1)	60,36 ± 3,73
FC/COL (10:2)	57,03 ± 4,31
SPC/Col/DSPE-PEG (2000) (10:2:0,5)	65,03 ± 1,36

Os resultados presentes na Tabela 05 revelam que a eficiência de encapsulação do fármaco foi consideravelmente diminuída pela adição de Col, já que este lipídio compete com as moléculas de PAC por espaços hidrofóbicos na bicamada lipídica. Além disso, a inclusão de colesterol, um lipídio mais rígido do que a fosfatidilcolina, nos lipossomas restringe sua flexibilidade e, portanto, impede o fármaco de se acomodar na vesícula lipídica (ZHANG et al., 2005). Por outro lado, a adição de DSPE-PEG (2000) não prejudicou a eficiência de encapsulação de lipossomas preparados com SPC e Col.

Os resultados de tamanho de partícula e eficiência de encapsulação das formulações preparadas com SPC, Col, e também DSPE-PEG, foram combinadas na Figura 10, através da qual são nítidos os efeitos da adição de colesterol e DSPE-PEG sobre lipossomas preparados com SPC.

Figura 10. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação de paclitaxel (%) em formulações preparadas com SPC, SPC/Col nas proporções respectivas de 10:0,5, 10:1 ou 10:2 e SPC/Col/DSPE-PEG (2000) 10:2:0,5 em pH 7,4.

Os resultados de desenvolvimento de formulação com lipossomas pH sensíveis foram apresentados nas Tabelas 06, 07 e Figura 11, que reúnem resultados de tamanho de partícula e eficiência de encapsulação. O interesse nesta classe de formulação justifica-se porque lipossomas pH sensíveis representam uma estratégia viável para melhorar a biodisponibilidade de fármacos através da potencialização de sua liberação em ambientes ácidos como os tumores, ou mesmo no interior celular, nos compartimentos lisossômicos (KARANTH; MURTHY, 2007). No presente trabalho, optou-se pelo emprego do lipídio DOPE, que diferentemente da maioria dos fosfolipídios, apresenta uma cabeça pequena que ocupa um volume reduzido e minimamente hidratado, impede a organização em lamelas, característica de lipossomas. Contudo, a intercalação de moléculas com grupamentos ácidos (negativamente carregados em pH fisiológico), como o AO, favorece repulsão eletrostática, permitindo a formação da bicamada lipídica, estável em pH fisiológico (LIU, HUANG, 1989). Por estes motivos, a vesícula lipossômica não foi formada quando usado apenas o DOPE como carreador, o que foi demonstrado pela não quantificação de paclitaxel encapsulado (Tabela 06), sugerindo que a vesícula lipossômica não tenha sido formada sem o grupamento ácido do AO. A adição desta

Resultados e Discussão

molécula, nas proporções molares em relação ao DOPE de 1:4 e 2:5 resultou em reduzidos valores de eficiência de encapsulação, porém associados a elevados valores de tamanho de partícula, elevada polidispersividade e potencial zeta próximo à neutralidade.

Tabela 06. Resultados de tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta para lipossomas preparados DOPE, DOPE e AO, em diferentes razões e meios de hidratação.

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	Polidispersividade	Potencial Zeta (mV)
DOPE, pH 7,4	279,1 ± 10,2	0,343 ± 0,05	-5,45 ± 1,15
DOPE/AO (4:1), pH 7,4	437,5 ± 4,4	0,364 ± 0,12	-2,36 ± 0,92
DOPE/AO (5:2), pH 7,4	422,3 ± 4,51	0,487 ± 0,11	4,16 ± 1,12
DOPE/AO (4:1), 3% tween	110,9 ± 2,76	0,507 ± 0,09	-4,34 ± 0,08
DOPE/AO (4:1), 0,5% tween	106,31 ± 1,55	0,489 ± 0,08	-3,68 ± 1,42
DOPE/AO (4:1), 0,1% tween	232,2 ± 3,97	0,479 ± 0,06	-11,8 ± 1,95
DOPE:AO (4:1), pH 8,0	182,5 ± 4,23	0,632 ± 0,04	-44,1 ± 2,85
DOPE/AO (4:1), pH 8,5	153,2 ± 6,36	0,498 ± 0,08	-42,2 ± 1,99
DOPE/AO (4:1), pH 9,0	78,5 ± 5,36	0,32 ± 0,02	-43,6 ± 0,09

Tabela 07. Resultados de eficiência de encapsulação para lipossomas preparados com DOPE, DOPE e AO, em diferentes razões e meios de hidratação.

Formulação	Encapsulação (%)
DOPE, pH 7,4	0 ± 0
DOPE/AO (4:1), pH 7,4	16,71 ± 1,15
DOPE/AO (5:1), pH 7,4	13,92 ± 0,73
DOPE/AO (4:1), 3% tween	10,87 ± 1,80
DOPE/AO (4:1), 0,5% tween	15,18 ± 2,99
DOPE/AO (4:1), 0,1% tween	28,76 ± 2,06
DOPE:AO (4:1), pH 8,0	68,2 ± 5,07
DOPE/AO (4:1), pH 8,5	34,7 ± 2,89
DOPE/AO (4:1), pH 9,0	24,71 ± 4,49

Como estratégia para o aumento da eficiência de encapsulação em lipossomas formados com DOPE e AO (4:1), testou-se a adição do tensoativo não iônico Tween 80[®] em diferentes concentrações, visto que o uso deste tensoativo no meio de hidratação já demonstrou ser uma abordagem eficaz para o aumento da eficiência de encapsulação de PAC em lipossomas preparados com SPC e Col (YANG et al., 2007a). Os resultados presentes na Tabela 06 comprovam que o uso

de Tween 80[®] diminuiu o tamanho de partícula de maneira concentração dependente, em função da hidratação facilitada do filme lipídico pelo meio aquoso contendo tensoativo, porém os valores de polidispersividade mantiveram-se elevados. Os resultados de eficiência de encapsulação (Tabela 07) evidenciaram que a adição de 0,1% de Tween 80[®] melhorou a encapsulação de paclitaxel, contudo em maior concentração (0,5 e 3,0%) o tensoativo exerceu um efeito negativo, provavelmente por desorganizar a vesícula lipossômica.

Em meios de hidratação com pHs mais básicos o lipídio DOPE tende a organizar-se em bicamadas, conforme discutidos nos trabalhos de Ellens e colaboradores (ELLENS et al., 1984, ELLENS et al., 1985). Por este motivo, optou-se por preparar as formulações em diferentes pHs, 8,0, 8,5 e 9,0. Conforme evidenciado pela Figura 11, o meio de hidratação com pH 8,0 foi o que resultou em melhor balanço entre reduzido tamanho de partícula e elevada eficiência de encapsulação, respectivamente, 167,5 nm e 68,2%. Ressalta-se o considerável aumento da eficiência de encapsulação de paclitaxel da formulação preparada em pH 8,0 comparado à formulação em pH 7,4, cujo valor de eficiência de encapsulação correspondeu a 16,71%. Por outro lado, lipossomas preparados em meios de hidratação nos outros pHs mais elevados, 8,5 e 9,0, tiveram forte redução de tamanho de partícula e reduzidos valores de eficiência de encapsulação do fármaco, o que pode sugerir a desorganização da estrutura vesicular, demonstrando que a faixa de pH para a formação de lipossomas de DOPE estabilizados com AO é bastante estreita e encontra-se bem próxima a 8.

Figura 11. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação (%) de PAC em formulações preparadas com DOPE em pH 7,4, DOPE /AO 5:2 e 4:1, em pH 7,4, DOPE/AO 4:1 em pH 8,0, 8,5 ou 9,0, DOPE/AO 4:1 em solução contendo 0,1, 0,5 ou 3,0% de tween 80.

Deve-se considerar que o DOPE é uma base fraca e em pHs mais elevados, próximos ao seu pKa, encontra-se na sua forma neutra, que tende a formar a vesícula lipossômica, porém em pHs próximos a 9,0 o DOPE encontra-se carregado negativamente, o que pode favorecer a repulsão eletrostática e desorganização da vesícula lipídica (STOLLERY e VAIL, 1977; ISHIDA et al., 2006).

A formulação com DOPE e AO, na proporção molar de 4:1, preparada em meio de hidratação com pH 8,0 foi a que teve os melhores parâmetros físico-químicos, porém o potencial zeta foi muito negativo. Ressalta-se, por outro lado, que uma formulação preparada em pH 8,0 pode ser irritante para a via parenteral requerida no presente trabalho, além de não ser PEGlada, o que em conjunto representa uma desvantagem em potencial. Por este motivo, optou-se por trabalhar com formulações clássicas para co-encapsular PAC e RAP nos experimentos subsequentes.

4.2.2 Desenvolvimento de lipossomas contendo MET

Os resultados apresentados na Tabela 08 mostraram que a eficiência de encapsulação do fármaco MET manteve-se baixa, principalmente para as formulações preparadas sem Col, e se mostrou pouco dependente do tipo de lipídio empregado na formulação, visto que SPC, HPC, DPPC e DSPC resultaram em valores de eficiência de encapsulação variando entre 8,27 e 13,14%. Além disso, os lipossomas isentos de Col apresentaram valores de tamanho de partícula elevados, principalmente para a formulação preparada com HPC, equivalente a 606 nm.

Tabela 08. Resultados de tamanho de partícula (TP), potencial zeta (PZ) e porcentagem de encapsulação (EE) para lipossomas contendo MET preparados com diferentes composições lipídicas.

Formulação	TP (nm)	PZ (mV)	EE (%)
SPC	363,7	-6,06	13,14
SPC:Col (10:1)	299,5	-10,3	19,76
HPC	606	0,69	8,27
HPC:Col (10:1)	282,4	-3,24	20,7
DSPC	390,9	-5,53	11,83
DSPC:Col (10:1)	212,4	-6,35	21,82
DPPC	285,2	-3,37	9,57
DPPC:Col (10:1)	200	-6,97	22,49
DPPC:Col (10:2)	222,6	-9,72	10,42
DPPC:Col (10:3)	701	-11,1	8,35
DPPC:Col:AO (10:1:0.5)	301,5	-10,6	16,04
DPPC:Col:AO (10:1:1)	229,3	-21	11,26
DPPC:Col:PEI (10:1:0.1)	414,3	10,24	12,91

Deve-se considerar que a adição de Col afeta a encapsulação de fármacos hidrofílicos encapsulados em lipossomas, devido à sua influência na organização e dinâmica da membrana lipídica. Por exemplo, no trabalho de TAYLOR et al. (1990), foi demonstrado que adição de Col a lipossomas preparados com DMPC ou DPPC acarretou no aumento da vesícula e da eficiência de encapsulação do fármaco cromoglicato sódico. Por outro lado, outros estudos relataram que o Col causou a redução do volume interno de lipossomas e, conseqüentemente, diminuiu a eficiência de encapsulação dos fármacos hidrofílicos 5-fluouracil e ampicilina

(GLAVAS-DODOV, et al., 2005; DI GIULIO et al., 1991). Deve-se considerar ainda que a molécula de Col pode aumentar a penetração de água da porção polar dos lipídios, diminuindo a hidrofobicidade, o que pode resultar em acumulação de fármaco hidrofílico nessa porção do lipossoma (KEPCZYNSKI et al., 2008). No presente estudo, a adição de 10% de Col aumentou a eficiência de encapsulação e diminuiu o tamanho de partícula para todos os lipídios estudados, porém quantidades maiores de Col mostraram efeito contrário em lipossomas preparados com DPPC, diminuindo a encapsulação de MET.

