

**GIOVANNA CASSONE SALATA**

**SISTEMAS BIORRESPONSIVOS PARA LIBERAÇÃO  
SUSTENTADA DE FÁRMACOS VISANDO A  
QUIMIOPREVENÇÃO DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Biagini Lopes

Versão corrigida

São Paulo – SP

2020

## RESUMO

A despeito da alta incidência do câncer de mama, há escassas estratégias farmacológicas quimiopreventivas que, em função dos graves efeitos adversos sistêmicos, implicam em baixa adesão. Retinoides são capazes de inibir o desenvolvimento tumoral por regularem o crescimento e diferenciação celular, e dentre eles, a fenretinida é considerada promissora para a prevenção de câncer de mama por acumular-se no tecido mamário. Entretanto, além dos efeitos adversos graves, sua elevada lipofilicidade resulta em baixa biodisponibilidade oral. Para contornar essas limitações e possibilitar seu uso na quimioprevenção, o presente estudo objetivou o desenvolvimento de microemulsões que, por meio da administração subcutânea e absorção de água tecidual, transformam-se em fase líquido-cristalina capaz de prolongar a liberação local do fármaco. Diversas microemulsões foram preparadas, sendo selecionadas as compostas por [fosfatidilcolina]:[monoleína:tricaprilina]-propilenoglicol nas proporções 1:1-30% e 9:1-50%. Ambas apresentaram diâmetro inferior a 230 nm, originaram fase líquido-cristalina quando adicionadas de 1% ou mais de água e prolongaram a liberação de Alexa Flúor 647 *in vivo* por mais de 30 dias, mas a microemulsão 1:1-30% causou irritação local e formação de uma cápsula fibrosa. A fenretinida foi incorporada na concentração de 1% (m/m), e, sua liberação seguiu cinética de pseudo-primeira ordem, sendo aproximadamente 30% liberado após 9 dias. O tratamento de células MCF-7 e T47D com a formulação 9:1-50% contendo fenretinida mostrou-se mais citotóxico comparado à 1:1-30%, levando à sua escolha para estudos subsequentes. Esta formulação também reduziu a migração celular em 65,2 e 75,9%, quando utilizada em concentrações equivalentes a IC<sub>5</sub> e IC<sub>15</sub> (concentrações necessárias para reduzir a viabilidade em 5 ou 15%) comparado a células não tratadas. Em modelos 3D, o tratamento com 9:1-50% na concentração equivalente a IC<sub>30</sub> reduziu a viabilidade dos esferoides em 28,8%. No modelo animal de carcinogênese induzida quimicamente, a formulação mostrou-se segura e efetiva, sendo capaz de inibir o desenvolvimento de tumores de mama. Os promissores resultados apontam para o potencial desta nova plataforma na quimioprevenção do câncer de mama.

**Palavras chave:** Câncer de Mama, Fenretinida, Liberação Sustentada, Microemulsão, Cristais Líquidos.

## ABSTRACT

Despite the high incidence of breast cancer, there are few pharmacological strategies for chemoprevention, and their serious adverse effects, result in low adherence. Retinoids are capable of inhibiting mammary tumors development due to regulation of cell growth and differentiation, and, among them, fenretinide is considered promising for breast cancer chemoprevention for its ability to accumulate in breast tissue. However, the drug presents serious adverse effects, and its high lipophilicity results in low oral bioavailability. To overcome these limitations and enable its use in chemoprevention, the present study aimed at developing bioresponsive microemulsions capable of uptaking *in situ* fluids after subcutaneous administration and transforming into a liquid crystalline phase that provides prolonged and local fenretinide release. Several microemulsions were prepared, and those composed of [phosphatidylcholine]:[monoolein:tricaprylin]-propylene glycol in the proportions 1:1-30% and 9:1-50% were selected. They presented diameters below 230 nm, originated liquid-crystalline phase when added 1% or more of water, and prolonged Alexa Fluor 647 release *in vivo* for more than 30 days; however, the microemulsion 1:1-30% caused local irritation and the formation of a fibrous capsule. Fenretinide was incorporated at a concentration of 1% (m/m), and its release followed pseudo-first order kinetics, Treatment of MCF-7 and T47D cells with the formulation 9:1-50% loaded with fenretinide was more cytotoxic compared to 1:1-30%, leading to its the selection for subsequent studies. Treatment with the fenretinide-loaded 9:1-50% formulation reduced cell migration by 65.2 and 75.9% when used in concentrations equivalent to  $IC_5$  and  $IC_{15}$  (concentrations required to reduce viability by 5 or 15%) compared to untreated cells, respectively. In 3D models, treatment with 9:1-50% at a concentration equivalent to  $IC_{30}$  reduced the viability of spheroids by 28.8% compared to the untreated control. In the animal model of chemically induced carcinogenesis, the 9:1-50% formulation was safe and effective, inhibiting the development of breast tumors. The promising results point to the potential of this formulation as new platform for chemoprevention of breast cancer.

**Key Words:** Breast Cancer, Fenretinide, Sustained Release, Microemulsion, Liquid Crystal.

## 1. INTRODUÇÃO

Neoplasias são um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, onde estima-se que 80% dos 20 milhões de novos casos esperados até 2025 ocorram (1, 2). Segundo dados fornecidos pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer), o câncer de mama é o segundo tipo de tumor mais incidente no mundo, totalizando 1.7 milhão de pessoas acometidas pela doença em 2012, sendo o de maior frequência entre as mulheres: 25,2% (2). A neoplasia mamária apresenta também a maior taxa de mortalidade, onde 12,9 a cada 100.000 casos levam os acometidos à morte (1). A maior parte deste tipo de câncer acomete as células dos ductos das mamas e por isso, o tumor mais comum denomina-se carcinoma ductal que pode ser *in situ* – se acomete as primeiras camadas de célula destes ductos – ou invasivo/infiltrante, quando invade os tecidos adjacentes (3, 4). Atualmente o carcinoma intraductal *in situ* (DCIS), que corresponde a cerca de 20-25% dos tumores de mama diagnosticados, tem tratamento representado por remoção cirúrgica seguida de radiação e tamoxifeno oral em alguns casos (5, 6). No entanto, diversos grupos vêm questionando esse padrão, considerando-o excessivo para DCIS de baixo grau, visto que seu diagnóstico e tratamento para evitar recorrências não parecem alterar a taxa de mortalidade como demonstrado recentemente em um estudo com mais de 100.000 mulheres (7, 8). Nesse contexto, pesquisas envolvendo a identificação de novos marcadores para diagnóstico de lesões de menor risco, abordagens menos agressivas para seu tratamento e novas estratégias de quimioprevenção para mulheres em risco de desenvolvimento da doença têm sido amplamente discutidas e incentivadas (4, 6, 9-11).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama apontam para (i) a idade da paciente, menarca e menopausa; (ii) histórico familiar e predisposição genética; (iii) doença mamária benigna prévia; (iv) radiação; (v) estilo de vida, incluindo dieta, peso, ingestão de álcool e fumo; (vi) densidade mamária e (vii) uso de contraceptivos orais e reposição hormonal. (12-14). Outro fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama é a baixa taxa de retinoides no plasma, já que estes são cruciais para a manutenção do sistema imune, crescimento e diferenciação celular (15). Com o desenvolvimento de novos marcadores genéticos (como mutações

BRCA) e fenotípicos (como densidade mamária), a quimioprevenção destes tumores passou a ser melhor discutida e a busca por novas estratégias, incentivada (10).

Atualmente, como medidas de prevenção, o controle dos fatores de risco, especialmente os relacionados ao estilo de vida como a obesidade e o diagnóstico precoce da doença através principalmente de técnicas de rastreamento mamográficas – mamografia, ultrassonografia, exame clínico, autoexame e screening para mulheres de alto risco – são bem aceitos (14, 16). No entanto, existem poucas estratégias farmacológicas disponíveis para a quimioprevenção e aquelas existentes têm baixa adesão, principalmente pelos graves efeitos adversos (10). Isso se contrapõe ao que ocorre com outros tipos de tumores, como o cutâneo, nos quais o conceito de prevenção através do uso de filtros solares é bem aceito pela população.

