

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E**  
**NANOBIOTECNOLOGIA**



**ANA LYGIA DOS SANTOS CÂMARA**

**NANOEMULSÃO CONTENDO DOXORRUBICINA**  
**pH-SENSÍVEL: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E**  
**AValiação ANTITUMORAL**

**BRASÍLIA**

**2017**

**ANA LYGIA DOS SANTOS CÂMARA**

**NANOEMULSÃO CONTENDO DOXORRUBICINA  
pH-SENSÍVEL: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO ANTITUMORAL**

Tese apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia pela Universidade de Brasília.

**Orientador: Prof. Dr. João Paulo Figueiró Longo**

**BRASÍLIA**

**2017**

ANA LYGIA DOS SANTOS CÂMARA

**NANOEMULSÃO CONTENDO DOXORRUBICINA  
pH-SENSÍVEL: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E  
AVALIAÇÃO ANTITUMORAL**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

28/07/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. João Paulo Figueró Longo

(Presidente)

Profa. Dra. Graziella Anselmo Joanitti

(Membro titular)

Profa. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos

(Membro titular)

Dra. Cíntia Caetano Bonatto

(Membro titular)

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

(Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus por não me deixar desistir nos momentos mais difíceis desse trabalho, por permitir que eu tivesse tantas experiências incríveis durante essa jornada, por ter permitido e me confortado durante o doutorado sanduíche e por sempre permitir que eu chegue mais alto;*

*Aos meus pais, Luiz e Maria pela constante dedicação e auxílio nas minhas escolhas profissionais e pessoais;*

*As minhas irmãs por estarem sempre presentes em qualquer momento da minha vida, mesmo que distantes;*

*A minha avó que sonha em me ver doutora, ao meu tio Jailson que sabe o quanto representa uma titulação e os demais familiares pelo amor infinito;*

*Ao professor Ricardo, primeiramente pela oportunidade e por me aceitar em seu laboratório para fazer o doutorado, pelo carinho constante e por todos os ensinamentos imensuráveis;*

*A meu orientador professor João Paulo por sempre ter sido muito mais que um orientador, sempre um bom amigo, disposto a me aturar, pelas conversas, pelos conselhos, pelas arengas, pelo empenho na realização do meu projeto, pelo doutorado sanduíche, pelos ensinamentos, pelas milhares de vezes que mandou eu ler o The Cell porque tinha 100 reais dentro, pelas outras milhares de vezes que me incentivou tentando me desafiar questionando se eu conseguiria terminar esse doutorado, pelas vezes que se preocupou com minha saúde física e mental, pela compreensão nesse último ano de doutorado e por toda amizade compartilhada nesses últimos 4 anos, nunca poderei agradecer o crescimento profissional que essa experiência me trouxe pra vida;*

*Aos nanocoleguinhas Laise, Raphael, Mateus e Henrique que foram sempre o meu chão nessa dura jornada chamada doutorado. Obrigada por estarem sempre presentes nos melhores momentos desses 4 anos, pelas madrugadas de experimentos, pelas risadas intermináveis de quando nos juntamos, pelas sentadas no Campinense pra reclamar de como tudo tava errado, pelas conversas no whatsapp que sempre começam com o “pra que eu fui fazer doutorado” ou “grande coisa ser doutor kkkkkk”, por me abrigarem, por me aguentarem, aguentarem as minhas lamentações nesse último ano (que bateram todos os recordes), por serem o que são na minha vida. Eu nunca poderei agradecer o suficiente!*

## Agradecimentos

*A minha eterna estagiária, Camila Cardador, por ter sido fundamental na realização dos experimentos, pelo constante auxílio e dedicação, por ter sido muitas vezes minhas mãos e meu cérebro, por ter sido a melhor pessoa que eu poderia escolher pra trabalhar lado a lado, por ser minha amiga, minha aluna, minha professora, minha pupila, meu orgulho, minha protegida, minha sócia na brabeza (como diziam), por mesmo no mestrado continuar me ajudando em tudo que preciso, por me aconselhar, escutar minha lamentações, por ser esse anjo que apareceu na minha vida. Nada do que tem nessa tese seria possível sem você;*

*A minha amiga Dra. Jaqueline Rodrigues que me aceitou primeiramente na UNB para 3 meses e teve que me aguentar por quase 5 anos. Muito obrigada pela PACIÊNCIA, ensinamentos e conselhos. Serei eternamente grata por todo esse aprendizado;*

*A Rayane por ser sempre, desde o início, minha amiga, parceira, conselheira, minha calma, me ceder um espaço no seu quarto, me ensinar, me ajudar em experimentos, me ajudar com protocolos, me ajudar na organização impossível daquele laboratório e por ai vai. Você foi muito especial pra mim nessa jornada!*

*Aos que integrantes Laboratório de Nanobiotecnologia e que por anos representaram uma grande família para mim. Os meus amigos que estiveram comigo ou de passagem durante os quatro últimos anos tantos nos momentos felizes quanto durante as dificuldades: Karen, Polly, Paulinha, Lud, Vic, Mayarinha, Ana Paula, Sebastian, Fred, Sarah, Janes, Luiza, Debora, Lud;*

*A professor Marcelo Calderón da Freie Universität Berlin e ao seu grupo de pesquisa por terem me recebido em seu laboratório, pelos ensinamentos, pelos momentos de descontração, pelos cafés no meio da tarde, almoço coletivo e especialmente ao Gregor por toda orientação durante os 7 meses que estive naquela laboratório;*