A interação eletrostática é outra abordagem de particular interesse para aumentar a encapsulação de fármacos hidrofílicos, através do uso de lipídios com carga oposta à carga do fármaco (KAJIWARA et al., 2007; ELOY et al., 2014a). Lipossomas carregados negativamente, com a adição de AO, ou positivamente, com a adição de PEI, apresentados na Tabela 08, resultaram em aumento do tamanho de partícula, porém não potencializaram a encapsulação do fármaco, uma vez que a molécula MET é uma base fraca e não se encontra ionizada em pH 7,4.

Os resultados com a formulação composta por DPPC:Col (10:1) apresentados na Figura 12 evidenciaram que é importante manter uma alta razão de fármaco para lipídio, a partir de 15:1, com o objetivo de maximizar a encapsulação de MET, todavia estas observações estão em desacordo a outros estudos que reportaram que quantidades mais elevadas de fármaco causam redução da eficiência de encapsulação (XU et al., 2012a; SCHNEIDER et al., 1995).

Figura 12. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação de lipossomas de DPPC:Col (10:1) preparados em diferentes razões de fármaco para lipídio.

A eficiência de encapsulação de MET em lipossoma alcançada neste trabalho foi baixa, em torno de 20%, o que poderia impedir um futuro uso clínico dessa formulação. Apesar de fármacos hidrofílicos dissolverem facilmente na fase aquosa externa durante o preparo do lipossoma pelo método clássico da hidratação do filme lipídico, a molécula é geralmente encapsulada com baixa eficiência devido ao grande volume do meio de hidratação comparado ao pequeno volume aquoso do interior da vesícula do lipossoma (ELOY et al., 2014a; XU et al., 2012b). Deve-se considerar que diferentes técnicas de preparo poderiam ser empregadas visando a uma formulação com melhor encapsulação de MET, porém o objetivo final proposto é de realizar a co-encapsulação com PAC na mesma formulação. Neste caso, a encapsulação do fármaco lipofílico PAC poderia ser prejudicada se a técnica clássica não fosse empregada. Por esse motivo, julgou-se adequado testar outra molécula que apresenta sinergismo citotóxico com PAC em câncer de mama, a rapamicina, e que possui a vantagem de ser lipofílica, podendo ser encapsulada no filme lipídico junto com o PAC.

4.2.3 Desenvolvimento de lipossomas contendo RAP e/ou PAC

A primeira etapa do estudo de encapsulação de RAP correspondeu à otimização da razão entre fármaco e lipídio, visando ao balanço entre reduzido

tamanho de partícula e elevada eficiência de encapsulação. Os resultados apresentados na Figura 13 e Tabela 09 evidenciaram que as razões de fármaco para lipídio (SPC) entre 1:10 e 1:15 permitiram maiores valores de eficiência de encapsulação de rapamicina, próximos a 90%. Estas observações corroboram os resultados de HAERI et al., 2011, que concluíram que o aumento da razão de lipídio (DSPC) para RAP tem influência positiva na eficiência de encapsulação. Naquela ocasião, os autores empregaram o método da encapsulação remota do filme lipídico, que envolve o preparo de um filme de fármaco e adição a lipossomas vazios, como opção ao método clássico de hidratação do filme lipídico por extrusão que resultou em baixa eficiência de encapsulação do fármaco. Os autores justificaram o problema devido à retenção na membrana de extrusão do lipossoma de DSPC, um lipídio saturado e rígido, ao contrário de SPC empregado no presente trabalho, que é mais flexível.

Figura 13. Resultados obtidos na avaliação de tamanho de partícula (nm) e eficiência de encapsulação de lipossomas de SPC contendo RAP preparados em diferentes razões de fármaco para lipídio.

Tabela 09. Resultados de tamanho de partícula (TP), polidispersividade (Pdl), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulação (EE) para lipossomas contendo RAP preparados com diferentes composições lipídicas.

Formulação	TP (nm)	Pdl	PZ (mV)	EE (%)
SPC:RAP (5:1)	132,0 ± 2,83	0,26 ± 0,08	-20,89 ± 2,19	60,56 ± 5,87
SPC:RAP (10:1)	130,15 ± 1,20	0,32 ± 0,02	-34,78 ± 0,67	88,42 ± 4,92
SPC:RAP (15:1)	107,85 ± 2,19	0,31 ± 0,04	-35,89 ± 1,38	89,11 ± 4,12
DPPC:RAP (10:1)	145,9 ± 1,84	0,26 ± 0,05	-14,30 ± 1,95	40,74 ± 7,45
DSPC:RAP (10:1)	202,65 ± 10,15	0,76 ± 0,05	-14,77 ± 1,06	44,23 ± 5,98
DOPE:OA:RAP (10:2,5:1)	167,1 ± 1,84	1,16 ± 0,01	-48,73 ± 2,14	45,32 ± 3,98
SPC:Chol:RAP (10:1:1)	158,6 ± 10,93	0,36 ± 0,09	-27,83 ± 1,25	48,42 ± 5,67
SPC:Chol:RAP (10:2:1)	142,15 ± 6,43	0,24 ± 0,04	-27,50 ± 0,78	66,67 ± 6,76
SPC:Chol:RAP (10:3:1)	135,25 ± 10,45	0,41 ± 0,01	-26,23 ± 0,70	62,67 ± 9,34
SPC:Chol:DSPE-PEG2000:RAP (10:2:0,5:1)	133,84 ± 8,35	0,26 ± 0,01	-3,51 ± 0,24	59,58 ± 4,97
SPC:Chol:DSPE-PEG2000:RAP:PAC (10:2:0,5:1:0,33)	136,95 ± 7,28	0,27 ± 0,01	0,02 ± 0,19	73,31 ± 4,53 (RAP) / 56,32 ± 6,32 (PAC)

Adicionalmente, testaram-se outras composições lipídicas (Tabela 09), baseadas em DSPC, DPPC ou DOPE:AO, porém os valores de tamanho de partícula mostram-se maiores, ao passo que houve redução na encapsulação do fármaco. Ademais, a formulação com DSPC apresentou elevada polidispersividade. Com isso, pode-se concluir que com a técnica clássica de preparo de lipossomas empregada neste trabalho, logrou-se maior eficiência de encapsulação com o lipídio SPC, que forma membranas menos rígidas, na qual o fármaco lipofílico pode particionar, resultando em maior eficiência de encapsulação. Além disso, este tipo de lipídio pode ter alto grau de miscibilidade com o fármaco hidrofóbico (DESAI et al., 2002). Os resultados ainda mostraram que o potencial zeta das formulações avaliadas manteve-se negativo, em função da carga dos lipídios empregados, principalmente com a formulação preparada com DOPE:AO, cujo potencial zeta correspondeu a -48,73 mV.

Como o lipídio SPC provou ser mais adequado para encapsular RAP, procedeu-se com o estudo de adição de Col, em diferentes proporções. A adição de Col resultou em queda da eficiência de encapsulação do fármaco, a qual foi mais pronunciada com a adição de 10 mol%. As formulações preparadas com SPC:Col nas razões de 10:2 e 10:3 apresentaram eficiência de encapsulação de RAP em torno de 60%, porém ligeiramente maior para a formulação preparada com 20 mol% de Col, com tamanhos de partícula e polidispersividade próximos à formulação sem Col e com potencial zeta negativo. HAERI et al., (2011) definiram como 25 mol% o

limite máximo de Col adicionado aos lipossomas contendo RAP, uma vez que quantidades mais elevadas deste lipídio resultam em rápida agregação das vesículas. Ademais, altas concentrações de Col já foram relacionadas à interferência no empacotamento da vesícula, resultando em redução da encapsulação de fármacos hidrofóbicos (CODERCH et al., 2000).

A adição do lipídio DSPE-PEG 2000 à formulação SPC:Col (10:2) não comprometeu o tamanho de partícula, polidispersividade e eficiência de encapsulação de RAP, porém resultou em potencial zeta próximo a neutralidade. Como esta formulação é idêntica à formulação convencional PEGlada contendo PAC, testou-se a co-encapsulação dos dois fármacos. Os resultados mostraram que houve diminuição da encapsulação de PAC, em torno de 10%, o que foi compensado por um aumento de encapsulação de RAP na mesma magnitude. Deve-se ressaltar que combinar PAC e RAP pode ser uma estratégia interessante na quimioterapia do câncer, uma vez que o efeito sinérgico destes fármacos já foi demonstrado em linhagens celulares tumorais (HASENSTEIN et al., 2012). Dentro deste contexto, BLANCO et al., 2014 co-encapsularam RAP e PAC em nanopartículas poliméricas e os resultados mostraram que a abordagem de combinar os fármacos na mesma formulação, capaz de liberá-los ao mesmo tempo, no mesmo local e em quantidades específicas, permite o sinergismo entre os fármacos para a inibição tumoral.

4.3 Caracterização de lipossomas: liberação *in vitro*

4.3.1 Caracterização de lipossomas convencionais e pH sensíveis contendo PAC e comparação dos métodos da diálise e ultrafiltração

Estudos *in vitro* de liberação são essenciais no processo de desenvolvimento de um medicamento e, além de servirem como controle de qualidade das formulações desenvolvidas, podem refletir o desempenho *in vivo* do produto, dependendo das características físico-químicas do fármaco veiculado. Esta técnica é bem estabelecida para o paclitaxel, vide o extenso número de estudos disponíveis que relataram a encapsulação do fármaco em sistemas que permitem sua liberação

sustentada (LIU et al., 2011; ZHANG et al., 2005; YANG et al., 2007 a; YANG et al., 2007 b; CROSASSO et al., 2000; KOZIARA et al., 2004).

Figura 14. Perfis de liberação *in vitro* de paclitaxel a partir da formulação comercial e formulações lipossômicas obtidos através do método de diálise em membrana de acetato de celulose (50 kDa), em 50 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C.

Os resultados apresentados na Figura 14 mostraram que lipossomas convencionais preparados com SPC e Col liberam PAC de maneira muito mais rápida, comparado à formulação que contém DOPE e AO. Ao final de 72 h, a formulação convencional libera aproximadamente 70% do conteúdo do fármaco, ao passo que a outra formulação composta por DOPE e AO libera menos de 10% de paclitaxel, o que pode representar uma vantagem para o tratamento de tumores sólidos, pois idealmente o sistema de liberação deve manter o fármaco encapsulado durante a circulação sanguínea e liberá-lo uma vez acumulado passivamente no sítio tumoral (SONG et al., 2006).

A formulação composta por SPC:Col:DSPE-PEG (2000) exibiu um perfil de liberação muito mais lento e liberação incompleta comparada à formulação convencional sem PEG, o que está de acordo as observações de YANG et al., 2007, em seus estudos com lipossomas convencionais e PEGlados. O revestimento do lipossoma pelo DSPE-PEG (2000), de característica hidrofílica, retarda a liberação

de PAC, altamente hidrofóbico, pois dificulta a passagem do fármaco nesta camada hidrofílica durante o processo de liberação. Além disso, formulações convencionais, como aquelas preparadas com SPC e Col, podem facilmente se ligar a opsoninas e serem reconhecidas por macrófagos, levando a um rápido *clearance*. Contudo, o revestimento com a molécula hidrofílica PEG cria uma barreira externa ao lipossoma, que exclui macromoléculas de sua superfície e retarda a opsonização, o que pode conceder ao lipossoma a característica de longo tempo de circulação, podendo o sistema de liberação acumular-se passivamente no sítio da doença (IMMORDINO, DOSIO, CATTEL, 2006).