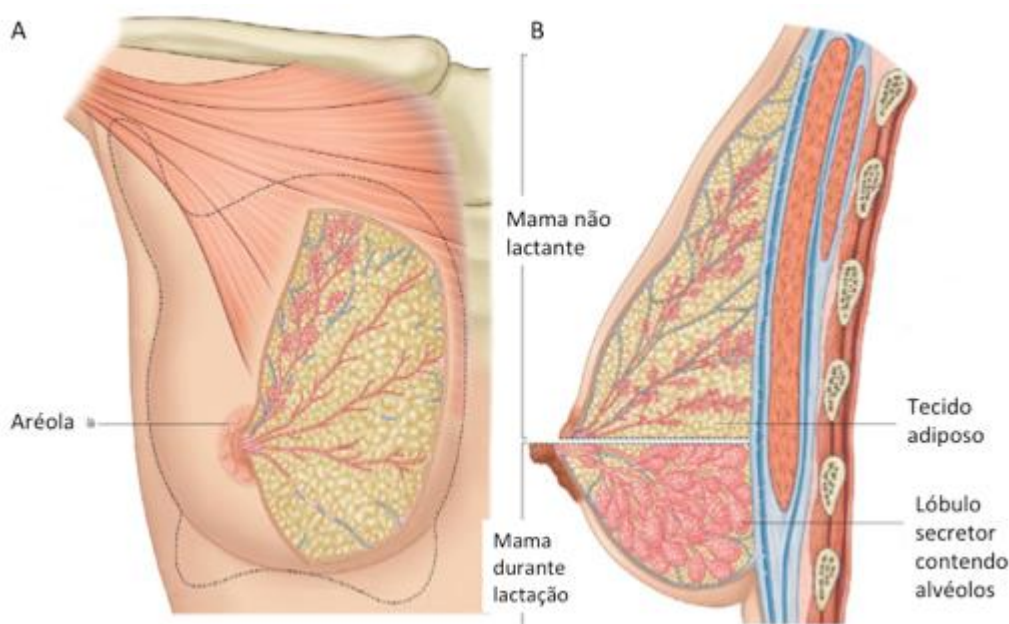
Os fármacos mais comumente utilizados na quimioprevenção do câncer de mama são os moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs) e inibidores de aromatase (IA). Embora tenham o potencial preventivo demonstrado, a adesão ao tratamento com esses fármacos é baixa em mulheres com alto risco de desenvolvimento da doença principalmente pela temeridade dos efeitos adversos sistêmicos desses fármacos, (11) que incluem fadiga, perda de cabelo, falta de apetite, mudanças de paladar e risco de outros tumores (17, 18). Nos Estados Unidos foi reportada uma drástica diminuição de mulheres dispostas a fazer uma quimioprevenção com tamoxifeno, mesmo no grupo de alto risco para a doença (19, 20). Outro estudo, feito por Roche e colaboradores, mostrou que, mesmo após sessões de aconselhamento e educação individualizados, 48% das mulheres em grupo de risco não aceitou uma quimioprevenção via oral em função de seus efeitos adversos. Dentre as que se elegeram para a terapia, 55% conseguiu terminá-la (21). Se considerarmos a mastectomia como forma de prevenção, suas consequências e impactos psicológico e físico, a adesão fica ainda mais limitada. Assim, novas estratégias farmacológicas voltadas para a prevenção localizada deste tipo de câncer poderiam vencer essas barreiras e beneficiar um grande número de mulheres, associando eficácia e segurança.

Dado a necessidade de quantidades suficientes de fármaco apenas na mama para um efeito protetor, propusemos a utilização de sistemas nanoestruturados biorresponsivos – ou seja, a partir de estímulos do ambiente, os sistemas gerarão uma

resposta – formadores de depósito subcutâneo para liberação localizada do agente quimiopreventivo fenretinida nas mamas. Considerando a inerente capacidade deste fármaco de se acumular no tecido mamário – em grande parte pelas suas características físico-químicas (22) – sua liberação local sustentada representa uma plataforma promissora para garantir eficácia enquanto reduzindo a exposição sistêmica e conseqüentemente, os efeitos adversos do fármaco.

## 1.1. Anatomia da Mama

O entendimento da anatomia da mama é fundamental para o estudo do câncer de mama, por descrever parâmetros de componentes normais e patológicos e possíveis alvos terapêuticos. Glândulas mamárias são derivações de glândulas sudoríparas, sendo um tipo especializado destas (23). A mama possui três componentes principais a serem observados anatomicamente: pele, estrutura glandular e anexos – tecido subcutâneo, vasos sanguíneos, inervação e vasos linfáticos (24).



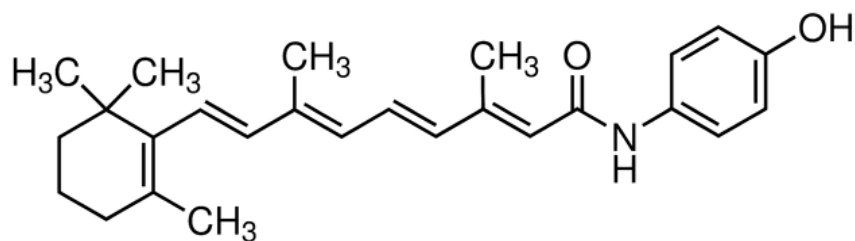
**Figura 1. Representaçaõ esquemática da mama.** Comparaçãõ entre os alvéolos da mama nãolactante e durante a lactaçaõ, tecido adiposo e areola. Imagem adaptada do livro Gray's Anatomia, 2010 [24].

O seio é recoberto por pele em sua grande maioria, com exceção dos mamilos, formados por ductos circundados por músculo liso. A pele é composta pela epiderme, camada mais superficial, cuja composição consiste em queratina e células em constante renovação provindas da camada germinativa. Esta segunda camada está associada com uma camada subcutânea composta por tecido adiposo, que pode variar de indivíduo para indivíduo (**Figura 1**) (25). Essa associação é dada de forma colunar, onde cavernas na derme são preenchidas por projeções subcutâneas, descritas por Kopans e colaboradores (26).

O câncer de mama é uma doença heterogênea tanto clinicamente quanto morfológicamente. As estratégias de prevenção atuais focam em reduzir o desenvolvimento do tumor para mulheres com alta susceptibilidade de mutação no gene BRCA1 e BRCA2, por meio de intervenção hormonal e uso de quimioterápicos que geram os efeitos adversos já citados, além de mastectomia profilática. No entanto, as estratégias disponíveis apresentam baixa adesão, o que cria a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de quimioprevenção para aumentar a adesão de mulheres ao tratamento. Para isso, propomos uma terapia subcutânea de fácil administração, de forma a evitar efeitos de primeira passagem, promover direcionamento ao alvo e aumentar a eficácia e tolerabilidade do tratamento.

## 1.2. Fenretinida e câncer de mama

A fenretinida (*N*-4-Hidroxfenilretinamida ou 4-HPR) é um análogo sintético, derivado do ácido retinoico em sua forma *all-trans* (ATRA) e foi desenvolvida nos anos de 1960, nos Estados Unidos (**Figura 2**). Retinoides são análogos sintéticos ou naturais da vitamina A, lipofílicos, (27) e estão sendo estudados como potenciais quimiopreventivos bem como agentes terapêuticos, pelo seu importante papel na regulação do crescimento e diferenciação celular (28-30). Os retinoides, por meio da dimerização de receptores de ácido retinoico (RARs), induzem resposta de transativação de genes alvo (31). Sabe-se que receptores para retinoides são expressos tanto em células normais quanto tumorais e têm papel crítico para o desenvolvimento celular (32).



A

fenretinida é

**Figura 2. Configuração molecular da fenretinida.** Sendo um derivado do ácido retinoico, a fenretinida é formada pela condensação do grupo carboxila do ácido retinoico em sua forma all-trans com o grupo anilina do 4-aminofenol.

um dos retinoides mais promissores para uso terapêutico, sendo melhor tolerada quando comparada a outros retinoides (33, 34), além de possuir capacidade de iniciar uma resposta apoptótica mesmo em células ATRA resistentes (35). Os primeiros relatos da capacidade da fenretinida de inibir o desenvolvimento de tumores induzidos por agentes químicos foram demonstrados na década de 70 (36). Outros estudos confirmaram o potencial quimioprotetor deste fármaco em modelos *in vitro* e *in vivo*. O fármaco se mostrou superior ao ATRA na inibição da carcinogênese mamária em modelos animais (35) e redução da recorrência do câncer de mama em mulheres na pré-menopausa em ensaios clínicos de fase III, enquanto exibindo menor hepatotoxicidade (37). Outra propriedade da fenretinida a torna especialmente atrativa para a quimioprevenção do câncer de mama: seu acúmulo preferencial no tecido mamário, especialmente por ser uma molécula lipofílica, cujo logP é de aproximadamente 6,31 (22) (**Tabela 1**).