*A melhor funcionária da vida, Dona Zélia, por todo esforço e dedicação para que esse laboratório funcione da melhor forma possível, pelo empenho em conseguir tudo que eu pedia, pelas conversas, pela companhia durante o almoço, por ser a pessoa mais centrada daquele departamento;*

*Aos membros dos laboratórios externos como o de microscopia, genética toxicológica (Gtox) pelo auxílio e disponibilidade de equipamentos para realização dos meus experimentos;*

## *Agradecimentos*

*Aos amigos da igreja e pessoas que intercederam pela realização dessa tese;*

*A minhas amigas do jiu jitsu que foram parceiras essenciais pra que eu pudesse descansar a mente durante a escrita da tese e as amigas mais próximas, Yas, Ju e Quel, que viverem todos os momentos comigo sempre me acalmando e me tranquilizando. Amo vocês!*

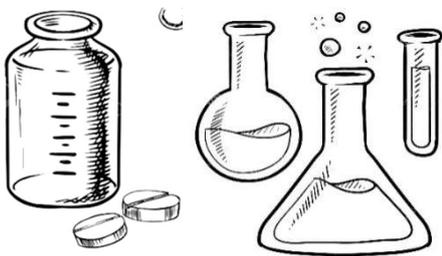
*Aos amigos fora da academia que sempre me deram todo apoio para realização dos meus sonhos, mesmos que tivesse que viver distante;*

*A minhas primas e especialmente a minha querida prima Raissa por nunca ter permitido que eu sentisse saudades me visitando todo mês em Brasília hahahaha Por todo amor e torcida pra esse feito;*

*A CAPES pelo apoio financeiro, através da bolsa de estudos, durante a elaboração desse trabalho e ao PDSE pelo financiamento do meu doutorado sanduíche;*

*Ao INCT pelo financiamento da pesquisa;*

*Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse projeto, a amizade, paciência, momentos de incentivo e amor dedicado a mim. Muito obrigada, vocês foram essenciais!*



*“Se existe uma forma de  
fazer melhor, descubra-a.”*

Thomas Edison

## RESUMO

O cloridrato de doxorubicina (DOX) é um antibiótico antineoplásico citotóxico largamente utilizado no tratamento de diversas neoplasias, incluindo tumores sólidos. Entretanto, a alta cardiotoxicidade irreversível causada limita o sucesso do tratamento, levando a um baixo índice terapêutico. Além disso, a resistência a quimioterápicos é responsável pelo insatisfatório índice terapêutico em aproximadamente 90% dos pacientes que possuem metástases. Sendo a entrega de fármacos no tecido tumoral um dos objetivos da nanotecnologia e perante a necessidade de desenvolver terapias mais eficazes, novos estudos propõem a latenciação de fármacos como uma promissora modalidade terapêutica. Os objetivos gerais do presente trabalho foram: 1) obter e caracterizar nanoemulsões contendo DOX pH-sensível; 2) avaliar a atividade anticâncer *in vitro* e *in vivo*, e 3) avaliar o perfil de biodistribuição do nanossistema obtido. A formulação obtida consistiu de um novo sistema (NE C16-DOX), em que a nanoemulsão encapsulou a DOX conjugada a um ligante pH-sensível, inativando sua ação farmacológica fora do pH baixo. A NE C16-DOX apresentou-se responsiva a pH, diâmetro hidrodinâmico de  $23,72 \pm 1,28$  nm, índice de polidispersão 0,082 e potencial zeta de  $+4,49 \pm 0,26$ , sendo compatível para administração parenteral. Nos teste *in vitro*, foram utilizadas as células de adenocarcinoma mamário murino (4T1), de fibroblasto murino como célula não tumoral (NIH-3T3), de carcinoma cervical (HeLa) e células de carcinoma cervical resistentes a DOX (KB-V1). A NE C16-DOX reduziu significativamente a viabilidade das células tumorais, inclusive das células resistentes. Os testes de atividade hemolítica comprovaram a segurança da NE não induzindo hemólise eritrocitária quando testado sem e com o pró-fármaco. Os ensaios de interiorização mostraram que a NE C16-DOX é mais interiorizada do que a DOX livre em células 4T1. Os ensaios de citometria de fluxo mostraram que a NE C16-DOX induz morte celular por apoptose. Na avaliação de mecanismo de endocitose não houve redução da interiorização da DOX com nenhum dos bloqueadores de endocitose testados. Na microscopia, os resultados obtidos mostraram mudanças nos perfis de distribuição intracelular de DOX entre o fármaco livre e a NE. A análise de perfil de biodistribuição da NE C16-DOX mostrou maior acumulação no tecido tumoral em relação ao fármaco livre. Os resultados mostram a NE C16-DOX como um promissor nanossistema para o tratamento de tumores sólidos, permitindo a translação para a aplicação clínica.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão. pH-sensível. Doxorubicina. Câncer de mama. Resistência.