A Figura 14 também mostra o estudo *in vitro* de liberação de PAC na formulação comercial, uma solução de paclitaxel em veículo composto por álcool desidratado, água e Cremophor. Como observado, a liberação do fármaco nas condições testadas acontece em maior extensão e de maneira mais rápida em comparação com as formulações lipossômicas estudadas neste trabalho, o que sinaliza que os lipossomas desenvolvidos podem ser vantajosos em relação à formulação comercial, por permitir a liberação lenta e sustentada do paclitaxel. Todavia, nota-se uma liberação muito lenta do fármaco a partir da formulação comercial nas primeiras 24 h, correspondendo à liberação de aproximadamente 50% do conteúdo, já que o fármaco está aprisionado no interior da micela formada pelo tensoativo Cremophor®.

ZAMBITO, PEDRESCHI e DI COLO (2012) questionaram se as técnicas que empregam a diálise são realmente confiáveis para avaliar a liberação de fármacos a partir de sistemas de liberação. Dentro deste contexto, foi demonstrado que para os fármacos lipofílicos griseofulvina, rifampicina, diazepam e propofol, a técnica de ultrafiltração é mais adequado que a diálise para avaliar a liberação a partir de cubossomos e que o método da diálise pode fornecer resultados errôneos acerca da liberação de fármacos em sistemas coloidais, em função da interação da molécula com a membrana de diálise (BOYD, 2003).

A avaliação das formulações pela técnica da ultrafiltração mostrou liberação em maior extensão para todos os grupos analisados (Figura 15). A explicação é que o tensoativo do meio de dissolução, lauril sulfato de sódio, está em contato direto com os lipossomas quando a técnica da ultrafiltração foi empregada, o que pode causar desorganização das vesículas lipídicas e liberação do fármaco,

representando uma desvantagem desta técnica. Por outro lado, ao comparando-se as formulações avaliadas de maneira mais geral, o resultado do estudo da técnica da diálise foi semelhante ao da ultrafiltração, pois a formulação comercial foi a que mais liberou o fármaco, seguido do lipossoma não PEGado, e, por últimos, lipossoma composto por DOPE:AO e lipossoma PEGado.

Figura 15. Perfis *in vitro* de liberação de paclitaxel a partir da formulação comercial e formulações lipossômicas obtidos através da ultrafiltração com tubos Amicon, em 50 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C.

O lipossoma composto por DOPE e AO também foi avaliado com relação à sua sensibilidade a pH ácido, o que foi comprovado, visto que em pH 5,0 a formulação liberou o fármaco em maior extensão comparado ao pH 7,4, equivalente a aproximadamente 100% do total encapsulado após 72 h para o pH ácido, com o emprego da técnica da ultrafiltração (Figura 16), porém a liberação foi substancialmente menor quando a técnica clássica de diálise foi empregada. A formulação em questão possui sensibilidade ao pH ácido, uma vez que as anfífilas dos lipossomas estáveis em pH fisiológicos são protonadas em meio ácido, levando a desestabilização dos lipossomas, pois nestas condições as moléculas do DOPE retornam a sua configuração hexagonal invertida (KARANTH, MURTHY, 2007). Considerando a aplicação *in vivo* da formulação, a consequência poderia ser o aumento da liberação do fármaco no tumor, que possui meio com pH ligeiramente ácido (GERWECK, VIJAYAPPA, KOZIN, 2006). Por outro lado, para a aplicação *in*

in vivo desta formulação estudos adicionais seriam necessários, como a avaliação do efeito de PEGlação, tanto na eficiência de encapsulação quanto na liberação. O potencial zeta muito negativo também poderia acarretar maior toxicidade. Além disso, a composição baseada em DOPE:AO mostrou encapsulação reduzida de RAP quando comparado à composição SPC:Col (Tabela 09). Por estes motivos, os estudos subsequentes foram baseados em formulações compostas por SPC:Col:DSPE-PEG(2000).

Figura 16. Perfis *in vitro* de liberação de paclitaxel a partir da formulação lipossômica composta por DOPE e AO, obtidos através da diálise ou ultrafiltração em membrana de acetato de celulose (50 kDa), em 50 mL de tampão fosfato pH 5,0 contendo 1,0 % (p/v) de lauril sulfato de sódio, sob agitação de 150 rpm, a 37°C.

4.3.2 Caracterização de lipossomas convencionais contendo PAC e/ou RAP pela técnica da diálise

Conforme evidenciado pela Figura 17, lipossomas PEGlados contendo ambos PAC e/ou RAP, co-encapsulados ou não, apresentaram liberação bastante lenta pela técnica clássica da diálise, menor que 20% do total de fármacos após 72h, indicando que os fármacos permaneceram encapsulados nos lipossomas, concordando com relatos na literatura de liberação lenta e incompleta de PAC e

RAP a partir de sistemas de liberação (ZHANG et al., 2005; ROUF et al., 2009).

Figura 17. Resultados obtidos no estudo *in vitro* de liberação em membrana de diálise realizado em dissolutor, a 150 rpm, em meio tampão fosfato pH 7,4 com 1% de LSNa, a 37°C.

Lipossomas PEGlados foram capazes de reter os fármacos encapsulados, o que poderia criar um efeito depósito, de maneira similar às observações de YANG et al., (2007a), que estudaram lipossomas contendo PAC. Naquele trabalho, os autores argumentaram que dessa maneira os fármacos poderiam permanecer encapsulados nos lipossomas durante a circulação sanguínea, estáveis, podendo ser lentamente liberados no sítio tumoral, onde os lipossomas se acumulariam pelo efeito da permeabilidade e retenção aumentadas (EPR). Por outro lado, PAC e RAP preparados em solução de Cremophor® e etanol desidratado exibiram liberação mais pronunciada, correspondendo a 80% e 50%, respectivamente.

4.4 Caracterização de lipossomas: microscopia eletrônica de transmissão e estabilidade

Os lipossomas compostos por SPC:Col:DSPE-PEG (2000) contendo RAP e PAC (razão molar 10:2:0,5:1:0,33, respectivamente) tiveram sua estrutura vesicular unilamelar comprovada por análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Figura 18), cuja observação está de acordo a relato prévio de lipossomas contendo PAC (CHEN et al., 2014).

Figura 18. Resultados obtidos na avaliação da morfologia de lipossomas composto por SPC:Col:DSPE-PEG (2000):RAP:PAC (10:2:0,5:1:0,33) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com aceleração de 100 kV e aumento de 100000 vezes.

A estabilidade coloidal do lipossomas PEGlado contendo PAC e RAP co-encapsulados foi investigada através de análises de tamanho de partícula e eficiência de encapsulação de cada fármaco (Figura 19). A manutenção dos parâmetros avaliados após 1 mês a 4°C provou a estabilidade da formulação no período avaliado.

Figura 19. Resultados da avaliação da estabilidade da formulação composta por SPC:Col:DSPE-PEG (2000):RAP:PAC (10:2:0,5:1:0,33): eficiência de encapsulação e tamanho de partícula.

4.5 Caracterização de lipossomas: FTIR

O estudo de interação entre os fármacos e os adjuvantes da formulação, além da investigação do estado físico-químico dos fármacos após a encapsulação, se cristalino, molecular ou amorfo, foram realizados utilizando a técnica de espectroscopia do infravermelho (FTIR) e análises calorimétricas. A análise por FTIR é uma ferramenta útil para a investigação de interações intermoleculares, através de mudanças ou alargamento de bandas de grupamentos químicos no espectro (EMANI et al., 2014; ELOY et al., 2014b; ELOY et al., 2012). Na Figura 20, os espectros de FTIR correspondentes aos fármacos, lipossoma branco, lipossoma contendo PAC, RAP e PAC/RAP co-encapsulados, estão representados. O PAC exibe bandas principais de infravermelho como segue: vibrações de estiramento da ligação N-H em 2976-2885 cm^{-1} ; C=O de grupos ésteres em 1725 cm^{-1} ; ligação amida ao redor 1647 cm^{-1} e vibração de estiramento da ligação C-N em aproximadamente 1240 cm^{-1} (as três últimas ligações foram atribuídas com setas na Figura 20) (MARTINS et al., 2014). Com relação aos lipossomas contendo PAC, as bandas características do fármaco não estão evidentes, o que poderia ser explicado pela presença do fármaco no estado de dispersão molecular na matriz lipossomal, de maneira similar aos estudos de MARTINS et al., 2014, que avaliaram microesferas poliméricas carreadoras de PAC. O espectro de RAP mostrou bandas ao redor de 3400, 2934, 1738, 1633 e 1444 cm^{-1} , que podem ser atribuídos às vibrações de estiramento das ligações O-H, C-H, C=O, C=C e C-H adjacente à carbonila, respectivamente (as três últimas ligações foram atribuídas com setas na Figura 20) (BIAN et al., 2012). Estas bandas apareceram em intensidade reduzida nos lipossomas devido à baixa porcentagem de fármaco carreado, porém demais alterações não foram identificadas.

Figura 20. Espectro de FTIR de 4550 a 450 cm^{-1} para os fármacos PAC, RAP, lipossomas de PAC e RAP, lipossomas contendo PAC/RAP e lipossoma branco. No espectro foram indicadas com setas as bandas C=O de grupos ésteres em 1725 cm^{-1} , ligação amida ao redor 1647 cm^{-1} , vibração de estiramento da ligação C-N em aproximadamente 1240 cm^{-1} de PAC e C=O, C=C e C-H adjacente à carbonila de RAP.

4.6 Caracterização de lipossomas: análises calorimétricas

No presente trabalho, conforme apresentado na Figura 21, o PAC apresenta transição vítrea em 167°C e uma banda exotérmica em 234°C, em acordo com as observações de LIGGINS et al., 1997, que atribuíram este comportamento ao paclitaxel no estado amorfo. Estas duas bandas desapareceram nos espectros de lipossomas contendo PAC, o que poderia indicar que o fármaco está molecularmente disperso nos lipossomas, em acordo aos resultados de FTIR. O espectro de RAP exibiu duas bandas endotérmicas em 187 e 196°C, atribuídas à fusão do cristal (ROUF et al., 2011). É importante notar que as bandas de RAP nos lipossomas estão mais alargadas, aparecendo em maior temperatura, sugerindo que a rapamicina foi pelo menos parcialmente convertida do estado cristalino para o estado amorfo em lipossomas. Uma importante consequência poderia ser a maior

solubilidade, considerando que fármacos amorfos são mais solúveis do que cristalinos, acarretando em maior biodisponibilidade (ELOY et al., 2012). Adicionalmente, em alguns espectros na Figura 21 podem-se observar bandas endotérmicas ao redor de 50°C, atribuídas à perda de água. Finalmente, o TGA (Figura 22) evidenciou que o lipossoma branco é termicamente estável até 400°C, ao passo que PAC e RAP degradam a partir de 200°C. Esta característica foi preservada nos lipossomas, contudo a degradação foi menos pronunciada devido à pequena quantidade de fármacos adicionados nas formulações.

Figura 21. Curvas de DSC de 15 a 250°C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min. Picos endotérmicos estão voltados para a parte superior no gráfico.