**Tabela 1. Características físico-químicas da fenretinida.**

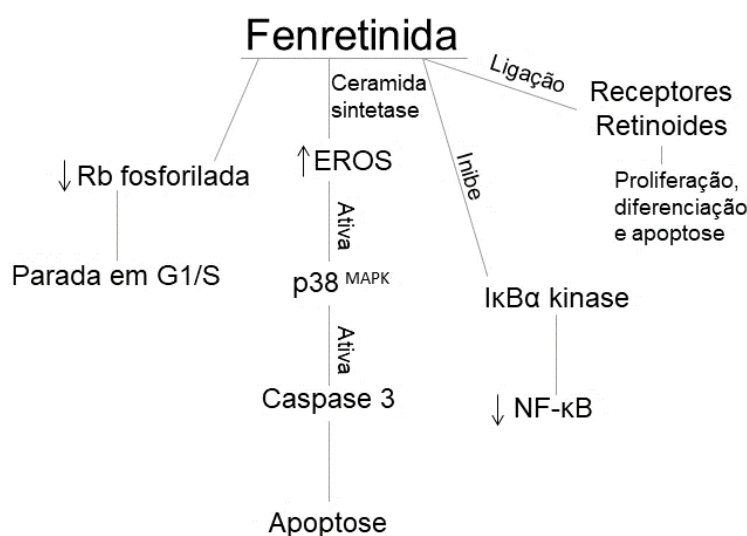
Características Físico-Químicas	Fenretinida
Fórmula Química	C <sub>26</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>2</sub>
Peso	391.54 g/mol
Metabolismo	CYP3A4
Acúmulo no fígado	0,8%
LogP	6,31
pKa	9,45
Solubilidade em Água	0.00119 mg/mL
Substrato de Pgp	Não
T <sub>1/2</sub>	25-27 horas
DL50	2.1836 mol/kg

Estudos

demonstraram que a fenretinida, cuja concentração necessária para reduzir o



crescimento populacional de células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231, por exemplo) é de 3 a 7,45  $\mu\text{M}$  (35, 38, 39), tem sua ação apoptótica resultante de múltiplos mecanismos, incluindo: (i) desregulação do ciclo celular, inibindo a fase G1 da célula tumoral (40); (ii) ligação, embora fraca, aos receptores RARs e RXRs (Receptores de Retinoides X), de forma a ser um ligante regulador de transcrição de genes específicos para esses receptores, que medeiam processos de proliferação, diferenciação e apoptose (41, 42); (iii) ativação de Caspase-3 e sua via (38); (iv) supressão da expressão de fator nuclear- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), uma família de proteínas envolvida no desenvolvimento de tumores, e (v) inibição da expressão de IKK (I $\kappa\text{B}\alpha$  kinase), proteína essencial para a ativação de NF- $\kappa\text{B}$  – que regula a expressão de genes cruciais para a proliferação e apoptose de células cancerígenas (43) –, sendo demonstrado que a importância de cada um desses mecanismos é tecido-específica (44). O fármaco também induz apoptose por elevar o nível de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (45), como por exemplo o peróxido de hidrogênio e superóxido e gerar a ativação de vias da Caspase 3 (46, 47). A **Figura 3** representa esquematicamente alguns desses mecanismos.



**Figura 3. Vias de ação da Fenretinida, esquematizando parte da via de apoptose induzida pelo fármaco.** Imagem de autoria própria.

Atualmente, a fenretinida encontra-se em fase 3 de estudos clínicos para a prevenção do câncer de mama, tendo diminuído o risco de recorrência tumoral, tanto contralateral quanto ipsilateral (na mesma mama). A dose oral proposta pelos estudos é de 200 mg por dia, durante 5 anos, sendo reportados efeitos adversos severos como

a dificuldade de adaptação no escuro, pele seca, urticária, náuseas, vômito, dermatite e conjuntivite (34, 37, 48, 49).

Muito embora a fenretinida apresente um perfil de toxicidade menos severo comparado ao ATRA, ela ainda causa vários efeitos adversos, que incluem uma adaptação ao escuro diminuída (44), pele e mucosa secas, prurido, desconforto gastrointestinal e alteração da superfície ocular (50). Alguns desses efeitos podem ser atribuídos à sua conversão em ácido retinoico *in vivo*. Além disso, sua elevada lipofilicidade resulta em baixa solubilidade em fluidos biológicos e baixa biodisponibilidade, limitando assim, sua aplicação principalmente por via oral (51). Considerando a capacidade da fenretinida de se acumular no tecido mamário e a necessidade de quantidades suficientes de fármaco apenas na mama para um efeito quimioprotetor, propusemos uma administração sustentada e localizada de fenretinida na mama através de sistemas biorresponsivos nanoestruturados formadores de depósito, de modo a favorecer ainda mais a eficácia local e redução de efeitos adversos sistêmicos.

Mais especificamente, o estudo objetiva o uso de formulações precursoras fluidas, formadoras de sistemas líquido-cristalinos nanoestruturados por meio de administração subcutânea e absorção de água tecidual, cuja obtenção economicamente viável seja capaz de sustentar a liberação local da fenretinida, eliminando efeitos adversos sistêmicos a fim de aumentar a adesão de pacientes à prevenção dos tumores de mama.

### **1.3. Liberação sustentada e sistemas de liberação líquido-cristalino**

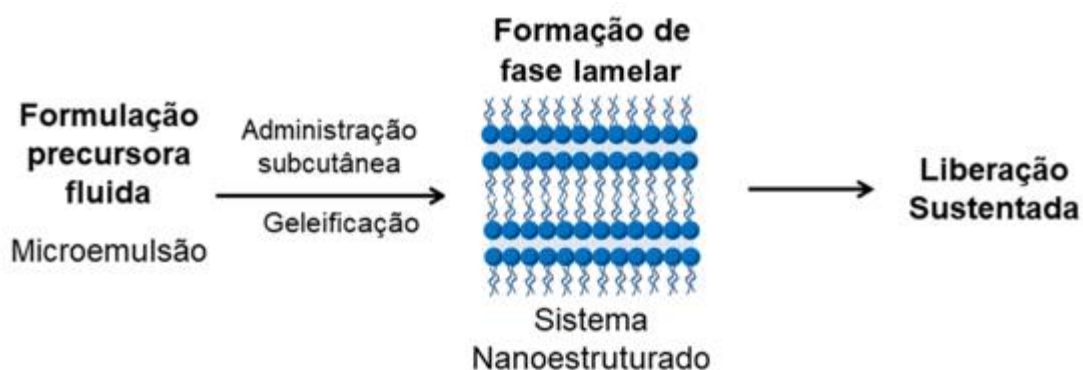
Vem crescendo o interesse por formulações e vias de administração que promovam a localização/direcionamento de fármacos ao sítio alvo e contornem seus efeitos adversos sistêmicos, o que, na maioria das vezes, está associado à baixa adesão ao tratamento (52-55). Além disso, a possibilidade de redução da frequência de dosagem é geralmente associada à melhoria da adesão aos tratamentos, principalmente crônicos.

Sistemas nanoestruturados estudados para promoção da liberação modificada de fenretinida incluem microesferas, nanopartículas, sistemas implantáveis e patches para administração por via intramuscular, tópica, oral e subcutânea (51, 56-61). Apesar de seus benefícios, os sistemas particulados e os patches oferecem algumas desvantagens, principalmente no que tange à sua obtenção, uma vez que envolve processos mais complexos em comparação a sistemas convencionais, e múltiplos passos, o que geralmente acarreta aumento de custo e exige o emprego de tecnologias específicas. Por outro lado, sistemas poliméricos implantáveis, também úteis para promoção da liberação sustentada de fármacos, geralmente requerem procedimentos cirúrgicos para sua colocação e, com frequência, para sua retirada (62, 63). Com base nesses fatos, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas que permitam liberação sustentada do fármaco por algumas semanas enquanto permitindo uma fácil administração, preferencialmente, auto-administração. Além disso, formulações capazes de oferecer múltiplas taxas de liberação frente a pequenas modificações na sua composição podem ser úteis para a personalização do tratamento de acordo com necessidades individuais, ao mesmo tempo que permitem ampliar a utilização terapêutica do fármaco. Nenhuma das formulações de liberação modificada estudadas previamente para a fenretinida permite estas possibilidades.