## ABSTRACT

Doxorubicin hydrochloride (DOX) is a cytotoxic antineoplastic antibiotic widely used in the treatment of various neoplasms, including solid tumors. However, the high irreversible cardiotoxicity caused limits the success of the treatment, leading to a low therapeutic index. In addition, resistance to chemotherapy is responsible for the unsatisfactory therapeutic index in approximately 90% of patients who have metastases. As the delivery of drugs in the tumor tissue is one of the objectives of nanotechnology and in view of the need to develop more effective therapies, new studies propose the latency of drugs as a promising therapeutic modality. The general objectives of this work were: 1) to obtain and characterize nanoemulsions containing DOX pH-sensitive; 2) to evaluate the anticancer activity *in vitro* and *in vivo*, and 3) to evaluate the biodistribution profile of the obtained nanosystems. The formulation obtained consisted of a new system (NE C16-DOX), in which the nanoemulsion encapsulated DOX conjugated to a pH-sensitive binder, inactivating its pharmacological action out of the low pH. The NE C16-DOX was responsive to pH, hydrodynamic diameter of  $23.72 \pm 1.28$  nm, polydispersity index 0.082 and zeta potential of  $+4.49 \pm 0.26$  and compatible for parenteral administration. Murine adenocarcinoma cells (4T1), murine fibroblast as non-tumor cell (NIH-3T3), cervical carcinoma (HeLa) and DOX (KB-V1) resistant cervical carcinoma cells were used in the *in vitro* tests. NE C16-DOX significantly reduced the viability of tumor cells, including resistant cells. Hemolytic activity tests have shown the safety of NE not inducing erythrocyte hemolysis when tested with and without the prodrug. Internalization assays showed that NE C16-DOX is more internalized than free DOX in 4T1 cells. Flow cytometry assays showed that C16-DOX NE might induces cell death by apoptosis. In the evaluation of endocytosis mechanism there was no reduction of DOX internalization with any of the endocytosis blockers tested. In microscopy, the results obtained showed changes in the profiles of intracellular distribution of DOX between free drug and NE. The biodistribution profile analysis of NE C16-DOX showed greater accumulation in the tumor tissue in relation to the free drug. The results show the NE C16-DOX as a promising nanosystem for the treatment of solid tumors, allowing translation for clinical application.

**Keywords:** Nanoemulsion. pH-sensitive. Doxorubicin. Breast cancer. Resistance.

## LISTA DE LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação gráfica dos dados em porcentagem fornecidos pela OMS das dez principais causas de morte no mundo no ano de 2012. 1
- Figura 2:** Fases do processo de carcinogênese. No estágio de iniciação as células sofrem a ação dos agentes carcinogênicos. Na promoção, agentes não mutagênicos promovem a expansão celular das células previamente alteradas geneticamente. O estágio de progressão se caracteriza pela proliferação descontrolada e irreversível das células. 2
- Figura 3:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma\*. 3
- Figura 4:** Estrutura química da doxorubicina. 6
- Figura 5:** Principais mecanismos de resistências a quimioterápicos: redução do influxo do fármaco; aumento de efluxo do fármaco; Inativação do fármaco; Alterações no sítio alvo do fármaco; Mudanças na resposta adaptativa e apoptose disfuncional. 8
- Figura 6:** Diagrama esquemático de um sistema de nanoemulsão óleo em água na presença de um tensoativo produzindo gotículas estáveis. Em destaque, o núcleo de óleo hidrofóbico estabilizado por cadeia de tensoativo anfifílico. 11
- Figura 7:** Representação esquemática do conceito de pró-fármaco. O pró-fármaco ultrapassa a barreira biológica na forma inativa, sofre biotransformação química ou enzimática ficando livre para ter ação farmacológica antes ou após alcançar o local de ação (adaptado de Chung, 2005). 13
- Figura 8:** Estrutura química do pró-fármaco C16-DOX. Em vermelho, a DOX; sombreado em cinza, hidrazona; em preto, cadeia carbônica lipofílica. 14
- Figura 9:** Ilustração esquemática da incorporação da NE C16-DOX; clivagem da ligação hidrazona e ativação da DOX dentro da célula (adaptado de GANTA et al., 2008). 16
- Figura 10:** Delineamento experimental esquematizando a metodologia utilizada nas etapas de caracterização e avaliação das propriedades pH-sensíveis; avaliações *in vitro* e avaliações *in vivo* após tratamento com a nanoemulsão neste estudo 21
- Figura 11:** Esquema do passo a passo da formulação da nanoemulsão NE C16-DOX. Em (1) a fase oleosa foi pesada juntamente com o pró-fármaco; foi mantida sob agitação a 85°C (2) por alguns minutos e então foi adicionado 2,5 mL de PBS até que os compostos fossem solubilizados (3). Foi adicionado então mais 2,5 mL de PBS e o béquer foi transferido para agitador sob temperatura ambiente (4). A nanoemulsão foi armazenada protegida da luz (5). 23