Figura 22. Curvas de TGA de 15 a 250°C, sob taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.7 Desenvolvimento e caracterização de imunolipossomas: funcionalização de lipossomas contendo PAC e/ou RAP com o anticorpo monoclonal trastuzumabe

Para o preparo de imunolipossomas, duas estratégias diferentes podem ser empregadas, a ligação covalente ou a ligação não covalente do anticorpo na superfície do lipossoma. Na estratégia da ligação covalente, o anticorpo pode ser tanto inserido após o preparo de lipossomas através de micelas ou ainda pode ser diretamente conjugado ao lipossoma através de grupamentos químicos presentes na superfície do lipossoma, como no caso do presente trabalho (PAN et. al., 2007). Imunolipossomas são geralmente preparados através do acoplamento de anticorpos a porções distais de cadeias de PEG. Vários métodos de acoplamentos por ligação covalente tem sido descritos como estratégias para ligar anticorpos em terminações PEG utilizando lipídios PEGlados funcionalizados com um grupamento terminal quimicamente reativo, tais como hidrazida, N-3-(piridilditio)propionato, maleimida, succinil, etc. Neste protocolo, o anticorpo deve ser primeiramente derivatizado para que possa ser ligado às porções lipídicas. Uma das estratégias mais comuns emprega o reagente de Traut, o qual gera grupos tióis no anticorpo, permitindo a ligação covalente através da reação com a maleimida no lipídio PEGlado, como o DSPE-PEG2000-MAL, empregado neste trabalho (SCHNYDER et al., 2004; BARRAJÓN-CATALÁN et al., 2010).

O trastuzumabe tiolado foi conjugado com sucesso ao DSPE-PEG-Mal presente na superfície da bicamada lipídica dos lipossomas através de ligação covalente, cuja reação foi esquematicamente representada na Figura 23. A Figura 24 mostra uma representação gráfica dos cromatogramas obtidos após a eluição dos imunolipossomas em uma coluna CL-4B seguidos da quantificação de proteína nas frações obtidas.

Resultados e Discussão

Figura 23: Representação do protocolo de preparo de imunolipossoma. Adaptado de ELOY et al., 2016b

Figura 24. Representação gráfica dos cromatogramas obtidos à partir da eluição de imunolipossomas em colunas CL-4B usando PBS pH 7,4, com quantificação de proteínas pelo método BCA. Frações de 4-6 são atribuídas aos imunolipossomas. A: imunolipossoma branco, B: imunolipossoma contendo PAC, C: imunolipossoma contendo RAP e D: imunolipossoma contendo PAC/RAP co-encapsulados.

A integridade de trastuzumabe após a funcionalização do lipossoma foi confirmada por eletroforese em gel de SDS-PAGE sob condições redutoras (Figura 25). Como esperado, duas bandas distintas foram visualizadas em 25 kDa e 50 kDa, correspondendo, respectivamente, à cadeia leve e pesada do anticorpo, indicando

Resultados e Discussão

que o trastuzumabe foi incorporado de forma intacta ao lipossoma, de maneira similar às observações de YANG et al 2007b, que desenvolveram imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe contendo PAC.

Figura 25. Resultados obtidos nos estudos para verificação da integridade de trastuzumabe (trastuzumabe, imunolipossoma branco, imunolipossoma de PAC, imunolipossoma de RAP e imunolipossoma com PAC/RAP co-encapsulados) utilizando a técnica de eletroforese em SDS-PAGE sob condições redutoras a 175 V por 30 min.

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostraram que a eficiência de funcionalização variou de aproximadamente 50 a 80% nos diferentes imunolipossomas preparados avaliado através da quantificação de proteína nas frações de imunolipossoma em relação à quantidade total de anticorpo adicionado. Ainda, o tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta mantiveram-se em aproximadamente 150 nm, 0,3 e -10mV, respectivamente. Comparado aos valores apresentados pelos lipossomas, o tamanho de partícula e a polidispersividade foram ligeiramente maiores, ao passo que o potencial zeta assumiu valores mais negativos, provavelmente em função da carga concedida pelo anticorpo. Destaca-se que a encapsulação de paclitaxel e/ou rapamicina não foram afetadas. Além disso, como pode ser observado na Figura 26, os lipossomas mantiveram-se como vesículas esféricas e unilamelares.

Tabela 10. Desenvolvimento de imunolipossoma contendo PAC e/ou RAP: avaliação de eficiência de funcionalização, eficiência de encapsulação, tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta.

Formulação	Eficiência de funcionalização (%)	Eficiência de encapsulação (%)	Tamanho de partícula (nm)	Polidispersividade	Potencial zeta (mv)
Imunolipossoma branco	62,78	*	168,2 ± 12,6	0,376 ± 0,02	-9,44 ± 0,33
Imunolipossoma RAP	80,49	50,28 ± 3,54	138,2 ± 5,9	0,309 ± 0,03	-10,50 ± 0,66
Imunolipossoma PAC	50,57	52,76 ± 5,67	148,5 ± 8,0	0,334 ± 0,01	-10,20 ± 0,34
Imunolipossoma PACRAP	72,31	55,87 ± 3,12 (PAC) / 69,51 ± 4,98 (RAP)	140,3 ± 4,3	0,317 ± 0,02	-9,85 ± 0,12

Figura 26. Resultados da avaliação da morfologia de imunolipossomas composto por SPC:Col:DSPE-PEG (2000):RAP:PAC (10:2:0,5:1:0,33) por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) com aceleração de 100 kV e aumento de 100000 vezes.

4.8 Avaliação em cultura celular de lipossomas e imunolipossomas

4.8.1 Citotoxicidade nas linhagens celulares 4T1 e SKBR3

O primeiro passo da avaliação da eficácia das formulações contra o câncer de mama foi a investigação da citotoxicidade pelo método do MTT nas linhagens celulares murina 4T1 (Figura 27), triplo negativa, e humana SKBR3 (Figura 27), HER2 positiva, ambas as células de características altamente metastáticas. Resultados apresentados na Tabela 11 mostraram que PAC é mais citotóxico do

que RAP, para 4T1, similarmente ao estudo de MISHRA et al., 2003 executado em células HUVEC, porém é menos citotóxico que RAP em linhagem celular SKBR3. Lipossomas contendo PAC se mostraram ligeiramente mais citotóxicos do que PAC em solução para as duas linhagens celulares estudadas, enquanto RAP encapsulada mostrou-se mais citotóxica apenas para a linhagem 4T1. A melhor citotoxicidade em sistema de liberação também foi relatada anteriormente, em um estudo que reportou que a encapsulação de rapamicina em lipossomas convencionais e pH sensíveis, permitindo maior citotoxicidade a células de câncer HT-29, comparado ao fármaco em solução (GHANBARZADEH et al., 2014). Ademais, a melhor citotoxicidade conseguida com sistemas de liberação poderia resultar do *uptake* aumentado, como já demonstrado para lipossomas contendo doxorubicina avaliado em células 4T1 (LIU et al., 2013).

Figura 27. Fotomicrografias das células 4T1 (A) e SKBR3 (B) cultivadas em meio RPMI completo com 10% de FBS, com 1% de solução de antibiótico/antimicótico, a 37°C com 5% de CO₂. Objetiva de 10x em microscópio óptico invertido.

Tabela 11. Valores de IC50 determinados pelo método do MTT para as linhagens celulares 4T1 e SKBR3.

Grupo	IC50 (nM)	
	4T1	SKBR3
PAC solução	66,69	1991,00
RAP solução	1228,07	867,03
PAC/RAP solução (IC50 PAC)	43,07	111,37
PAC/RAP solução (IC50 RAP)	142,27	367,51
PAC lipossoma	46,48	1170,67
PAC imunolipossoma	5473,83	915,53
RAP lipossoma	278,19	10741,28
RAP imunolipossoma	38598,42	2197,49
PAC/RAP lipossoma (IC50 PAC)	11,77	939,24
PAC/RAP lipossoma (IC50 RAP)	38,74	3099,49
PAC/RAP imunolipossoma (IC50 PAC)	4032,24	297,72
PAC/RAP imunolipossoma (IC50 RAP)	13301,32	982,49

Por outro lado, deve-se considerar que a PEGlação em alguns casos pode retardar a internalização celular, comprometendo o valor de IC50, como discutido por CROSASSO et al., 2000. Contudo, outras vantagens da encapsulação de

fármacos, que não somente o aumento da citotoxicidade à célula alvo devem ser levadas em consideração, como a melhora da farmacocinética e a diminuição dos efeitos colaterais. Por exemplo, Doxil[®], o primeiro lipossoma disponível comercialmente, composto por HSPC, Col e DSPE-PEG, é consideravelmente menos tóxico a células OV-1063 que a doxorubicina livre. Naquela ocasião, os autores concluíram que os lipídios com maior temperatura de transição de fase, como HSPC, causavam liberação mais lenta do fármaco, resultando em formulações menos citotóxicas (HOROWITZ et al., 1992). Todavia, apesar de menos citotóxico, e também não apresentar melhor eficácia clínica, como demonstrado posteriormente, o Doxil[®] é capaz de reduzir a cardiotoxicidade comparado ao fármaco livre, o que é uma vantagem clínica extremamente relevante.

Os resultados apresentados na Tabela 11 evidenciaram que os imunolipossomas tanto de PAC, quando de RAP, co-encapsulados ou não, reduziram o valor de IC₅₀ para cada fármaco, o que era esperado, considerando que a célula SKBR3 possui receptor para o ligante trastuzumabe, acoplado à superfície dos imunolipossoma, permitindo a entrega seletiva dos fármacos. Em contraste, os imunolipossomas apresentaram efeito contrário na célula 4T1, que não possui receptor para trastuzumabe, com valores de IC₅₀ bem maiores quando comparados aos lipossomas.

Tabela 12. Valores de índice de combinação (CI) para PAC e RAP em solução, lipossoma e imunolipossoma para as linhagens celulares 4T1 e SKBR3.

	CI	
	4T1	SKBR3
Solução	0,76	0,48
Lipossoma	0,39	1,09
Imunolipossoma	1,08	0,77

Destaca-se que quando os dois fármacos foram combinados, observou-se um potente sinergismo ($CI < 1$) para a solução e particularmente para o lipossoma em célula 4T1, porém em imunolipossomas o efeito foi de aditividade (CI próximo a 1) (Tabela 12). Em células SKBR3 o sinergismo foi maior em solução, porém também

foi observado em imunolipossomas, ao passo que os lipossomas apresentaram efeito aditivo de PAC e RAP. Em suma, o imunolipossoma mostrou-se essencial para manter o efeito sinérgico dos dois fármacos na linhagem HER2 positiva.

Nossos resultados estão de acordo ao potente sinergismo de paclitaxel e rapamicina, tanto em solução quanto co-encapsulados em micelas poliméricas, previamente reportadas (MONDESIRE et al., 2004; SHIN et al., 2011). Com relação ao mecanismo de sinergismo entre PAC e RAP, MONDESIRE et al. (2004) propôs que o tratamento com RAP pode aumentar a apoptose induzida por PAC, envolvendo ativação de caspase e a *down* regulação da via mTOR.