Propomos aqui o desenvolvimento de formulações biorresponsivas para a liberação sustentada de fenretinida na mama, como esquematizado na **Figura 4**. Mais especificamente, propomos o uso de formulações precursoras fluidas e isotrópicas (microemulsões) que, mediante administração subcutânea nas mamas e absorção de fluidos do tecido, sofram transformação *in vivo* em sistemas líquido-cristalinos nanoestruturados do tipo lamelar. A via subcutânea é vantajosa por não requerer treinamento extensivo para administração, permitindo auto-administração ou administração por familiares, de maneira similar ao que ocorre com a insulina (64).

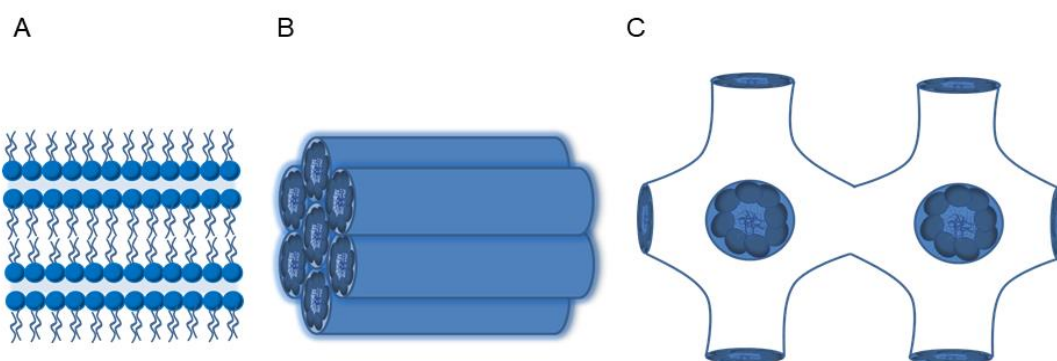
Cristais líquidos são caracterizados como estruturas intermediárias entre sólidos e líquidos, que possuem uma estrutura condensada e formam mesofases. Sistemas

termotrópicos se formam de maneira dependente da temperatura, enquanto os liotrópicos dependem da adição de solventes (65).



**Figura 4. Esquema da formulação proposta para liberação sustentada, formando fase hexagonal in situ após administração subcutânea.** Fonte: imagem criada pela autora.

Dependendo do tipo de composto estrutural que origina o sistema, geralmente um lipídio polar ou tensoativo, seu fator de empacotamento (P) – razão entre volume da cauda hidrofóbica e área da cabeça polar multiplicada pelo tamanho da cauda –, temperatura e teor de água, diversos tipos de fases podem ser formados. Os tipos mais comumente observados que se formam de acordo com a concentração de tensoativo são: lamelares, hexagonais e cúbicas (66-68). Os lipídios mais comuns que formam tais sistemas são: monoleato de glicerila (monoleína), o monoleato de glicerila, fitantriol e fosfatidilcolinas (69, 70).



**Figura 5. Representação esquemática das fases líquido-cristalinas, sendo (A) fase lamelar, (B) fase hexagonal, (C) fase cúbica na visão geométrica  $Pn3m$ .** Fonte: imagem criada pela autora.

Fases lamelares são compostas por bicamadas paralelas e planas, formando uma rede unidimensional, enquanto fases cúbicas são estruturas tridimensionais, com simetria, e possuem uma difícil visualização, conforme ilustrado na **Figura 5** (71).

A fase hexagonal consiste em cilindros de micelas resultantes da auto-agregação de um composto estrutural, organizadas como um hexágono (72, 73). Dois tipos de

fases hexagonais podem ser observados: a fase reversa, na qual a água e fármacos hidrofílicos são encapsulados no interior dos cilindros da estrutura hexagonal, e a normal, na qual a água constitui a fase externa.

As vias de administração das mesofases líquido-cristalinas são diversas; entretanto, existem alguns pré-requisitos. Considerando que esses sistemas são viscosos, sua administração parenteral pela via subcutânea, a via-foco desse projeto, não é viável. Para isso, é necessário recorrer a precursores fluidos, que possuam baixa viscosidade para ser injetado e, se transformem em fase líquido cristalina *in situ* (69, 74). Para isso, propomos as microemulsões.

Microemulsões são dispersões isotrópicas de dois líquidos não-miscíveis usados como fase oleosa e polar, em combinação com um tensoativo. O diâmetro da gotícula normalmente varia até 150 nm (75, 76). Esse sistema é capaz de compartimentalizar fármacos em seu interior, o qual possui características físico-químicas diferentes das do meio dispersante, melhorando a solubilização de fármacos (77). Isso é importante principalmente se considerada a elevada lipofilicidade da fenretinida e a dificuldade de se encontrar solventes apolares considerados seguros para aplicação farmacêutica (78). Além disso, o uso da microemulsão como formulação precursora oferece outras vantagens, entre elas podemos citar: baixo custo e variedade de componentes disponíveis para preparação, facilidade de obtenção, viscosidade ajustável, o que facilita sua administração parenteral, e estabilidade termodinâmica (79).

#### **1.4. Formulação proposta e seu design**

Aqui propomos o desenvolvimento de microemulsões fluidas, passíveis de administração subcutânea e capazes de transformarem-se em fase lamelar mediante absorção de água *in vivo*, de forma que (i) seja formado rapidamente, mediante absorção de pequenas quantidades de água, (ii) permita formação de um depósito localizado que resista por semanas, possibilitando reduzir a frequência de administração, (iii) seja formado a partir de componentes seguros e biocompatíveis, de modo a não causar irritação local e (iv) seja capaz de tratar, *in vivo*, eventuais células tumorais e também de impedir o desenvolvimento do tumor.

Com base nesses requisitos, avaliamos a monoleína e fosfatidilcolina como lipídios estruturais visando a formação do sistema (80). Quanto à microemulsão precursora, foi proposto um sistema não aquoso, no qual o propilenoglicol seja incorporado como modulador de viscosidade e fase polar em substituição à água (81). Sabendo que a água desencadeia a transição de fases das microemulsões para géis, algumas vezes em baixas concentrações, a possibilidade de obtenção de sistemas sem água permite explorar melhor variações na concentração dos componentes estruturais. Em estudos prévios, demonstramos que a liberação de fármacos a partir de sistemas líquido-cristalinos pode ser alterada de acordo com a concentração de propilenoglicol (81) o que pode ser útil considerando que formulações capazes de oferecer múltiplas taxas de liberação frente a pequenas modificações na sua composição permitem a personalização do tratamento de acordo com necessidades individuais. Além disso, devido à sua miscibilidade com água, o propilenoglicol permite a incorporação de água e transformação de fases como almejado neste trabalho (81).

Como fase oleosa, foi proposto o uso de tricaprilina já que ela é capaz de dissolver maiores quantidades de fármacos em comparação à monocaprilina por exemplo, é imiscível com propilenoglicol e também foi mostrado seu perfil de segurança por seu uso em cosméticos, e como veículo de fármacos como cetoprofeno e benzopireno em formulações farmacológicas (82).

## 2. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram tecer as conclusões especificadas abaixo:

- As formulações selecionadas (compostas por tricaprilina, fosfatidilcolina e propilenoglicol com ou sem monoleína) 1:1-20%, 1:1-30% e 9:1-50% apresentaram diâmetro compatível com microemulsão.

- As microemulsões precursoras apresentaram comportamento reológico Newtoniano, enquanto os géis apresentaram comportamento pseudo-plástico. Houve formação de fase líquido cristalina para todos os sistemas adicionando-se a partir de 1% de água livre, sendo que a cinética de intumescimento seguiu a cinética de segunda ordem para os sistemas 1:1 e Higuchi para o sistema 9:1. A liberação do fármaco se deu de forma sustentada, tendo sido liberada 30% de fenretinida em 9 dias a partir da formulação 9:1-50%.