<b>Figura 12:</b> Delineamento experimental da máxima dose tolerada dosagem/grupo experimental.	32
<b>Figura 13:</b> Delineamento experimental da eficácia terapêutica dosagem/grupo experimental.	33
<b>Figura 14:</b> Delineamento experimental da biodistribuição dosagem/grupo experimental.	34
<b>Figura 15:</b> Síntese e estrutura do pró-fármaco C16-DOX a partir da DOX-EMCH através da reação de Michael.	36
<b>Figura 16:</b> Espectro da massa e estrutura da C16-DOX utilizando ressonância magnética nuclear de prótons (RMN).	37
<b>Figura 17:</b> Espectrometria de massa do pró-fármaco C16-DOX.	38
<b>Figura 18:</b> Aparência macroscópica do C16-DOX em ambiente neutro.	39
<b>Figura 19:</b> Responsividade a pH do C16-DOX. As imagens mostram a liberação da DOX do pró-fármaco após redução do pH: a) representação qualitativa da intensidade de fluorescência ao longo do tempo em pH 7,2 e 3; b) representação gráfica da análise quantitativa em RFU ao longo do tempo.	39
<b>Figura 20:</b> Diâmetro hidrodinâmico por intensidade de dispersão das NEs obtidas sem e com diferentes concentrações de C16-DOX (0,4; 0,8 e 1,2 mg/mL).	40
<b>Figura 21:</b> Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão da NE C16-DOX (0,8 mg/mL) sob diferentes condições de pH.	41
<b>Figura 22:</b> Quantificação da DOX através de absorvância na NE C16-DOX por espectrofotometria. As duas amostras foram diluídas em 0,125; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 µg/mL a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL e uma regressão linear foi obtida a partir das absorvâncias da DOX	41
<b>Figura 23:</b> Aparência macroscópica da NE C16-DOX.	42
<b>Figura 24:</b> Em A, dispersão da população da NE C16-DOX em percentual numérico com raio hidrodinâmico de 20,63 nm e em B, dispersão da população da NE branca em percentual numérico com raio hidrodinâmico de 26,55 nm.	43
<b>Figura 25:</b> Perfil de liberação cinética da NE C16-DOX por diálise em pH ácido e pH fisiológico ao longo do tempo. Dados representados em % de DOX (A) e concentração de DOX (µg/mL) (B).	44
<b>Figura 26:</b> Perfil de liberação de DOX: avaliação qualitativa da liberação de DOX por fluorescência em microtubos de amicon.	45
<b>Figura 27:</b> Teste de viabilidade (MTT) das células 4T1 (A) e NIH 3T3 (B) após 2 horas de exposição a diferentes concentrações de NE C16-DOX e NE Branca com mais 24 horas de recuperação com meio de cultivo. Dados expressos como média ± erro padrão da média. a = p<0,05 na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e NE Branca na concentração de 50 µg/mL. b = p<0,05 na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e NE Branca na concentração de 100 µg/mL. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.	46

- Figura 28:** Teste de viabilidade por análise celular de 4T1 em tempo real (RTCA) após exposição de 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre ao longo de 40 horas sem recuperação. Dados expressos como média ± erro padrão da média. 47
- Figura 29:** Teste de viabilidade (MTT) das células HeLa (A) e KB-V1 (B) após 30 minutos de exposição a diferentes concentrações de NE C16-DOX, NE Branca e DOX livre com mais 24 horas de recuperação com meio de cultivo. Dados expressos como média ± erro padrão da média. a =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e DOX livre na concentração de 50 µg/mL. b =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e DOX livre na concentração de 100 µg/mL. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. 48
- Figura 30:** Teste de viabilidade por análise celular em tempo real (RTCA) de células HeLa (A) e KB-V1 (B) após exposição de 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre ao longo de 170 horas. Dados expressos como média ± erro padrão da média. 49
- Figura 31:** Análise da área sob a curva do índice de proliferação celular após exposição de 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre ao longo de 170 horas. 50
- Figura 32:** Análise qualitativa da atividade hemolítica das nanoemulsões C16-DOX e Branca em diferentes concentrações em comparação com os controles. O controle negativo e positivo estão representados por CTL- e CTL+, respectivamente. 51
- Figura 33:** Análise quantitativa da atividade hemolítica das nanoemulsões C16-DOX e Branca em diferentes concentrações por espectrofotometria utilizando a absorbância da hemoglobina. 51
- Figura 34:** Representação gráfica da análise de parâmetros indicadores de mecanismo de morte de células 4T1 expostas por 2 horas sem recuperação a 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre utilizando os marcadores de morte Anexina V e 7-AAD por citometria de fluxo. Marcação negativa pode indicar células viáveis, AV+/7-AAD- pode ser indicador de apoptose e AV-/7-AAD+ | AV+/7-AAD+ pode ser indicador de necrose. # e \* simboliza diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo controle (CTL-). 52
- Figura 35:** Histogramas da cinética de internalização utilizando o deslocamento da fluorescência da DOX em células 4T1 por citometria de fluxo: A) após 15 minutos de exposição; B) após 30 minutos; C) após 60 minutos e em D) após 120 minutos exposição. O arraste pro lado direito do eixo X indica maior fluorescência captada. 53
- Figura 36:** Representação gráfica da cinética de associação utilizando a porcentagem da fluorescência da DOX em células 4T1 por citometria de fluxo em diferentes tempos de exposição.  $p < 0,05$  versus todos os 54

tratamentos e em todos os tempos. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's..

**Figura 37:** Fotomicrografia de fluorescência de células 4T1 após tratamento com NE C16-DOX em diferentes tempos de incubação. Fluorescência azul indica núcleo (corado por DAPI) e vermelho DOX. 55

**Figura 38:** Fotomicrografia de fluorescência de células 4T1 após tratamento com DOX livre em diferentes tempos de incubação. Fluorescência azul indica núcleo (corado por DAPI) e vermelho DOX. 56

**Figura 39:** Representação gráfica da DOX intracelular após tratamento por 30 minutos com diferentes bloqueadores de endocitose seguido por tratamento por 2 horas com a NE C16-DOX analisadas por citometria de fluxo.  $p < 0,05$  versus todos os tratamentos. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. 57

**Figura 40:** Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células HeLa e KB-V1 tratadas com DOX livre (A) e NE C16-DOX (B) após 1 hora de exposição. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). A DOX é indicada pela fluorescência vermelha. Imagens tratadas no *software ImageJ*. 58

**Figura 41:** Variação do peso corporal de camundongos Balb/C fêmeas observada durante 14 dias após a administração via intraperitoneal de diferentes tratamentos. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ; ANOVA). 59

**Figura 42:** Taxa de sobrevivência de camundongos Balb/C fêmeas observada durante 15 dias após a administração de diferentes tratamentos. 60

**Figura 43:** Variação do peso do coração em relação ao peso corporal de camundongos Balb/C fêmeas observada durante 15 dias após a administração de diferentes tratamentos. 60