A combinação de RAP e trastuzumabe tem demonstrado relevância clínica. Recentemente, um estudo de fase II demonstrou que RAP administrada diariamente em pacientes foi bem tolerada. Os autores sugeriram que a inibição da via mTOR pode superar a resistência ao trastuzumabe em alguns tumores HER2 positivos (ACEVEDO-GADEA et al., 2015). Outros estudos clínicos de fase I e II demonstraram que o fármaco everolimus, um derivado da rapamicina, quando combinado com PAC e trastuzumabe, foi bem tolerado e apresentou resultados promissores em pacientes com tumores de mama HER2 positivos. Atualmente, esta combinação está sendo investigada em estudo clínico de fase III, BOLERO-1 (ANDRE et al., 2010; HURVITZ et al., 2013)

4.8.2 Avaliação do *uptake* celular em células 4T1 e SKBR3: microscopia confocal e citometria de fluxo

O *uptake* de lipossomas e imunolipossomas foi primeiramente avaliado por microscopia confocal em linhagem celular 4T1, de característica triplo negativa e SKBR3, que superexpressa o receptor HER2, através da visualização da ligação e internalização celular das formulações no tempo de 24h de tratamento. Para tanto, as formulações foram preparadas com o marcador Dio, que é capaz de marcar a bicamada lipídica com fluorescência em verde (MORTENSEN et al., 2013). Neste experimento, o núcleo das células foi marcado com DAPI, que concede fluorescência em azul para o núcleo.

Conforme evidenciado pela Figura 28 A e B, o *uptake* após 24 h de aplicação de lipossomas e imunolipossomas foi similar para as duas formulações na célula

4T1, que não expressam receptor para trastuzumabe, considerando a fluorescência de Dio, que indica internalização da nanoestrutura pela célula. Por outro lado, para linhagem celular SKBR3 (Figura 28 C e D), a fluorescência na membrana, mas principalmente no citoplasma celular, foi maior para o imunolipossoma, indicando o maior *uptake* dessa formulação, possivelmente por endocitose mediada pela interação ligante (trastuzumabe) – receptor HER2. Apesar de lipossomas PEGlados acumularem-se na região do tumor pelo efeito EPR, lipossomas conjugados a anticorpos tem a vantagem de apresentar maior especificidade por antígenos expressos na superfície de células (PETRILLI et al., 2014). A fluorescência em verde foi quantificada e correspondeu ao dobro para imunolipossoma em relação a lipossoma após 24 h para a célula SKBR3 (Figura 29), confirmando a expectativa. Destaca-se que o tempo de 24 h de incubação também foi empregado nos estudos de VELDMAN et al. (2005) para lipossomas contendo doxorrubicina funcionalizados com *N*-octanoil-glicosilceramida.

Estudos de microscopia de fluorescência apresentados no trabalho BURKS et al., 2010 demonstraram que imunolipossomas anti-HER2 sofreram *uptake* por células Hc7, HER2 positivas, indicado por fluorescência dos marcadores carboxifluoresceína e rodamina-PE. Por outro lado, as linhagens celulares MCF-7, que expressam níveis fisiológicos de receptor HER2 e células CV1, que não expressam receptor HER2, apresentaram baixa ou nenhuma fluorescência, respectivamente, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

Figura 28: Fotomicrografias mostrando o *uptake* pelas células 4T1 e SKBR3 após 24 horas de tratamento de lipossomas e imunolipossomas. A e B correspondem a lipossoma e imunolipossoma aplicados à célula 4T1, enquanto C e D correspondem a lipossoma e imunolipossoma aplicados à célula SKBR3. I corresponde fluorescência de DAPI, II de Dio e III corresponde à sobreposição dos dois

marcadores. Objetiva de 63X foi empregada e os mesmos parâmetros de intensidade do laser e exposição foram utilizados.

Figura 29. Resultados obtidos na quantificação de fluorescência de Dio de lipossoma e imunolipossoma após 24 horas de tratamento nas linhagens 4T1 e SKBR3 pelo software Leica LAS X.

Com o intuito de quantificar o *uptake* sofrido pelas células 4T1 e SKBR3, foram realizados experimentos de citometria de fluxo. A Figura 30 mostra que não houve marcação positiva para Dio (Q2 e Q4) para os controles de células sem tratamentos, conforme esperado. A marcação positiva para Dio para lipossoma e imunolipossoma após 24h de tratamento situou-se principalmente no quadrante Q4, ou seja, são células viáveis, marcadas negativamente com iodeto de propídio. A Figura 30 mostra a porcentagem de células no quadrante Q4, comprovando que as formulações sofreram *uptake* após 24h, corroborando os resultados dos experimentos de microscopia confocal. Ainda, a porcentagem de células que sofreram *uptake* foi a mesma para lipossomas e imunolipossomas (Figura 31), seja em células 4T1 ou SKBR3 após 24 h de incubação, o que pode ser justificado pela

composição das formulações, baseadas em SPC:Col, componentes de membrana celular que podem ter *uptake* facilitado. Por outro lado, com relação à intensidade de fluorescência, foi observada diferença significativa entre as formulações, sendo que as células tratadas com imunolipossomas tiveram intensidade de fluorescência três vezes maior do que as células tratadas com lipossomas após 24 h em células SKBR3 (Figura 32), em concordância à quantificação de fluorescência por microscopia confocal, mostrando a potente entrega seletiva de imunolipossoma para a célula HER2 positiva. Já para a célula 4T1, a intensidade do *uptake* foi ligeiramente maior para o lipossoma. Deste modo, pode-se concluir que a mesma porcentagem de células sofreu *uptake* por lipossomas ou imunolipossomas após 24h, porém a intensidade do *uptake* foi maior para imunolipossomas, que exibem em sua superfície o anticorpo trastuzumabe, que se liga ao receptor HER2 das células SKBR3, ocorrendo então a internalização celular.

Dentro deste contexto, BARRAJÓN-CATALÁN et al., 2010 prepararam imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe para a entrega seletiva a células HER2+ do peptídeo melitina, com propriedades antimicrobianas e antitumorais. Estudos em citometria de fluxo combinados com a captação de imagem (ImageStream) evidenciaram a captação específica de imunolipossomas a células SKBR3. Os experimentos mostraram que lipossomas marcados com rodamina ligada ao trastuzumabe exibiram um nível aproximadamente três vezes mais alto de ligação à SKBR3 do que os lipossomas com rodamina, porém sem o anticorpo.

Figura 30. Resultados obtidos na avaliação do *uptake* celular de lipossomas e imunolipossomas por células 4T1 (A) e SKBR3 (B) após 24 h. I, controle de célula sem tratamento após 24h; II, células tratadas com lipossomas após 24h; III, células tratadas com imunolipossomas após 24h.

Figura 31. Porcentagem das células positivas para Dio e negativas para iodeto de propídio (Q4), tratadas com lipossoma e imunolipossoma após 24 h de incubação em células 4T1 e SKBR3.

Figura 32. Intensidade de fluorescência de Dio (intensidade de *uptake*) no quadrante Q4 de lipossoma e imunolipossoma após 24 h de incubação em células 4T1 e SKBR3.

4.9 Avaliação antitumoral de soluções, lipossomas e imunolipossomas *in vivo*

4.9.1 Estudo *in vivo* de eficácia antitumoral em modelo com tumores do tipo triplo negativos

Para o estudo *in vivo*, células de carcinoma murino 4T1 foram empregadas para o transplante em camundongos. Estas células são altamente tumorigênicas, invasivas, e podem espontaneamente causar metástase em sítios distantes, incluindo linfonodos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e ossos. Portanto, tumores desenvolvidos com células 4T1 (Figura 33) possuem muitas características que os tornam modelos adequados de câncer de mama, empregados para a avaliação terapêutica de nanopartículas (LUO et al., 2010; MERAZ et al., 2014; PULASKI et al., 2001; BISWAS et al., 2012).

Figura 33. Camundongo BALB-C com tumores de mama desenvolvidos após 14 dias de injeção de células 4T1.

Para determinar o efeito da encapsulação dos fármacos, bem como a consequência da terapia combinada de PAC e RAP, no efeito terapêutico em carcinoma de mama *in vivo*, foram avaliadas soluções de paclitaxel e rapamicina, administradas separadamente ou em conjunto, lipossoma contendo PAC, lipossoma com RAP, lipossoma contendo PAC/RAP co-encapsulados, bem como salina como controle negativo. Os resultados apresentados na Figura 34 mostraram que a solução de paclitaxel teve pouco efeito na inibição do crescimento tumoral e não foi estatisticamente diferente do controle negativo, confirmando os resultados obtidos por LUO et al., 2010. Ao final do experimento, o tumor aumentou em 307% para o grupo onde solução de PAC foi administrada, comparado a um aumento de 173% para o grupo de lipossoma, e 340% para os tumores do controle negativo (ELOY et al., 2016a).

Figura 34. Resultados obtidos na avaliação da eficácia terapêutica de grupos controle negativo, controle positivo com soluções dos fármacos e lipossomas em camundongos BALB/C com tumores de mama desenvolvidos com a célula 4T1. Os gráficos representam o acompanhamento do volume tumoral percentual (volume tumoral no momento da medida em relação ao volume tumoral inicial). As doses de PAC e RAP foram respectivamente de 5 mg/kg and 15 mg/kg administradas a cada 3 dias, totalizado 5 administrações no total. * ($p < 0,1$), ** ($p < 0,05$) e *** ($p < 0,001$) (teste t de student).

Por outro lado, os tumores foram mais sensíveis à solução de RAP, causando uma redução tumoral estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo. No caso de RAP, houve diferença estatística entre o controle negativo e o controle positivo, porém não houve diferença estatística entre os grupos de solução e lipossoma (Figura 34). Devem ser considerados, entretanto, os outros benefícios da encapsulação em sistemas de liberação. Particularmente para o caso de RAP, a encapsulação tem o potencial de prevenir o sequestro do fármaco por eritrócitos e a degradação química, que em conjunto limitam o emprego de RAP na terapia do câncer (MITA et al., 2003; YATSCOFF 1996).

Figura 35. Fotografia dos tumores de cada grupo experimental extraídos na biópsia ao final do estudo *in vivo*.

Considerando que a terapia combinada de dois fármacos com diferentes mecanismos de ação é uma abordagem interessante para explorar o sinergismo de fármacos que atuam em diferentes etapas da progressão do câncer, e também em decorrência dos resultados promissores *in vitro*, foram testadas a eficácia dos fármacos PAC e RAP combinados em solução e co-encapsulados em lipossoma (HE et al., 2011; HASENSTEIN et al., 2012). Com relação a razão empregada de PAC e RAP, foi testada a razão de 1:3, resultando em doses administradas para cada ciclo de quimioterapia de 5 e 15 mg/kg, respectivamente, as mesmas doses estudadas em trabalho prévio (BLANCO et al., 2014). Destaca-se que no trabalho de BLANCO et al., (2014), a eficácia antitumoral avaliada em animais com tumores de mama desenvolvidos com a célula MCF-7 foi superior para a razão de PAC/RAP de 1:3, comparado a razão de 2:1, evidenciando a correta seleção da razão entre os dois fármacos para o sinergismo. A partir dos resultados apresentados nas Figuras 34 e 35, confirmando os resultados do estudo *in vitro*, é evidente que a combinação dos fármacos em lipossoma foi melhor que em solução, resultado em aumento do tumor em 115% e 185%, respectivamente, comparado ao aumento de 340% dos tumores no controle negativo ao final do experimento (ELOY et al., 2016a).

Adicionalmente, as imagens na Figura 36 demonstraram a diminuição da proliferação tumoral para os grupos de soluções de RAP e PAC/RAP, bem como

para os lipossomas, comparado ao controle negativo, evidenciado através da coloração em marrom de áreas em proliferação celular avaliadas pelo anticorpo anti-Ki67.

Figura 36. Ensaio imunohistoquímico com tumores de mama, realizado com teste do anticorpo anti-Ki67. a – controle negativo, b – PAC (solução), c – RAP (solução), d - PAC/RAP (solução), e - PAC (lipossoma), f - RAP (lipossoma) e g - PAC/RAP (lipossoma).