- Embora as formulações 1:1-30% e 9:1-50% tenham sido capazes de modificar a liberação do marcador fluorescente Alexa Flúor 647, a primeira causou a formação de uma cápsula fibrosa com conteúdo de células inflamatórias no animal.

- Nos estudos de citotoxicidade em modelo 2D, a formulação 9:1-50% foi mais eficaz em reduzir a viabilidade celular das linhagens MCF-7 e T47D, e por isso foi selecionada para os estudos subsequentes. Em modelo 3D, a formulação também se mostrou eficaz ao reduzir a viabilidade de esferoides quando utilizada na concentração equivalente ao IC<sub>50</sub> do fármaco na formulação (determinada em cultura de células em monocamada).

- O sistema também mostrou seu potencial ao ser capaz de reduzir o número de tumores formados em modelo animal de carcinogênese induzida quimicamente, além de ter sido demonstrado seu potencial de depósito na mama modificando a liberação de fenretinida.

Por fim, estes resultados demonstram que esta nova formulação apresenta potencial como uma possível estratégia para a quimioprevenção e tratamento de lesões iniciais/precursoras do câncer de mama.

### 3. REFERÊNCIAS

1. Bernard WS, Christopher PW. World Cancer Report World Health Organization . 2014.
2. (INCA) INdCJAGdS. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015.
3. Nakhlis F, Morrow M. Ductal carcinoma in situ. Surg Clin North Am. 2003;83(4):821-39.
4. Shah C, Wobb J, Manyam B, Kundu N, Arthur D, Wazer D, et al. Management of Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: A Review. JAMA oncology. 2016;2(8):1083-8.
5. Sagara Y, Mallory MA, Wong S, Aydogan F, DeSantis S, Barry WT, et al. Survival Benefit of Breast Surgery for Low-Grade Ductal Carcinoma In Situ: A Population-Based Cohort Study. JAMA surgery. 2015;150(8):739-45.
6. Benson JR, Jatoi I, Toi M. Treatment of low-risk ductal carcinoma in situ: is nothing better than something? Lancet Oncol. 2016;17(10):e442-e51.
7. Fallowfield L, Francis A. Overtreatment of Low-Grade Ductal Carcinoma In Situ. JAMA oncology. 2016;2(3):382-3.
8. Narod SA, Iqbal J, Giannakeas V, Sopik V, Sun P. Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ. JAMA oncology. 2015;1(7):888-96.
9. Groen EJ, Elshof LE, Visser LL, Rutgers EJT, Winter-Warnars HAO, Lips EH, et al. Finding the balance between over- and under-treatment of ductal carcinoma in situ (DCIS). Breast. 2017;31:274-83.
10. Cuzick J, DeCensi A, Arun B, Brown PH, Castiglione M, Dunn B, et al. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. Lancet Oncol. 2011;12(5):496-503.
11. Lee O, Khan SA. Novel routes for administering chemoprevention: local transdermal therapy to the breasts. Semin Oncol. 2016;43(1):107-15.
12. Kelsey JL, Bernstein L. Epidemiology and prevention of breast cancer. Annu Rev Public Health. 1996;17:47-67.
13. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ. 2000;321(7261):624-8.
14. Ohl IC, Ohl RI, Chavaglia SR, Goldman RE. Public actions for control of breast cancer in Brazil: integrative review. Rev Bras Enferm. 2016;69(4):793-803.
15. Johansson H, Bonanni B, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Cazzaniga M, Serrano D, et al. Circulating hormones and breast cancer risk in premenopausal women: a randomized trial of low-dose tamoxifen and fenretinide. Breast Cancer Res Treat. 2013;142(3):569-78.
16. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, et al. Breast-Cancer Screening — Viewpoint of the IARC Working Group. New England Journal of Medicine. 2015;372(24):2353-8.
17. Kuchuk I, Bouganim N, Beusterien K, Grinspan J, Vandermeer L, Gertler S, et al. Preference weights for chemotherapy side effects from the perspective of women with breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2013;142(1):101-7.
18. Hsu HC, Tsai SY, Wu SL, Jeang SR, Ho MY, Liou WS, et al. Longitudinal perceptions of the side effects of chemotherapy in patients with gynecological cancer. Support Care Cancer. 2017;25(11):3457-64.



19. Martinson HA, Lyons TR, Giles ED, Borges VF, Schedin P. Developmental windows of breast cancer risk provide opportunities for targeted chemoprevention. *Exp Cell Res*. 2013.
20. Waters EA, McNeel TS, Stevens WM, Freedman AN. Use of tamoxifen and raloxifene for breast cancer chemoprevention in 2010. *Breast cancer research and treatment*. 2012;134(2):875-80.
21. Roche CA, Tang R, Coopey SB, Hughes KS. Chemoprevention acceptance and adherence in women with high-risk breast lesions. *The breast journal*. 2018.
22. Mody N, Mcilroy GD. The mechanisms of Fenretinide-mediated anti-cancer activity and prevention of obesity and type-2 diabetes. *Biochem Pharmacol*. 2014;91(3):277-86.
23. K. M, style="margin-top:0cm PTpcM, margin-right:-28.4pt, margin-bottom:., 10.0pt, margin-left:-1.0cm, et al. *The Developing Human — Clinically Oriented Embryology*. 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1998. .
24. Harness JK, C. WS. *Operative Approaches to Nipple-Sparing Mastectomy*: Springer; 2017.
25. Montagna W. *The structure and function of skin.*: Elsevier; 2012.
26. Kopans DB, Rusby JE. Cutaneous caves and subcutaneous adipose columns in the breast: radiologic-pathologic correlation. *Radiology*. 2008;249(3):779-84.
27. Mehta RG, Moon RC, Hawthorne M, Formelli F, Costa A. Distribution of fenretinide in the mammary gland of breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1991;27(2):138-41.
28. Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL. Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (Part I). *Cancer Treat Rep*. 1987;71(4):391-405.
29. Lippman SM, Kessler JF, Meyskens FL. Retinoids as preventive and therapeutic anticancer agents (Part II). *Cancer Treat Rep*. 1987;71(5):493-515.
30. Pienta KJ, Nguyen NM, Lehr JE. Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer Res*. 1993;53(2):224-6.
31. Dawson MI, Chao WR, Pine P, Jong L, Hobbs PD, Rudd CK, et al. Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor alpha with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF-7 mammary carcinoma cells. *Cancer Res*. 1995;55(19):4446-51.
32. di Masi A, Leboffe L, De Marinis E, Pagano F, Cicconi L, Rochette-Egly C, et al. Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med*. 2015;41:1-115.
33. Costa A, Malone W, Perloff M, Buranelli F, Campa T, Dossena G, et al. Tolerability of the synthetic retinoid Fenretinide (HPR). *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989;25(5):805-8.
34. Rotmensz N, De Palo G, Formelli F, Costa A, Marubini E, Campa T, et al. Long-term tolerability of fenretinide (4-HPR) in breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1991;27(9):1127-31.
35. Rehman F, Shanmugasundaram P, Schrey MP. Fenretinide stimulates redox-sensitive ceramide production in breast cancer cells: potential role in drug-induced cytotoxicity. *Br J Cancer*. 2004;91(10):1821-8.
36. Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Gander RJ, Newton DL, et al. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res*. 1979;39(4):1339-46.