**Figura 44:** Variação do volume de tumores 4T1 de camundongos tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg), DOX livre (40 mg/kg) e controle com tumor (PBS). Os tratamentos foram realizados no dia 1, 2, 3, 4 e 5. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. \* =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com a DOX livre (40 mg/kg). # =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com controle com tumor (PBS). Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. 61

**Figura 45:** Volume de tumores 4T1 de camundongos tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg), DOX livre (40 mg/kg) e controle com tumor (PBS) no quinto dia de tratamento. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. 62

**Figura 46:** Massa corpórea dos camundongos tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg), DOX livre (40 mg/kg) e controle tumor (PBS). Os tratamentos foram realizados no dia 15, 16, 17, 18 e 19. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. Análise 63

estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

**Figura 47:** Percentual de sobrevivência dos animais tratados com DOX livre (40 mg/kg), NE C16-DOX (20 mg/kg) e controle tumor (PBS) ao longo do experimento. 64

**Figura 48:** Peso dos órgãos *ex vivo* de camundongos tratados com controle com tumor (PBS), NE C16-DOX (20 mg/kg) controle sem tumor (A). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. \* =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com controle com tumor (PBS). # =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com controle sem tumor. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. Aspecto macroscópico do fígado (B), baço (C) e pulmão (D) excisados de camundongos portadores de tumor controle (PBS) (a), tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg) (b) e animais saudáveis sem tumor (c). 65

**Figura 49:** Biodistribuição qualitativa da DOX em camundongos com tumor 4 e 12 horas após tratamento com NE C16-DOX e DOX livre. A barra de escala na parte direita da figura representa a quantificação de emissão por fluorescência. A emissão amarela indica maior quantificação de DOX, enquanto a emissão vermelha indica menor quantificação ( $p < 0,05$ ). 66

**Figura 50:** Distribuição quantitativa de DOX nos órgãos coletados (A) e no tumor (B) após 4 horas de administração. 67

**Figura 51:** Distribuição quantitativa de DOX nos órgãos coletados (A) e no tumor (B) após 12 horas de administração. 61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Características da NEs em diferentes parâmetros	12
<b>Tabela 2:</b> Sumário dos nanossistemas obtidos utilizando pH-estímulos para o carreamento de DOX	15
<b>Tabela 3:</b> Material utilizados nos experimentos	20
<b>Tabela 4:</b> Linhagens e manutenção das células utilizadas	26
<b>Tabela 5:</b> Linhagens celular, concentração de plaqueamento, tempo de incubação e concentração de tratamento	27
<b>Tabela 6:</b> Faixas espectrais ajustadas para detecção da emissão de fluorescências da DOX e marcadores (fluoróforos)	30

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

**<sup>1</sup>H** - Hidrogênio

**4T1** – Linhagem celular de carcinoma mamário murino

**7-AAD** - 7-Aminoactinomycin D

**ANT** – Antraciclina

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**C16-DOX** – Doxorrubicina ligada a cadeia carbônica (16C)

**Ca<sup>+</sup>** - Cálcio

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**DAPI** - 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride

**DLS** – Espectroscopia de correlação de fótons

**DMEM** – Dulbecco Modified Eagle Medium (Invitrogen)

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DOX** – Cloridrato de doxorrubicina

**DOXO-EMCH** - (6-maleimidocaproil) hidrazona da doxorrubicina

**EPI** – Elevada Pressão Intersticial Tumoral

**EPP** – Eritrodisestesia palmo-plantar

**EPR** – *Enhanced permeation and retention*

**FITC** - Isotiocianato de fluoresceína

**FNT** - Formalina Neutra Tamponada

**gpP** – Glicoproteína-P

**HPV** - Papilomavírus humano

**IC<sub>50</sub>** – Concentração do fármaco que inibe 50% da viabilidade celular

**MTD** – Máxima Dose Tolerada

**MTT** - 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo

**NaCl** - Cloreto de sódio

**NE C16-DOX** - Nanoemulsões poliméricas contendo doxorrubicina

**NEAA** – Aminoácidos não-essenciais

**NEs** – Nanoemulsões

**NIH 3T3** – Fibroblastos murino

**NP** – Nanopartícula

**PBS** – Tampão fosfato salina

**pH** – Potencial hidrogeniônico

**Ppm** – Partes por milhão

**RFU** – Unidade de Fluorescência Relativa

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RNAi** – RNA interferente

**rpm** – Rotação por minuto

**RTCA** - Avaliação de celular em tempo real

**SFB** – Soro bovino fetal

**SMF** – Sistema Mononuclear Fagocitário

**UV** – Ultravioleta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Câncer .....	1
2.2 Doxorubicina .....	5
2.3 Nanotecnologia .....	8
2.4 Latenciação de fármacos .....	12
2. JUSTIFICATIVA .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. METODOLOGIA .....	20
4.1 Materiais e reagentes.....	20
4.2 Delineamento experimental.....	21
4.3 C16-DOX.....	21
4.3.1 Síntese do C16-DOX.....	21
4.3.2 Avaliação das propriedades pH-sensíveis do pró-fármaco C16-DOX.....	22
4.4 NE C16-DOX.....	22
4.4.1 Obtenção da NE C16-DOX.....	22
4.4.2 Quantificação da DOX na NE C16-DOX .....	24
4.4.3 Caracterização da NE C16-DOX .....	24
4.4.3.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.....	24
4.4.4 Análise de perfil de liberação da NE C16-DOX .....	24
4.5 Avaliações <i>in vitro</i> .....	25
4.5.1 Cultivo celular.....	25
4.5.2 Ensaio de citotoxicidade .....	26
4.5.2.1 Avaliação de indução de hemólise .....	28
4.5.4 Análise de mecanismo de morte celular.....	28
4.5.5 Análise de interiorização.....	28
4.5.6 Mecanismo de endocitose .....	29
4.5.7 Análise de localização sub-celular da DOX por microscopia confocal .....	29
4.5.8 Análise de localização sub-celular da DOX por microscopia de fluorescência .....	30
4.6 Avaliações <i>in vivo</i> .....	31
4.6.1 Manutenção dos animais .....	31
4.6.2 Indução do tumor .....	31
4.6.3 Máxima dose tolerada (MDT).....	31
4.6.4 Eficácia terapêutica .....	32
4.6.5 Biodistribuição .....	33