Os melhores resultados alcançados com a combinação de fármacos em lipossomas podem ser atribuídos à melhora potencial da farmacocinética de PAC e RAP, através da conversão dos fármacos para formas mais solúveis, i.e molecular para PAC e amorfa para RAP, reveladas pelas análises de infravermelho e calorimétricas. Adicionalmente, o efeito EPR característico de nanopartículas pode certamente ter contribuído para o aumento da eficácia terapêutica observada no presente trabalho (FANG et al., 2011; HE et al., 2015). As nanopartículas, como os lipossomas, podem sustentar a liberação do fármaco encapsulado, resultando em múltiplos benefícios, como a diminuição do número de administrações, bem como continuamente expor o tumor ao fármaco, com influência positiva no efeito anticâncer *in vivo* (PALMA et al., 2014). Além disso, como discutido por BLANCO et al., (2014), o efeito sinérgico antitumoral de PAC e RAP pode ser aumentado quando ambos os fármacos são liberados ao mesmo tempo no tumor, através da co-liberação a partir de nanopartículas, confirmando os resultados obtidos no presente

trabalho. Com o emprego desta abordagem de combinação de fármacos, é possível aproveitar as vantagens de ambos paclitaxel e rapamicina, bem como compensar as deficiências de cada um. Deste modo, é possível um efeito sinérgico, considerando que RAP melhora a sensibilidade da célula tumoral a PAC, superando a resistência desenvolvida no câncer (MONDESIRE et al., 2004; VANDERWEELE et al., 2004; BLANCO et al., 2014).

Finalmente, a massa corporal e a sobrevivência dos animais no decorrer do experimento foram monitorados. Os resultados mostrados na Figura 37 não evidenciaram alterações significativas na massa corporal dos animais, ao passo que os resultados da Figura 38 mostraram que todos os animais do grupo do lipossoma com PAC/RAP co-encapsulados sobreviveram ao final do estudo, sugerindo mínima toxicidade aguda, coerente com o esperado de lipossomas, que são considerados os sistemas de liberação mais compatíveis e seguros, que tem apresentado enorme êxito clínico, representando a classe de nanopartícula atualmente com maior sucesso no mercado para o tratamento de diversas doenças, principalmente o câncer (ALLEN e CULLIS, 2013; MALLICK et al., 2014).

Figura 37. Registro da massa corporal dos animais ao longo do estudo *in vivo*.

Figure 38. Curva de sobrevivência dos animais ao longo do estudo *in vivo*.

4.9.2 Estudo *in vivo* de eficácia antitumoral em modelo xenográfico do tipo HER2 positivo

A última etapa do trabalho consistiu na avaliação da combinação de PAC e RAP, em solução, lipossoma e imunolipossoma, administrados em animais com tumores de mama xenográficos, induzidos com a linhagem que superexpressa o receptor para o anticorpo trastuzumabe, SKBR3. Com a injeção das células na glândula mamária, após o tempo de 18 dias o tumor desenvolveu-se, de acordo à imagem da Figura 39.

Figura 39: Tumor xenográfico de câncer de mama induzido com a linhagem celular SKBR3 por injeção intramamária após 18 dias.

Resultados e Discussão

Conforme observado nas Figuras 40 e 41, ao final do estudo o grupo de imunolipossomas contendo PAC e RAP co-encapsulados foi aquele que melhor controlou o crescimento tumoral, cuja média de volume tumoral correspondeu a 25,27%, 44,38% e 47,78% das médias de volumes tumorais do controle negativo, controle positivo e lipossoma, respectivamente. O imunolipossoma teve um efeito potente de controle do crescimento tumoral de característica HER2 positiva quando comparado ao lipossoma, o que indica a habilidade da formulação funcionalizada com o anticorpo trastuzumabe em potencializar a entrega dos fármacos às células tumorais, mediado por interação ligante (anticorpo) e receptor, corroborando os estudos em cultura celular, tanto de citotoxicidade, que provou o sinergismo entre PAC e RAP em imunolipossoma, quanto de *uptake* na célula SKBR3, que foi maior em imunolipossoma comparado ao lipossoma, nos estudos de microscopia confocal e citometria de fluxo. Além disso, é importante considerar que a associação entre trastuzumabe e PAC, clinicamente aprovada, e de derivados de rapamicina para contornar a resistência ao trastuzumabe, tem sido descrita como vantajosas, melhorando o prognóstico e sobrevida de pacientes (CHANG et al., 2010; VICER et al., 2014).

Figura 40. Curva de crescimento tumoral em modelo xenográfico desenvolvido com a linhagem celular SKBR3. Grupos administrados (2 vezes por semana, totalizando 6 administrações): controle negativo (salina), controle positivo (PAC e RAP, 5 e 15 mg/kg), lipossoma (PAC e RAP, 5 e 15 mg/kg) e imunolipossoma (PAC e RAP, 5 e 15 mg/kg). Teste estatístico two-way ANOVA com pós teste Bonferroni, $p < 0,1$ *, $p < 0,01$ ** e $p < 0,001$ ***. CP = controle positivo, L = lipossoma e IM = imunolipossoma.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com as observações de YANG et al., 2007c. Os autores compararam lipossomas e imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe para a entrega de PAC a tumores xenográficos de mama HER2 negativos (com o emprego da linhagem celular MDA-MB231) e HER2 positivos (com o emprego da linhagem celular BT-474). Os resultados mostraram que os imunolipossomas foram superiores ao Taxol® e ao lipossoma com relação ao controle do crescimento tumoral no modelo tumoral HER2 positivo, ao passo que lipossomas e imunolipossomas foram equivalentes considerando o modelo tumoral HER2 negativo. Os autores argumentaram que os imunolipossomas são capazes de serem transferidos seletivamente às células tumorais (*targeting*) via receptores alvo de trastuzumabe, uma vez que são

Resultados e Discussão

internalizados por endocitose após a ligação à superfície da célula. Finalmente, discutiu-se que os imunolipossomas são capazes de combinar a farmacocinética favorável, através do longo tempo de circulação conferido pela PEGlação, e a elevada citotoxicidade seletiva, mediada pela interação anticorpo e receptor.

Figura 41. Fotos dos tumores xenográficos HER2 positivos removidos ao final da última medida do volume tumoral. I - controle negativo, II - controle positivo, III - lipossoma e IV - imunolipossoma.

As massas dos animais foram registradas ao longo do estudo (Figura 42) e notou-se que os grupos sob tratamento não tiveram perda de massa corporal, uma das maneiras de indicar baixa toxicidade. Por outro lado, o grupo do controle negativo registrou 15% de aumento de peso ao final do estudo, o que está relacionado com o desenvolvimento de ascite em alguns animais. Destaca-se que a ascite foi registrada apenas no grupo do controle negativo, o que pode estar relacionada à metástase tumoral para o peritônio, uma vez que este grupo não recebeu o tratamento.

Figura 42. Registro da massa corporal dos camundongos ao longo do estudo *in vivo* em modelo xenográfico HER2 positivo.

Ademais, apenas o grupo do controle negativo registrou morte de animais (1) ao longo do estudo, enquanto que todos os animais dos grupos que receberam tratamento, seja em solução de fármacos, lipossoma ou imunolipossoma, mantiveram-se vivos até o final do estudo (Figura 43).

Figura 43. Gráfico de sobrevivência dos camundongos ao longo do estudo *in vivo*.

Finalmente, foi realizada a análise histológica por coloração com HE dos tumores obtidos no experimento executado em modelo xenográfico HER2 positivo. Com relação às características morfológicas das células tumorais, não foi observada

diferença qualitativa entre os grupos, evidenciando a homogeneidade dos tumores desenvolvidos com as células SKBR3. Por outro lado, o índice de mitose contado em 10 campos de grande aumento, equivalendo a, respectivamente, 2, 2, 1 e < 1 para controle negativo, controle positivo, lipossoma e imunolipossoma, evidenciou menor atividade mitótica para o grupo em que o imunolipossoma foi administrado, em concordância com os menores valores de volume tumoral ao final do experimento causados por esta formulação. Ainda, para o grupo de lipossoma contendo os fármacos PAC e RAP, pode-se notar presença de área necrótica adjacente a vaso sanguíneo, o que não foi observado nos outros grupos (Figura 44). Hipoteticamente, no grupo tratado com imunolipossoma houve morte celular por necrose, que foi reabsorvida, considerando os tamanhos reduzidos dos tumores ao final do experimento.

Figura 44. Fotomicrografia de cortes histológicos dos grupos A (controle negativo), B (controle positivo), C (lipossoma) e D (imunolipossoma), marcados com hematoxilina-eosina (HE). As setas indicam células em mitose.

Além da melhor eficácia antitumoral *in vivo*, como demonstrado neste trabalho, os imunolipossomas possuem em potencial a propriedade de reduzir os efeitos colaterais associados à quimioterapia, considerando que a estratégia de *targeting* permite que o fármaco seja entregue especificamente à célula tumoral, no tempo e concentração adequados. Apesar de um conjugado de anticorpo com quimioterápico (ligados covalentemente), brentuximabe-vedotina, ter sido aprovado para uso clínico e diversos outros estarem em desenvolvimento clínico, os imunolipossomas ainda não alcançaram o mesmo sucesso e são poucos os estudos

pré-clínicos na literatura, reportando o uso bem sucedido de imunolipossomas (MANJAPPA et al., 2011; SAPRA e SHOR, 2013). Neste contexto, um estudo clínico promissor é de lipossoma PEGlado de doxorubicina funcionalizado com fragmentos de anticorpos contra o receptor HER2, que atualmente está em andamento na fase I (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01304797>). Todavia, não há medicamentos antitumorais baseados em imunolipossomas disponíveis no mercado, o que indubitavelmente serve de estímulo à pesquisa dessa classe de nanoestruturas.

Como discutido na revisão de literatura de GAO et al., (2013), é razoável prever que imunolipossomas serão aprovados para uso clínico, o que beneficiará os pacientes em tratamento para o câncer. Porém, desafios ainda precisam ser vencidos, como a falha em demonstrar eficácia com relação ao lipossoma, o alto custo de seu desenvolvimento, e problemas de incorporação de fármacos antitumorais (SAPRA e SHOR, 2013). Ressalta-se que no presente trabalho logrou-se incorporar paclitaxel e rapamicina em imunolipossomas, com adequados valores de eficiência de encapsulação, e o imunolipossoma foi bem sucedido em avaliação pré-clínica em modelo HER2 positivo comparado aos demais controles, inclusive os lipossomas. Contudo, os desafios de custo e ampliação para a escala industrial ainda precisam ser contornados.