37. Veronesi U, Mariani L, Decensi A, Formelli F, Camerini T, Miceli R, et al. Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer. *Ann Oncol*. 2006;17(7):1065-71.
38. Ulukaya E, Sarimahmut M, Cevatemre B, Ari F, Yerlikaya A, Dimas K. Additive enhancement of apoptosis by TRAIL and fenretinide in metastatic breast cancer cells in vitro. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(4):477-82.
39. Cevatemre B, Ari F, Sarimahmut M, Oral AY, Dere E, Kacar O, et al. Combination of fenretinide and indole-3-carbinol results in synergistic cytotoxic activity inducing apoptosis against human breast cancer cells in vitro. *Anti-cancer drugs*. 2013;24(6):577-86.
40. Hill DS, Martin S, Armstrong JL, Flockhart R, Tonison JJ, Simpson DG, et al. Combining the endoplasmic reticulum stress-inducing agents bortezomib and fenretinide as a novel therapeutic strategy for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(4):1192-8.
41. Cowan AJ, Frayo SL, Press OW, Palanca-Wessels MC, Pagel JM, Green DJ, et al. Bortezomib and fenretinide induce synergistic cytotoxicity in mantle cell lymphoma through apoptosis, cell-cycle dysregulation, and I $\kappa$ B $\alpha$  kinase downregulation. *Anticancer Drugs*. 2015;26(9):974-83.
42. Shan D, Gopal AK, Press OW. Synergistic Effects of the Fenretinide (4-HPR) and Anti-CD20 Monoclonal Antibodies on Apoptosis Induction of Malignant Human B Cells. *Clinical Cancer Research*. 2001;7(8):2490.
43. Shishodia S, Gutierrez AM, Lotan R, Aggarwal BB. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits invasion, suppresses osteoclastogenesis, and potentiates apoptosis through down-regulation of I(kappa)B(alpha) kinase and nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Res*. 2005;65(20):9555-65.
44. Cazzaniga M, Varricchio C, Montefrancesco C, Feroce I, Guerrieri-Gonzaga A. Fenretinide (4-HPR): a preventive chance for women at genetic and familial risk? *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:172897.
45. Wu JM, DiPietrantonio AM, Hsieh TC. Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death. *Apoptosis*. 2001;6(5):377-88.
46. Oridate N, Suzuki S, Higuchi M, Mitchell MF, Hong WK, Lotan R. Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(16):1191-8.
47. Hail N, Kim HJ, Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2006;11(10):1677-94.
48. Mehta RR, Hawthorne ME, Graves JM, Mehta RG. Metabolism of N-[4-hydroxyphenyl]retinamide (4-HPR) to N-[4-methoxyphenyl]retinamide (4-MPR) may serve as a biomarker for its efficacy against human breast cancer and melanoma cells. *Eur J Cancer*. 1998;34(6):902-7.
49. Vaishampayan U, Heilbrun LK, Parchment RE, Jain V, Zwiebel J, Boinpally RR, et al. Phase II trial of fenretinide in advanced renal carcinoma. *Investigational new drugs*. 2005;23(2):179-85.
50. Mittal N, Malpani S, Dyson M, Ono M, Coon JS, Kim JJ, et al. Fenretinide: a novel treatment for endometrial cancer. *PLoS One*. 2014;9(10):e110410.
51. Wischke C, Zhang Y, Mittal S, Schwendeman SP. Development of PLGA-based injectable delivery systems for hydrophobic fenretinide. *Pharm Res*. 2010;27(10):2063-74.

52. Carey MP, Burish TG. Etiology and treatment of the psychological side effects associated with cancer chemotherapy: a critical review and discussion. *Psychol Bull.* 1988;104(3):307-25.
53. Hutchinson HT, Leedham GD, Knight AM. Continuous subcutaneous analgesics and antiemetics in domiciliary terminal care. *Lancet.* 1981;2(8258):1279.
54. Pickup JC. Clinical applications of infusion systems. *J Med Eng Technol.* 1984;8(3):101-7.
55. Rehman S, Crane A, Din R, Raza SJ, Shi Y, Wilding G, et al. Understanding avoidance, refusal, and abandonment of chemotherapy before and after cystectomy for bladder cancer. *Urology.* 2013;82(6):1370-5.
56. Lin T, Zhao P, Jiang Y, Tang Y, Jin H, Pan Z, et al. Blood–Brain-Barrier-Penetrating Albumin Nanoparticles for Biomimetic Drug Delivery via Albumin-Binding Protein Pathways for Antiglioma Therapy. *ACS Nano.* 2016;10(11):9999-10012.
57. Graves RA, Ledet GA, Glotser EY, Mitchner DM, Bostanian LA, Mandal TK. Formulation and evaluation of biodegradable nanoparticles for the oral delivery of fenretinide. *Eur J Pharm Sci.* 2015;76:1-9.
58. Guo D, Zhang J, Huang Z, Jiang S, Gu N. Colloidal silver nanoparticles improve anti-leukemic drug efficacy via amplification of oxidative stress. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;126:198-203.
59. Wu X, Desai KG, Mallery SR, Holpuch AS, Phelps MP, Schwendeman SP. Mucoadhesive fenretinide patches for site-specific chemoprevention of oral cancer: enhancement of oral mucosal permeation of fenretinide by incorporation of propylene glycol and menthol. *Mol Pharm.* 2012;9(4):937-45.
60. Desai KG, Mallery SR, Holpuch AS, Schwendeman SP. Development and in vitro-in vivo evaluation of fenretinide-loaded oral mucoadhesive patches for site-specific chemoprevention of oral cancer. *Pharm Res.* 2011;28(10):2599-609.
61. Moglia D, Formelli F, Baliva G, Bono A, Accetturi M, Nava M, et al. Effects of topical treatment with fenretinide (4-HPR) and plasma vitamin A levels in patients with actinic keratoses. *Cancer Lett.* 1996;110(1-2):87-91.
62. Johnson BA. Naltrexone long-acting formulation in the treatment of alcohol dependence. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(5):741-9.
63. Hulse GK, Stalenberg V, McCallum D, Smit W, O'Neil G, Morris N, et al. Histological changes over time around the site of sustained release naltrexone-poly(DL-lactide) implants in humans. *J Control Release.* 2005;108(1):43-55.
64. Spinosa HdS, Górnica SL, Bernardi MM. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária.* 2nd ed. Rio de Janeiro, RJ (Brazil)1999.
65. S.T. H. Identification

of lyotropic liquid crystalline mesophases. *Handbook of applied surface and colloid chemistry*; 2001. p. 299-332.

66. Formariz TP, Urban MCC, Silva Júnior AAD, Gremião MPD, Oliveira AGD. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos.: *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; 2005. p. 301-13. .
67. Lopes LB, Lopes JLC, Oliveira DCR, Thomazini JA, Garcia MTJ, Fantini MCA, et al. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: Characterization and study of in vitro and in vivo delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2006;63(2):146-55.

68. Lopes LB, Ferreira DA, de Paula D, Garcia MT, Thomazini JA, Fantini MC, et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: in vitro and in vivo skin penetration of cyclosporin A. *Pharm Res.* 2006;23(6):1332-42.
69. C.M. C, R. B. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. *International Journal of Pharmaceutics*; 1998. p. 51-60
70. Warren DB, Anby MU, Hawley A, Boyd BJ. Real Time Evolution of Liquid Crystalline Nanostructure during the Digestion of Formulation Lipids Using Synchrotron Small-Angle X-ray Scattering. *Langmuir.* 2011;27(15):9528-34.
71. S. E, A. A, N. G. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. *Handbook of Microemulsion Science and Technology*1999. p. 185.
72. Muller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):343-56.
73. Drummond CJ, Fong C. Surfactant self-assembly objects as novel drug delivery vehicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 1999;4(6):449-56.
74. Chen Y, Ma P, Gui S. Cubic and hexagonal liquid crystals as drug delivery systems. *Biomed Res Int.* 2014;2014:815981.
75. Nornoo AO, Zheng H, Lopes LB, Johnson-Restrepo B, Kannan K, Reed R. Oral microemulsions of paclitaxel: in situ and pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):310-7.
76. Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics.* 2014;6(1):52-77.
77. Pepe D, McCall M, Zheng H, Lopes LB. Protein Transduction Domain-Containing Microemulsions as Cutaneous Delivery Systems for an Anticancer Agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2013;102(5):1476-87.
78. Carvalho VFM, Migotto A, Giaccone DV, de Lemos DP, Zanoni TB, Maria-Engler SS, et al. Co-encapsulation of paclitaxel and C6 ceramide in tributyrin-containing nanocarriers improve co-localization in the skin and potentiate cytotoxic effects in 2D and 3D models. *Eur J Pharm Sci.* 2017;109:131-43.
79. Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J Control Release.* 2008;127(2):137-45.
80. Amar-Yuli I, Garti N. Transitions induced by solubilized fat into reverse hexagonal mesophases. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;43(2):72-82.
81. Phelps J, Bentley MV, Lopes LB. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;87(2):391-8.
82. Carvalho VFM, Salata GC, de Matos JKR, Costa-Fernandez S, Chorilli M, Steiner AA, et al. Optimization of composition and obtainment parameters of biocompatible nanoemulsions intended for intraductal administration of piperlongumine and mammary tissue targeting. *International Journal of Pharmaceutics.* 2019:118460.
83. Carvalho VF, de Lemos DP, Vieira CS, Migotto A, Lopes LB. Potential of Non-aqueous Microemulsions to Improve the Delivery of Lipophilic Drugs to the Skin. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(5):1739-49.