4.7 Análises estatísticas.....	34
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Síntese e caracterização do pró-fármaco C16-DOX .....	36
5.2 Obtenção e caracterização da NE C16-DOX .....	40
5.3 Ensaio de citotoxicidade.....	45
5.4 Avaliação da atividade hemolítica .....	50
5.5 Análise de mecanismo de morte.....	52
5.6 Análise de associação.....	53
5.7 Microscopia de fluorescência.....	54
5.8 Mecanismo de endocitose .....	56
5.9 Análise de sub-localização celular .....	57
5.10 Máxima dose tolerada (MDT).....	59
5.11 Eficácia terapêutica .....	61
5.12 Biodistribuição .....	66
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÃO .....	82

## **REFERÊNCIAS**

### **ANEXO A**

### **ANEXO B**

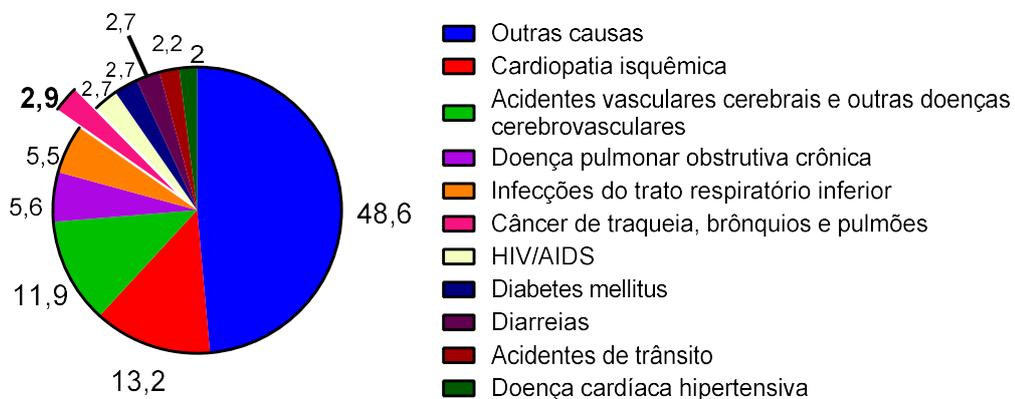
### **ANEXO C**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

Estatisticamente, em dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) referente ao ano de 2012, o câncer foi apontado como a quinta maior causa de morte no mundo ocasionados por doença (Figura 1), sendo responsável por 8,2 milhões de mortes. De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) feito em 2014, previsões feitas para o ano de 2030 sugerem que 27 milhões de novos casos de câncer serão diagnosticados, 17 milhões de mortes relacionadas à doença serão notificadas e 75 milhões de pessoas vivas terão diagnóstico de câncer anualmente. Neste prospecto, a maior incidência se dará em países em desenvolvimento (OMS, 2014).

#### 10 principais causas de morte no mundo (%)



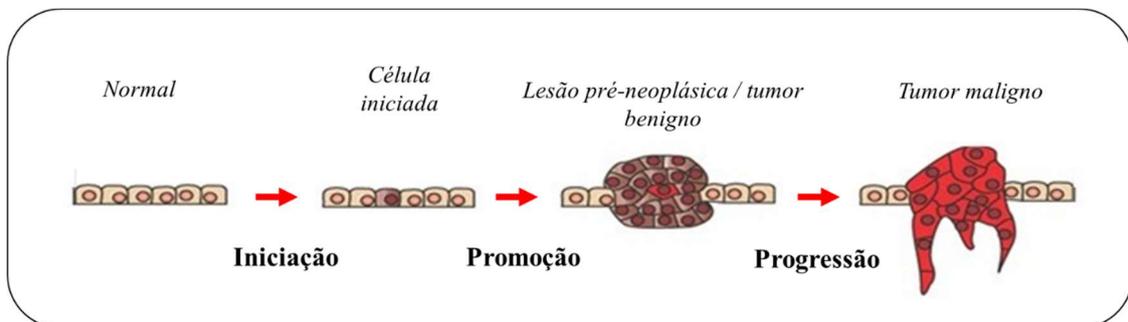
**Figura 1:** Representação gráfica dos dados em porcentagem fornecidos pela OMS das dez principais causas de morte no mundo no ano de 2012.

O câncer é uma doença multifatorial estando seu desenvolvimento diretamente relacionado a questões genéticas. Hanahan e Weinberg sugerem que, os diversos tipos de células cancerígenas sejam a manifestação de seis alterações essenciais na célula: autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição de crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitada, angiogênese continuada e invasão de tecido e metástase (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Os fatores genéticos na maioria das vezes são pré-determinados. Por

ambiente, compreende-se ambiente no geral (água, terra e ar), ambiente ocupacional insalubre, estilo/hábitos de vida e consumo de alimentos/medicamentos. Fatores ambientais principalmente como elitismo, tabagismo e sedentarismo estão envolvidos com as causas etiológicas da doença. Outros fatores como questões socioeconômicas em alguns países também estão relacionadas com o tipo de câncer e quantitativo, especialmente por estar associado a exposição de fatores de risco. É o caso dos cânceres relacionados ao consumo de tabaco (cavidade oral, pâncreas e pulmão) que podem ser influenciados por questões culturais e socioeconômicas do indivíduo (OMS, 2014).