Conclusão

Os resultados apresentados e discutidos evidenciaram que as composições baseadas em SPC:Col, convencional, e em DOPE:AO, pH sensível, foram capazes de encapsular paclitaxel com adequada eficiência e tamanho de partícula nanométrico. Os estudos subsequentes foram direcionados com a formulação clássica, PEGlada com DSPE-PEG (2000), com características adequadas à administração parenteral. Considerando a proposta de co-encapsular dois fármacos com mecanismos de ação diferentes frente à inibição do câncer de mama, testaram-se dois fármacos, a metformina hidrocloreto, hidrofílica, e a rapamicina, lipofílica, em diferentes composições lipídicas. Em razão de sua lipofilicidade, logrou-se encapsular a rapamicina com melhor eficiência do que a metformina hidrocloreto, o por isso o primeiro fármaco foi escolhido para ser co-encapsulado com paclitaxel, gerando uma formulação baseada em SPC:Col:DSPE-PEG 2000:RAP:PAC (10:2:0,5:1:0,33), com adequados valores de encapsulação para ambos os fármacos, tamanho de partícula nanométrico com adequada polidispersividade e potencial zeta neutro. O lipossoma com paclitaxel e rapamicina co-encapsulados foi capaz de criar um efeito depósito, com liberação lenta dos fármacos, uma característica adequada para o tratamento de tumores sólidos. A investigação do estado de dispersão de paclitaxel e rapamicina mostrou que o primeiro está disperso no lipossoma molecularmente, enquanto o segundo está disperso no estado amorfo, ambos mais biodisponíveis que o estado cristalino. Ainda, o lipossoma co-encapsulado apresentou morfologia esférica e provou ser estável. Em outra etapa, houve sucesso no preparo de imunolipossomas, funcionalizados com o anticorpo monoclonal trastuzumabe, para entrega seletiva de paclitaxel e/ ou rapamicina para células tumorais HER2 positivas. Estas formulações apresentaram adequados valores de eficiência de funcionalização e eficiência de encapsulação dos fármacos, potencial zeta negativo e tamanho de partícula nanométrico. A avaliação em cultura celular empregando células triplo negativas (4T1) e HER2 positivas (SKBR3) mostrou o sinergismo de paclitaxel e rapamicina em lipossoma, para 4T1, e imunolipossoma, para SKBR3. O aumento do *uptake* mediado pelo imunolipossoma à linhagem SKBR3 foi demonstrado, o que explica os resultados promissores de citotoxicidade. Por último, estudos com modelos animais para o câncer de mama triplo negativo e HER2 positivo mostraram, respectivamente, o sinergismo *in vivo* de paclitaxel e

Conclusão

rapamicina co-encapsulados em lipossomas, e o efeito da funcionalização do lipossoma com os dois fármacos co-encapsulados, resultando em potencialização do efeito antitumoral em tumores HER2 positivos. Em suma, o efeito antitumoral pré-clínico demonstrado neste trabalho é promissor e pode servir de base para futuros testes clínicos de imunolipossomas funcionalizados com trastuzumabe para a entrega seletiva de paclitaxel e rapamicina, agindo em efeito sinérgico, para combater o câncer de mama, representando um importante avanço no tratamento desta doença.

Referências

6. REFERÊNCIAS

Referências

- AAPRO, M.S. Adjuvant therapy of primary breast cancer: a review of key findings from the 7th international conference, St. Gallen. **The oncologist**, v. 6, p. 376 – 385, 2001.
- ACEVEDO-GADEA., et al. Sirulimus and trastuzumab combination therapy for HER2 positive metastatic breast cancer after progression on prior trastuzumab therapy. **Breast Cancer Research**, v. 150, p. 157-167, 2015.
- AHN, J. et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, p. 2091-2102, 2007.
- ALLAN, A.L. et al. Tumor dormancy and cancer stem cells: implications for the biology and treatment of breast cancer metastasis. **Breast Disease**, v. 26, p. 87-98, 2008.
- ALLEN, T.M., CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p.36–48, 2013.
- ALJADA, A., MOUSA, S.A. Metformin and neoplasia: Implications and indications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 133, p. 108-115, 2012.
- ANDERSON, G.F., CHU, E. Expanding priorities-confronting chronic disease in countries with low income. **New England journal of medicine**, v. 356, p. 209 – 211, 2007.
- ANDRE, F., et al. Phase I study of everolimus plus weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with metastatic breast cancer pretreated with trastuzumab. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, p.5510-5115, 2010.
- BANGHAM, A.D., STANDISH, MM., WATKINS, J,C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, **J. Mol. Biol**, v. 13, p. 238–252, 1965.

Referências

- BARRAJÓN-CATALÁN, E. et al.. Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level. **Cancer Letters**, v. 290, p.192–203, 2010.
- BARTLETT, J.M. et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial.**Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p. 1531-1538, 2011
- BERTOS, N. R., PARK, M. Breast cancer – one term, many entities? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 3789-3796, 2011.
- BIAN, H. et al. In vitro study of poly(ethylene carbonate) as a drug-eluting stent coating. **Progress in Natural Science: Materials International**, v. 22, p. 295–302, 2012.
- BISWAS, S. et al. Liposomes loaded with paclitaxel and modified with novel triphenylphosphonium-PEG-PE conjugate possess low toxicity. target mitochondria and demonstrate enhanced antitumor effects in vitro and in vivo, **Journal of Controlled Release**, v. 159, p. 393–402, 2012.
- BLANCO, E., et al. Colocalized delivery of rapamycin and paclitaxel to tumors enhances synergistic targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Molecular Therapy**, v. 22, p. 1310-1319, 2014.
- BOYD, B.J. Characterization of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 239-247, 2003.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº RE 899, de 29 de maio de 2003.

Referências

- BRAY, F., McCARRON, P., PARKIN, D.M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast cancer research**, v. 6, p. 229 – 239, 2004.
- BURKS, S. et al. Anti-HER2 immunoliposomes for selective delivery of electron paramagnetic resonance imaging probes to HER2-overexpressing breast tumor cells. **Breast Cancer Res Treat**, v. 124, p. 121-131, 2010.
- CHANG, H.R. Trastuzumab-Based Neoadjuvant Therapy in Patients With HER2-Positive Breast Cancer. **Cancer**, v. 116, p. 2856-2867, 2010.
- CHANG, X.Z. et al. Identification of the functional role of peroxiredoxin 6 in the progression of the breast cancer. **Breast cancer research**, v. 9, R76, 2007.
- CHEN, M.X., et al. Layer-by-layer assembly of chitosan stabilized multilayered liposomes for paclitaxel delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 298–304, 2014.
- CHOLLET, P., et al. Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors in Combination with Letrozole in Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 7, p. 336-338, 2006.
- CHOU, T.C., TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.
- CODERCH, L. et al. Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 68, p.85–95. 2000
- CROSASSO, P., et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes. **Journal of Controlled Release**, v. 63, p.19–30, 2000.

Referências

- DESAI, T.R et al. A novel approach to the pulmonary delivery of liposomes in dry powder form to eliminate the deleterious effects of milling. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 482–491, 2002.
- DE SOUZA, M.C. Development of a Method to Evaluate the Release Profile of Tamoxifen from Pegylated Hybrid Micelles. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 1223-1229, 2015.
- DI GIULIO, A. G. et al. Encapsulation of ampicillin in reverse-phase evaporation liposomes: a direct evaluation by derivative spectrophotometry. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 183-188, 1991.
- ELLENS, H.; BENTZ, J.; SZOKA, F. C. **Biochemistry**, v 23, p.1532-1538, 1984.
- ELLENS, H.; BENTZ, J.; SZOKA, F. C. H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes. **Biochemistry**, v. 24, p. 3099–3106, 1985.
- ELOY, J.O., et al. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 123 p. 345–363, 2014a.
- ELOY, J.O., et al. Solid dispersion of ursolic acid in gelucire 50/13: a strategy to enhance drug release and trypanocidal activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 13, p. 1436–1445, 2012.
- ELOY, J.O., MARCHETTI, J.M. Solid dispersions containing ursolic acid in Poloxamer 407 and PEG 6000: A comparative study of fusion and solvent methods. **Powder Technology**, v. 253, p. 98-106, 2014b.
- ELOY, J.O., et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74-86, 2016a.

Referências

- ELOY, J.O., et al. Rapamycin-loaded immunoliposomes targeted with trastuzumab: development, characterization and *in vitro* evaluation in breast cancer. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, aceito para publicação. 2016b.
- EMANI, S., et al. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, p. 369-374, 2014.
- ENGEL, R.H., KAKLAMANI, V.G. HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies. **Drugs**, v. 67, p. 1329-1341, 2007.
- FALTUS, et al. Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. **Neoplasia**, v.6, p. 786-795, 2004.
- FANG, H., NAKAMURA, H., MAEDA, Y. Maeda, The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p.136–151, 2011.
- FENG, B. et al. Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging in vivo. **Biomaterials**, v. 31, p. 4139–4145, 2010.
- GABRL, R.Q.; PADWAL, R.S.; BROCKS, D.R. Determination of metformin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography using small sample volume and conventional octadecyl silane column. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 486-484, 2010.
- GERWECK, L.E., VIJAYAPPA, L., KOZIN, S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. **Molecular Cancer Therapy**, v. 5, p. 1275-1279, 2006.
- GHANBARZADEH, S. et al. Improvement of the antiproliferative effect of Rapamycin on tumor cell lines by poly (monomethylitaconate)-based pH-sensitive, plasma stable liposomes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, p. 323-330, 2014.

Referências

- GHERSI, D. et al. Taxane containing regimens for metastatic breast cancer. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 3, 2003.
- GAO, J. et al. Antibody-targeted immunoliposomes for cancer treatment. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2026-2035, 2013
- GLAVAS-DODOV, M. et al. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. **International Journal of Pharmarmaceutics**, v. 291, p. 79–86, 2005.
- HAERI, A., et al., Use of remote film loading methodology to entrap sirolimus into liposomes: preparation, characterization and in vivo efficacy for treatment of restenosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 414, p. 16– 27, 2011.
- HASENSTEIN, J.R. et al. Antitumor activity of triolimus: a novel multidrug-loaded micelle containing paclitaxel, rapamycin, and 17-AAG. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, p. 2233-2242, 2012.
- HE, Y. et al. Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling. **Cancer Letters** v. 301, p.168–176, 2011.
- HE, X. et al. Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ caprolactone)– and phospholipid-based stealth nanoparticles with enhanced therapeutic efficacy on murine breast cancer by improved intracellular drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1791–1804, 2015.
- HIRSJARVI, S., PASSIRANI, C., BENOIT, J.P. Passive and active tumour targeting with nanocarriers. **Current Drug Discovery Technology**, v. 8, p. 188-196, 2011.

Referências

- HOROWITZ, A.T.; BARENHOLZ, Y.; GABIZON, A.A. In vitro cytotoxicity of liposome-encapsulated doxorubicin: dependence on liposome composition and drug release. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1109, p. 203-209, 1992.
- HURVITZ, S.A., et al. A phase 2 study of everolimus combined with trastuzumab and paclitaxel in patients with HER2-overexpressing advanced breast cancer that progressed during prior trastuzumab and taxane treatment. **Breast Cancer Research Therapy**, v. 141, p. 437-446, 2013.
- IMMORDINO, M.L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications, existing and potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, p. 297-315, 2006.
- 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.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- ISHIDA, T. et al. Development of pH-sensitive liposomes that efficiently retain encapsulated doxorubicin (DXR) in blood. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 94-100, 2006.
- JAAFARI, A., et al. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 5340-540, 2012.
- JOHNSTON, S.R.D. The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 11, p. 70145-9, 2011.