84. Moghimipour E, Salimi A, Eftekhari S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(1):63-71.
85. HYDE ST. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. *Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry* 2001.
86. Pepe D, Carvalho VF, McCall M, de Lemos DP, Lopes LB. Transportan in nanocarriers improves skin localization and antitumor activity of paclitaxel. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:2009-19.
87. Lampis S. Monoolein-based cubic liquid crystals: specific interactions, evolutions and applications. 2011.
88. Brinon L, Geiger S, Alard V, Doucet J, Tranchant JF, Couarraze G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. *J Control Release.* 1999;60(1):67-76.
89. Norling T, Lading P, Engström S, Larsson K, Krog N, Nissen SS. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and triglycerides for use in the treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1992;19(9 Pt 2):687-92.
90. Allam AN, Komeil IA, Fouda MA, Abdallah OY. Preparation, characterization and in vivo evaluation of curcumin self-nano phospholipid dispersion as an approach to enhance oral bioavailability. *Int J Pharm.* 2015;489(1-2):117-23.
91. Wood JH. *Reologia farmacêutica*. 3rd ed. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Philadelphia: Lea & Febiger.; 1986. p. 210-53.
92. SCHRAMM G. *A practical approach to rheology and rheometry*. . 3rd ed: Karlsruhe: Haake; 2002.
93. Fong WK, Hanley T, Boyd BJ. Stimuli responsive liquid crystals provide 'on-demand' drug delivery in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2009;135(3):218-26.
94. Schott H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1992;81(5):467-70.
95. Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, et al. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol.* 2010;159(7):1463-74.
96. Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel. *J Pharm Sci.* 2011;100(4):1444-55.
97. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
98. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001;294(5547):1708-12.
99. Elliott NT, Yuan F. A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):59-74.
100. do Amaral JB, Urabayashi MS, Machado-Santelli GM. Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. *Cell Biol Int.* 2010;34(3):267-74.
101. do Amaral JB, Rezende-Teixeira P, Freitas VM, Machado-Santelli GM. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011;17(11):1097-107.

102. Koenig BW, Gawrisch K. Specific volumes of unsaturated phosphatidylcholines in the liquid crystalline lamellar phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2005;1715(1):65-70.
103. Papahadjopoulos D, Watkins JC. Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1967;135(4):639-52.
104. Papahadjopoulos D. Surface properties of acidic phospholipids: Interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni- and bi-valent metal ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1968;163(2):240-54.
105. Alfons K, Engstrom S. Drug compatibility with the sponge phases formed in monoolein, water, and propylene glycol or poly(ethylene glycol)1999. 1527-30 p.
106. Ivanova R, Lindman B, Alexandridis P. Effect of Glycols on the Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Water. 1. Phase Diagrams and Structure Identification. *Langmuir*. 2000;16(8):3660-75.
107. Siddig MA, Radiman S, Jan LS, Muniandy SV. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucopone (APG) surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006;276(1-3):15-21.
108. Alexandridis P, Olsson U, Lindman B. A record nine different phases (four cubic, two hexagonal, and one lamellar lyotropic liquid crystalline and two micellar solutions) in a ternary isothermal system of an amphiphilic block copolymer and selective solvents (water and oil). *Langmuir*. 1998;14(10):2627-38.
109. Dante MdCL, Borgheti-Cardoso LN, de Abreu Fantini MC, Praça FSG, Medina WSG, Pierre MBR, et al. Liquid crystalline systems based on glyceryl monooleate and penetration enhancers for skin delivery of celecoxib: characterization, in vitro drug release, and in vivo studies. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2018;107(3):870-8.
110. Chang C-M, Bodmeier R. Low viscosity monoglyceride-based drug delivery systems transforming into a highly viscous cubic phase. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;173(1):51-60.
111. Engström S, Wadsten-Hindrichsen P, Hernius B. Cubic, Sponge, and Lamellar Phases in the Glyceryl Monooleyl Ether–Propylene Glycol–Water System. *Langmuir*. 2007;23(20):10020-5.
112. Hosmer J, Reed R, Bentley MV, Nornoo A, Lopes LB. Microemulsions containing medium-chain glycerides as transdermal delivery systems for hydrophilic and hydrophobic drugs. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(2):589-96.
113. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British journal of cancer*. 2010;102(11):1555.
114. European Medicines Agency CfHMP. Propylene glycol used as an excipient. 2013.
115. Godoy CA, Valiente M, Pons R, Montalvo G. Effect of fatty acids on self-assembly of soybean lecithin systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;131:21-8.
116. Hosmer JM, Steiner AA, Lopes LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of paclitaxel: impact of the monoglyceride. *Pharmaceutical research*. 2013;30(3):694-706.

117. Kumar A, Kunieda H, Vázquez C, López-Quintela MA. Studies of Domain Size of Hexagonal Liquid Crystals in C12EO8/Water/Alcohol Systems. *Langmuir*. 2001;17(23):7245-50.
118. Ungár T, Gubicza J, Ribárik G, Borbély A. Crystallite size distribution and dislocation structure determined by diffraction profile analysis: principles and practical application to cubic and hexagonal crystals. *Journal of Applied Crystallography*. 2001;34(3):298-310.
119. Chhabra RP. Non-Newtonian fluids: an introduction. *Rheology of complex fluids*: Springer; 2010. p. 3-34.
120. Calixto GMF, Duque C, Aida KL, Dos Santos VR, Massunari L, Chorilli M. Development and characterization of p1025-loaded bioadhesive liquid-crystalline system for the prevention of *Streptococcus mutans* biofilms. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:31-41.
121. *Dynamic Viscosity of common Liquids* . [online] [Internet]. 2008. Available from: Available at: [https://www.engineeringtoolbox.com/absolute-viscosity-liquids-d\\_1259.html](https://www.engineeringtoolbox.com/absolute-viscosity-liquids-d_1259.html) [Accessed 21 Feb 2020].
122. Glycerol Monooleate [online] [Internet]. Available from: Available at <https://shop.inkemiagreenchemicals.com/products/glycerol-monooleate>. Access at Feb 21 2020.
123. Cremonez CP, Bentley MVLB, Lara MG. Caracterização do intumescimento de sistemas líquido-cristalinos de fase lamelar de monoleína e água contendo polihexametilenobiguanida. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2014;34(4):545-53.
124. Chang C-M, Bodmeier R. Swelling of and drug release from monoglyceride-based drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1997;86(6):747-52.
125. Rizwan SB, Hanley T, Boyd BJ, Rades T, Hook S. Liquid Crystalline Systems of Phytantriol and Glyceryl Monooleate Containing a Hydrophilic Protein: Characterisation, Swelling and Release Kinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(11):4191-204.
126. Lara MG, Bentley MVLB, Collett JH. In vitro drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;293(1):241-50.
127. Dong YD, Larson I, Hanley T, Boyd BJ. Bulk and dispersed aqueous phase behavior of phytantriol: effect of vitamin E acetate and F127 polymer on liquid crystal nanostructure. *Langmuir*. 2006;22(23):9512-8.
128. Hosmer JM, Shin SH, Nornoo A, Zheng H, Lopes LB. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(4):1444-55.
129. Boyd BJ, Whittaker DV, Khoo SM, Davey G. Lyotropic liquid crystalline phases formed from glycerate surfactants as sustained release drug delivery systems. *Int J Pharm*. 2006;309(1-2):218-26.
130. Iwata T, Kobayashi S, Tabata K, Yonezawa N, Doi Y. Crystal Structure, Thermal Behavior and Enzymatic Degradation of Poly (tetramethylene adipate) Solution-Grown Chain-Folded Lamellar Crystals. *Macromolecular bioscience*. 2004;4(3):296-307.
131. Chang C-M, Bodmeier R. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 1997;46(3):215-22.