Para manutenção da vida os processos de proliferação, diferenciação e morte celular são regulados por mecanismos específicos (uma família de fatores de crescimento extracelular) que devem permanecer em equilíbrio. Essa patologia é caracterizada pela proliferação desregulada de células que invadem os tecidos e órgãos adjacentes.

O câncer se desenvolve lentamente, podendo demorar anos para a formação de um tumor. Esse processo, denominado carcinogênese, é dividido em três estágios principais: a iniciação, promoção e progressão (Figura 2). A primeira fase da carcinogênese, a iniciação, é caracterizada pela exposição da célula ao agente cancerígeno (composto químico, radiações X ou ultravioleta, vírus), levando a modificação de alguns genes. No estágio da promoção, as células que já tiverem seus genes alterados, sofrem o efeito dos agentes que não são mutagênicos, mas promovem a expansão da população celular com uma mutação inicial de forma gradual e lenta. A terceira fase, progressão, se caracteriza pela proliferação descontrolada e irreversível das células alteradas, formando uma massa tumoral no local. Algumas células podem se desprender dessa massa e atingir a corrente sanguínea, sendo levadas e instaladas em outros tecidos causando a metástase (POLLOCK, 2006).



Fonte: College of Veterinary Medicine, University of Georgia (2017)

**Figura 2:** Fases do processo de carcinogênese. No estágio de iniciação as células sofrem a ação dos agentes carcinogênicos. Na promoção, agentes não mutagênicos promovem a

expansão celular das células previamente alteradas geneticamente. O estágio de progressão se caracteriza pela proliferação descontrolada e irreversível das células.

O câncer de mama é um dos mais frequentes dentre os tipos de neoplasias e o que causa maior índice de mortalidade entre as mulheres (CHIA, 2005). As estimativas do INCA para o ano de 2016, e que valem para 2017, indicam o surgimento de mais 57.960 novos casos de câncer de mama no Brasil, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres. O câncer do colo do útero é considerado um importante problema de saúde pública entre as mulheres. As estimativas também para o ano de 2016 no Brasil, mostram que são esperados 16.340 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016) (Figura 3).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%		<b>Homens</b> <b>Mulheres</b>	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2016

**Figura 3:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não-melanoma\*.

As causas do câncer de mama estão relacionadas a diferentes fatores que podem aumentar o risco de desenvolver a doença, tais como: fatores endócrinos, ambientais e genéticos. A idade é um dos principais fatores que aumentam o risco neste tipo de câncer devido ao tempo de formação do tumor. Em relação aos fatores endócrinos, algumas condições estão associadas ao maior risco de desenvolver este câncer, tais como: terapia de reposição hormonal, uso de anticoncepcionais orais, menarca precoce e menopausa tardia (ANOTHASINTAWEE et al., 2013). O carcinoma de mama é o tipo mais comum dessa neoplasia, podendo se desenvolver mais raramente também como sarcoma, em menos de 1% dos casos. O carcinoma representa um grupo de tumores heterogêneos

sendo uma doença complexa de tipos morfológicos, clínicos e moleculares distintos (EROLES et al, 2012). A heterogeneidade destes tumores está relacionada à célula de origem e às suas alterações de expressão gênica. Para classificar os subtipos do câncer de mama é necessário identificar a célula de origem, o tipo de alteração molecular e os genes susceptíveis (BERTUCCI & BIRNBAUM, 2008). Os estudos de expressão gênica permitiram identificar alguns subtipos moleculares desse carcinoma baseados na expressão dos receptores hormonais e das citoqueratinas basais e luminais. Os tumores com expressão do receptor de estrógeno e expressão das citoqueratinas luminais foram denominados como subtipo luminal. Os tumores que não expressavam receptor de estrógeno e expressavam genes basais foram identificados como subtipo basal-símile. Os tumores como expressão negativa de todos os genes foram denominados como subtipo “mama normal” ou não classificável. As neoplasias que não expressavam receptor de estrógeno mas com superexpressão do receptor Erb-B2 foram identificadas como subtipo HER2+. Alguns autores consideram ainda outro subtipo conhecido como triplo-negativo, que é considerado por outros como sinônimo do subtipo basal-símile. O triplo negativo se caracteriza pela expressão negativa dos receptores de estrógeno e HER2+ (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2003; DENT et al., 2007).

Atualmente, o tratamento do câncer de mama envolve cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormônio-terapia ou a combinação destas modalidades terapêuticas. Uma grande variedade de agentes quimioterápicos são utilizados no tratamento do câncer de mama, o que incluem antraciclina (doxorrubicina, epirrubicina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), platinas (cisplatina, carboplatina), capecitabina, vinorelbina e gencitabina (JOHNSTON, 2011). Apesar das melhorias na quimioterapia, procedimento mais comumente empregado no tratamento do câncer, os agentes quimioterápicos possuem um índice terapêutico estreito e que não permite muitas vezes a administração de uma quantidade suficiente do fármaco para obtenção da eficácia máxima (NIH, 2005).