Referências

- JORDAN, V.C., BRODIE, A.M. Development and evolution of therapies targeted to the estrogen receptor for the treatment and prevention of breast cancer. **Steroids**, v. 72, p. 7-25, 2007.
- KAJIWARA, E. et al. Long-circulating liposome encapsulated ganciclovir enhances the efficacy of HSV-TK suicide gene therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 104–110, 2007.
- KAN, P. et al. A liposomal formulation able to incorporate a high content of paclitaxel and exert promising anticancer effect. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1 – 9, 2011.
- KARANTH, H.; MURPHY, R.;S.;R. pH-sensitive liposomes – principal and application in cancer therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 469-483, 2007.
- KARATHANASIS, E. et al. Multifunctional nanocarriers for mammographic quantification of tumor dosing and prognosis of breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 29, p. 4815 – 4822, 2008.
- KEPCZYNSKI, M. et al. Which physical and structural factors of liposome carriers control their drug-loading efficiency? **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 155, p. 7–15, 2008.
- KOUDELKA, S. et al. Liposomes with high encapsulation capacity for paclitaxel: preparation, characterization and in vivo anticancer effect. **Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 2309-2319, 2010.
- KOZIARA, J.M. et al. Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 259–269, 2004.

Referências

- LAGINHA, K.; MUMBENGEGWI, D.; ALLEN, T. Liposomes targeted via two different antibodies: Assay, B-cell binding and cytotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1711, p. 25-32, 2005.
- LI, C.; WALLACE, S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, p. 886 – 898, 2008.
- LIGGINS, R.T.; HUNTER, W.L.; BURT, H.M. Solid-state characterization of paclitaxel. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p.1458-1463, 1997.
- LIU, D.; HUANG, L. Small, but not large, unilamellar liposomes composed of dioleoylphosphatidylethanolamine and oleic acid can be stabilized by human plasma. **Biochemistry**, v. 28, p. 7700-7707, 1989.
- LIU, J. et al. Controlled release of paclitaxel from a self-assembling peptide hydrogel formed in situ and antitumor study in vitro. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 2143-2153, 2011.
- LIU, Y. et al. Enhanced Therapeutic Efficacy of iRGD-Conjugated Crosslinked Multilayer Liposomes for Drug Delivery. **BioMed Research International**, ID 378380, 2013.
- LUO, T., et al. (-)-Epigallocatechin gallate sensitizes breast cancer cells to paclitaxel in a murine model of breast carcinoma. **Breast Cancer Research**, v. 12, 2010.
- MAEDA, N. et al. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted longcirculating liposome. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 41-52, 2004.
- MALLICK, S., CHOI, J.S. Liposomes: Versatile and Biocompatible Nanovesicles for Efficient Biomolecules Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p.755-765, 2014.

Referências

- MANJAPPA, A.S. et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposomes to target chemotherapeutics to tumor. **Journal of Controlled Release**, v. 150, p. 2-22, 2011.
- MARTINS, K.F. Preparation and Characterization of Paclitaxel-loaded PLDLA Microspheres, **Materials Research**, v. 17, p. 650-656, 2014.
- MARSDEN, C.G. et al. A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies. **BMC Cancer**, v. 12, 2012.
- 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 Research**, v. 46, 6387–6392, 1986.
- MERAZ, I.M., et al. Multivalent presentation of MPL by porous silicon microparticles favors T helper 1 polarization enhancing the anti-tumor efficacy of doxorubicin nanoliposomes, **PLoS One**, v. 9, 2014.
- MISHRA, G.P.; NGUYEN, D.; ALANI, A.W. Inhibitory effect of paclitaxel and rapamycin individual and dual drug-loaded polymeric micelles in the angiogenic cascade. **Molecular Pharmacology**, v.5, p. 2071-2078, 2013.
- MITA, M.M., MITA, A., ROWINSKY. Mammalian Target of Rapamycin: A New Molecular Target for Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 4, p. 126-137, 2003.
- MONDESIRE, W.H. et al. Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy induced cytotoxicity in breast cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 7031-42, 2004.
- MORTENSEN, J.H. et al. Targeted Antiepidermal Growth Factor Receptor (Cetuximab) Immunoliposomes Enhance Cellular Uptake In Vitro and Exhibit

Referências

Increased Accumulation in an Intracranial Model of Glioblastoma Multiforme. **Journal of Drug Delivery**, Article ID 209205, 2013.

NAVES, M.M.V., QUINTANILHA, M.I.G.D., INUMARU, L.E. Nutrição e prevenção de câncer: evidências, metas de Saúde Pública e recomendações individuais. **Nutrição em Pauta**, v. 16, p. 40-45, 2008.

OLIVEIRA, S., et al. Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 246–253, 2016

ORIVE, G. et al. Micro and nano drug delivery systems in cancer therapy. **Cancer therapy**, v. 3, p. 131 – 138, 2005.

PALMA, G. et al. Antitumor activity of PEGylated biodegradable nanoparticles for sustained release of docetaxel in triple-negative breast cancer, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, p.55-63, 2014.

PAN, X. et al. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via cholesterol-based membrane anchor for targeted delivery of a neutron capture therapy (NCT) agent to glioma cells. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 101-108, 2007.

PARK, J. et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. **Clinical Cancer Research** v, 8, p. 1172–1181, 2002.

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

PAWARODE, A., et al. Rapamycin overcomes multidrug resistance (MDR) mediated by P-glycoprotein (Pgp), multidrug resistance protein-1 (MRP-1), breast cancer resistance protein (BCRP) and lung resistance protein (LRP) and synergizes with substrate drugs in MDR cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 1270, 2006.

Referências

- PETRILLI, R., ELOY, J.O. et al. Targeted lipid nanoparticles for antisense oligonucleotide delivery. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, p. 847-855, 2014.
- PHOENIX, K.N., VUMBACA, F., CLAFFEI, K.P. Therapeutic Metformin/AMPK Activation Promotes the Angiogenic Phenotype in the ER α Negative MDA-MB-435 Breast Cancer Model. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 113, p. 101-111, 2009.
- PORTER, P. "Westernizing" Women's Risks? Breast Cancer in Lower-Income Countries. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 213-116, 2008.
- PULASKI, B.A., OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model, **Curr Protoc Immunol.**, 2001.
- RIBANI, M. et al. **Quimica Nova**, v. 27(5), p. 771, 2004.
- ROUF, M.A.; VURAL, I.; BILENSOY, E.; HINCAL, A.; EROL, D.D. Rapamucin-cyclodextrin complexation: improved solubility and dissolution rate. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, p. 167-175, 2011.
- ROUF, M.A., et al. Rincal, Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. **Journal of Liposome Research**, v. 19, p. 322–331, 2009.
- SAPRA, P., SHOR, B. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: Advances and challenges. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, p. 452–469, 2013
- SARAIVA, J. et al. Nanocarriers for nitric oxide delivery. **Journal of Drug Delivery**, 2011.
- SCHNEIDER, T. et al. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 117, p. 1-12, 1995.

Referências

- SCHNYDER, A. et al. Targeting of skeletal muscle in vitro using biotinylated immunoliposomes. **Biochemical Journal**, v. 377, p. 61-67, 2004.
- SHARMA, A., SHARMA, U.S. STRAUBINGER, R.M. Paclitaxel-liposomes for intracavity therapy of intraperitoneal P388 leukemia. *Cancer Letters*, v. 107, p. 265–272, 1996.
- SHAWVER, L.K., SLAMON, D., ULLRICH, D. Smart Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. **Cancer Cell**, v. 2, p. 117-123, 2002.
- SHIN, H.C., et al. A 3-in-1 Polymeric Micelle Nanocontainer for Poorly Water-Soluble Drugs. **Mol. Pharmaceutics**, v. 8, p. 1257–1265, 2011.
- SIMOES, S et al. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 947–965, 2004.
- SPUCH, C., NAVARRO, C. Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease). **Journal of Drug Delivery**, 2011.
- SONG, H. et al. Pharmacokinetic and cytotoxic studies of pegylated liposomal daunorubicin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, p. 591-598, 2006.
- STOLLERY, J.G.; VAIL, W.J. Interactions of divalent cations or basic proteins with phosphatidylethanolamine vesicles. **Biochica Biophysica Acta**, v. 471, p. 372–390, 1977.
- SUDIMACK, J.J. et al. A novel pH sensitive liposome formulation containing oleyl alcohol. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1564, p. 31-37, 2002.
- TAI, W., MAHATO, R., CHENG, K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 264-275, 2010.
- TANAKA, T. et al. Nanotechnology for breast cancer therapy. **Biomedical microdevices**, v. 11, p. 49 – 63, 2009.

Referências

- TAYLOR, K. M. G. et al. Drug entrapment and release from multilamellar and reverse-phase evaporation liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 58, p. 49-55, 1990.
- TERRY, M.B., et al. Alcohol metabolism, alcohol intake, and breast cancer risk: a sister-set analysis using the Breast Cancer Family Registry. **Breast Cancer Research Treatment**, v. 106, p. 281-288, 2007.
- TORCHILIN, V. P.; TRUBESTSKOY, V. S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.16, p.141–155, 1995.
- VANDERWEELE, D.J., et al. Akt up-regulation increases resistance to microtubule directed chemotherapeutic agents through mammalian target of rapamycin, **Molecular Cancer Therapy** v. 3 (2004) p. 1605-13, 2004.
- VELDMAN, R.J. et al. Coformulated N-octanoyl-glucosylceramide improves cellular delivery and cytotoxicity of liposomal doxorubicin. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, v. 315, p. 704-10, 2005.
- VICIER, C. et al, Clinical development of mTOR inhibitors in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, 2014.
- VISHNU, P., ROY, V. Safety and Efficacy of *nab*-Paclitaxel in the Treatment of Patients with Breast Cancer. **Breast Cancer**, v. 5, p. 53-65, 2011.
- XU, X. et al. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API:II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 543-553, 2012 a.

Referências

- XU, X. KHAN, M. A.; BURGESS, D. J. Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, p. 410-418, 2012 b.
- XU, Z. et al. In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, p. 361-368, 2005.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: **American Institute for Cancer Research**; 2007
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012.
- YANG, G. Inhibition of breast and ovarian tumor growth through multiple signaling pathways by using retrovirus-mediated small interfering RNA against Her-2/neu gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 4339-4345, 2004.
- YANG, T. et al. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: In vivo and In vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 338, p. 317-326, 2007a
- YANG, T. et al. Preparation and evaluation of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposome. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p.169–177, 2007b
- YANG, T. et al. Antitumor Effect of Paclitaxel-Loaded PEGylated Immunoliposomes Against Human Breast Cancer Cells. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 2402-2422, 2007c
- YATSCOFF, R.W. Pharmacokinetics of rapamycin, **Transplant Proc**, v. 28, p. 970-973, 1996.

Referências

YEO, B. et al. Long-term outcome of HER2 positive metastatic breast cancer patients treated with first-line trastuzumab. **The Breast**, v. 24, p. 751-757, 2015.

YOSHIZAWA, Y. et al. A novel approach to overcome multidrug resistance: utilization of P-gp mediated efflux of paclitaxel to attack neighboring vascular endothelial cells in tumors. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 62, p. 274-280, 2014.

YOSHIZAWA, Y., et al. PEG liposomalization of paclitaxel improved its in vivo disposition and anti-tumor efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 412, p. 132–141, 2011.

ZAMBITO, Y., PEDRESCHI, E., DI GOLO, G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? – A case study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 28-34, 2012.

ZEISIG, R., RÜCKERL, D., FICHTNER, I. Reduction of tamoxifen resistance in human breast carcinomas by tamoxifen-containing liposomes in vivo. **Anti-Cancer Drugs**, v. 15, p. 707-714, 2004.

ZHANG, J. A., et al. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 59, p. 177-187, 2005.

ZHENG, J., et al. Rapamycin sensitizes Akt inhibition in malignant human breast epithelial cells. **Cancer Letters**, v. 296, p. 74–87, 2010.

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=paclitaxel+rapamycin&Search=Search>

<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01304797>