132. Patel N, Lalwani D, Gollmer S, Injeti E, Sari Y, Nesamony J. Development and evaluation of a calcium alginate based oral ceftriaxone sodium formulation. *Progress in Biomaterials*. 2016;5(2):117-33.
133. Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1963;52(12):1145-9.
134. Costa PJCd. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002;38:141-53.
135. Santos RAD. Desenvolvimento de microemulsões e sua transformação in situ em géis de fase líquido-cristalina como plataforma para liberação sustentada de fármacos e seu uso no tratamento do alcoolismo.
136. Hosseini-Yeganeh M, McLachlan AJ. Physiologically based pharmacokinetic model for terbinafine in rats and humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(7):2219-28.
137. Faergemann J, Zehender H, Millerioux L. Levels of terbinafine in plasma, stratum corneum, dermis-epidermis (without stratum corneum), sebum, hair and nails during and after 250 mg terbinafine orally once daily for 7 and 14 days. *Clin Exp Dermatol*. 1994;19(2):121-6.
138. Petterino C, Argentino-Storino A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2006;57(3):213-9.
139. Ouédraogo M, Sanou M, Ramde N, Goumbri O, Somé T, Semdé R, et al. In vivo Biocompatibility and Toxicity Assessment of a Gentamicin-Loaded Monoolein Gel Intended to Treat Chronic Osteomyelitis 2008. 386-93 p.
140. Pawar AY, Erande KB, Sonawane DD, Asawale VR, Hatak YS, Derle DV. Compressed glyceryl monostearate based biodegradable implant of Gentamicin using melt granulation technique: In vitro evaluation & biocompatibility in animals. *Drug Invention Today*. 2013;5(1):39-49.
141. Simeone AM, Tari AM. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004;61(12):1475-84.
142. Zhang L, Huang D, Shao D, Liu H, Zhou Q, Gui S, et al. Fenretinide inhibits the proliferation and migration of human liver cancer HepG2 cells by downregulating the activation of myosin light chain kinase through the p38MAPK signaling pathway. *Oncol Rep*. 2018;40(1):518-26.
143. Huang C, Li Y, Tu Y, Freter CE. Breast Cancer and Lipid Metabolism. In: Wang X, Wu D, Shen H, editors. *Lipidomics in Health & Disease: Methods & Application*. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 113-35.
144. Zampieri L, Bianchi P, Ruff P, Arbuthnot P. Differential modulation by estradiol of P-glycoprotein drug resistance protein expression in cultured MCF7 and T47D breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2002;22(4):2253-9.
145. Herbert B-S, Sanders BG, Kline K. N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide activation of transforming growth factor- $\beta$  and induction of apoptosis in human breast cancer cells. *Nutrition and cancer*. 1999;34(2):121-32.
146. Ulukaya E, Kurt A, Wood EJ. 4-(N-hydroxyphenyl) retinamide can selectively induce apoptosis in human epidermoid carcinoma cells but not in normal dermal fibroblasts. *Cancer investigation*. 2001;19(2):145-54.
147. Kang H, Lee M, Choi Kc, Shin DM, Ko J, Jang SW. N-(4-hydroxyphenyl) retinamide inhibits breast cancer cell invasion through suppressing NF- $\kappa$ B



activation and inhibiting matrix metalloproteinase-9 expression. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(9):2845-55.

148. Helbig G, Christopherson KW, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, et al. NF- $\kappa$  B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *Journal of biological chemistry*. 2003;278(24):21631-8.

149. Benelli R, Monteghirfo S, Venè R, Tosetti F, Ferrari N. The chemopreventive retinoid 4HPR impairs prostate cancer cell migration and invasion by interfering with FAK/AKT/GSK3 $\beta$  pathway and  $\beta$ -catenin stability. *Molecular cancer*. 2010;9(1):142.

150. Ruvolo VR, Karanjeet KB, Schuster TF, Brown R, Deng Y, Hinchcliffe E, et al. Role for PKC *Journal of signal transduction*. 2010;2010.

151. Singletary E, Lieberman R, Atkinson N, Sneige N, Sahin A, Tolley S, et al. Novel translational model for breast cancer chemoprevention study: accrual to a presurgical intervention with tamoxifen and N-[4-hydroxyphenyl] retinamide. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2000;9(10):1087-90.

152. Singletary SE, Atkinson EN, Hoque A, Sneige N, Sahin AA, Fritsche HA, et al. Phase II clinical trial of N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide and tamoxifen administration before definitive surgery for breast neoplasia. *Clinical cancer research*. 2002;8(9):2835-42.

153. Pavone ME, Malpani SS, Dyson M, Kim JJ, Bulun SE. Fenretinide: a potential treatment for endometriosis. *Reproductive Sciences*. 2016;23(9):1139-47.

154. Di Paolo D, Pastorino F, Zuccari G, Caffa I, Loi M, Marimpietri D, et al. Enhanced anti-tumor and anti-angiogenic efficacy of a novel liposomal fenretinide on human neuroblastoma. *Journal of controlled release*. 2013;170(3):445-51.

155. Kuefer R, Genze F, Zugmaier W, Hautmann RE, Rinnab L, Gschwend JE, et al. Antagonistic effects of sodium butyrate and N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide on prostate cancer. *Neoplasia (New York, NY)*. 2007;9(3):246.

156. Ide Y, Waki M, Hayasaka T, Nishio T, Morita Y, Tanaka H, et al. Human breast cancer tissues contain abundant phosphatidylcholine (36: 1) with high stearoyl-CoA desaturase-1 expression. *PloS one*. 2013;8(4):e61204.

157. Kim IC, Lee JH, Bang G, Choi SH, Kim YH, Kim KP, et al. Lipid profiles for HER2-positive breast cancer. *Anticancer research*. 2013;33(6):2467-72.

158. Zollner TM, Podda M, Pien C, Elliott PJ, Kaufmann R, Boehncke W-H. Proteasome inhibition reduces superantigen-mediated T cell activation and the severity of psoriasis in a SCID-hu model. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):671-9.

159. Wong EYH, Herbert J. Roles of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the regulation of progenitor proliferation in the adult hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 2005;22(4):785-92.

160. Borges CS, Lopes-Costa PV, Costa-Silva DR, Lopes-Dias SF, Nazário AC, Alencar AP. Ki-67 antigen expression in the mammary epithelium of female rats in persistent estrus treated with raloxifene. *European journal of gynaecological oncology*. 2015;36(6):694-7.

161. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*. 2011;21(12):745-54.

162. Lee J, Lilly GD, Doty RC, Podsiadlo P, Kotov NA. In vitro Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture. *Small*. 2009;5(10):1213-21.

163. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*. 2015;230(1):16-26.
164. Baquet ZC, Williams D, Brody J, Smeyne RJ. A comparison of model-based (2D) and design-based (3D) stereological methods for estimating cell number in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of the C57BL/6J mouse. *Neuroscience*. 2009;161(4):1082-90.
165. Decaestecker C, Debeir O, Van Ham P, Kiss R. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Medicinal research reviews*. 2007;27(2):149-76.
166. Wood GW, Neff JE, Stephens R. Relationship between monocytosis and T-lymphocyte function in human cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1979;63(3):587-92.
167. Otte A, Baez-Santos YM, Mun EA, Soh BK, Lee YN, Park K. The in vivo transformation and pharmacokinetic properties of a liquid crystalline drug delivery system. *Int J Pharm*. 2017;532(1):345-51.
168. Formelli F, Clerici M, Campa T, Di Mauro MG, Magni A, Mascotti G, et al. Five-year administration of fenretinide: pharmacokinetics and effects on plasma retinol concentrations. *Journal of Clinical Oncology*. 1993;11(10):2036-42.
169. Bonanni B, Lazzeroni M, Veronesi U. Synthetic retinoid fenretinide in breast cancer chemoprevention. *Expert review of anticancer therapy*. 2007;7(4):423-32.
170. Chiesa F, Tradati N, Marazza M, Rossi N, Boracchi P, Mariani L, et al. Prevention of local relapses and new localisations of oral leukoplakias with the synthetic retinoid fenretinide (4-HPR). Preliminary results. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*. 1992;28(2):97-102.
171. Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, Grubbs CJ, Gander RJ, Newton DL, et al. N-(4-Hydroxyphenyl) retinamide, a new retinoid for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer research*. 1979;39(4):1339-46.
172. Moon RC, Pritchard JF, Mehta RG, Nomides CT, Thomas CF, Dinger NM. Suppression of rat mammary cancer development by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) following surgical removal of first palpable tumor. *Carcinogenesis*. 1989;10(9):1645-9.