O câncer do colo do útero, segundo a estimativa do INCA para o ano de 2016/2017, é o terceiro tipo de neoplasia mais prevalente entre as mulheres no Brasil. Estima-se que 99% dos casos de câncer cervical tem como agente etiológico uma infecção genital ocasionada pelo papilomavírus humano (HPV). A etiologia viral dessa neoplasia foi comprovada há décadas, confirmando a existência de pelo menos 150 tipos diferentes de HPV (INCA, 2016). Para desenvolvimento do câncer cervical é necessário a infecção persistente por um HPV de alto risco oncogênico. O vírus é eliminado por meio de mecanismos imunológicos em cerca de 90% das mulheres infectadas pelo HPV,

consequentemente, uma pequena porcentagem das mulheres infectadas irá permanecer persistentemente infectadas e sob o risco de desenvolver o câncer cervical (MOSCICKI et al., 2006). Os genes virais (proteínas E6 e E7) que atuam no desenvolvimento do câncer são expressos em tecidos malignos, quando sua expressão é inibida, ocorre o bloqueio do fenótipo maligno das células cancerosas cervicais. Esses genes possuem a capacidade de imortalizar a célula independentemente e a eficiência desse processo aumenta quando ambos são expressos na mesma célula, devido a um efeito sinérgico. A afinidade dessas proteínas pelo genes supressores de tumor varia de acordo com o potencial oncogênico do HPV (zur Hausen, 2002).

Entre os tratamentos mais comuns para o câncer do colo do útero estão a cirurgia a laser, criocirurgia, conização, histerectomia simples e radical, radioterapia e quimioterapia sistêmica. O tipo de tratamento dependerá do estadiamento da doença, tamanho do tumor e fatores pessoais, como idade e desejo de ter filhos. O rastreamento da doença é feita detecção preventiva das lesões iniciais por meio do exame microscópico das células esfoliadas da mucosa cervical (Papanicolaou). Quando diagnosticado na fase inicial, existe a chance de cura do câncer cervical de 100%. Entretanto, existem diversas limitações no tratamento desse tipo de neoplasia sendo a principal a possibilidade de recidiva em 50% dos casos no primeiro 1 ano após término do tratamento (INCA, 2016).

Em razão das limitações dos tratamentos, atualmente a comunidade científica tem se empenhado em buscar soluções para aumentar a eficácia dos quimioterápicos na terapia do câncer e limitar os efeitos colaterais severos relacionados à terapia.

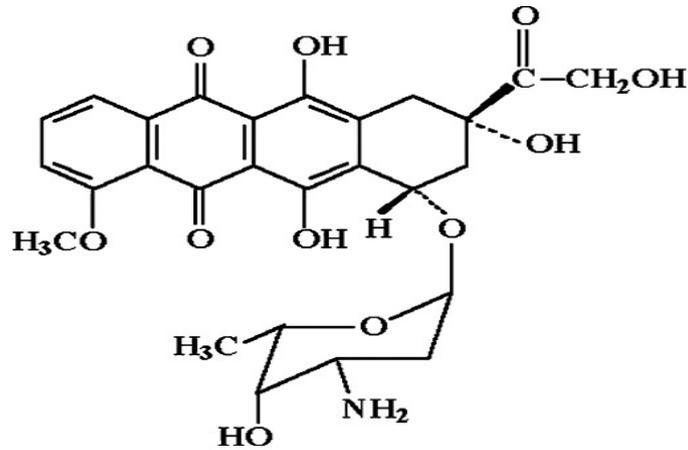
## 2.2 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DOX), quimioterápico estudado nesta tese, é um antibiótico antineoplásico citotóxico largamente utilizado no tratamento de tumores sólidos (TREVISAN & POPPI, 2003). Pertencente à classe das antraciclinas, a DOX foi isolada a partir de culturas fúngicas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (ROMERO, 2015).

É um dos mais potentes antineoplásicos e mais utilizados atualmente tanto de forma isolada ou na poliquimioterapia, em uso concomitante com outros quimioterápicos.

A DOX apresenta um anel de antraciclina em sua estrutura, é uma molécula anfifílica e possui um núcleo naftacenediona fluorescente no carbono 7, ligado a uma

cadeia lateral aminoglicosídica hidrofílica. Os agentes citotóxicos desta classe possuem quinona ou hidroquinona nos anéis adjacentes que permitem que funcionem como agentes receptores e doadores de elétrons (CHANBER et al., 2011) (Figura 4).



**Figura 4:** Estrutura química da doxorubicina (TREVISAN & POPPI, 2003).

O mecanismo de ação da DOX está relacionado ao anel de antraciclina (ANT) que é responsável por intercalar-se entre os pares de nucleotídeos da dupla fita de DNA (citosina e guanina) nas fases de transcrição e replicação. A intercalação a esta estrutura ocorre na ligação açúcar-fosfato da cadeia interferindo na atividade enzimática da topoisomerase II, bloqueando assim a síntese de DNA e RNA (PORUMB, 1986; LEHMANN, 2003). A DOX pode também atuar na membrana celular, formando ligações com os grupos de fosfolipídeos, que são carregados negativamente, alterando a fluidez e desta forma o transporte de íons. As ANTs induzem também o estresse oxidativo, promovendo a formação do radical livre do oxigênio e da semiquinona, por meio de um processo redutor enzimático. Assim, a doxorubicina tem ação mutagênica e carcinogênica (CULLINANE, 1994; CHABNER et al., 2011).

Dessa forma, a DOX lesiona a membrana celular e o DNA devido à produção de radicais livres altamente reativos e que induzem lesões no miocárdio, causando um dos maiores efeitos adversos: cardiotoxicidade (BOUCEK *et al.*, 1987; ASHIKAWA *et al.*, 2004).

Algumas hipóteses tem sido formuladas para explicar o motivo do coração ser o principal alvo dos efeitos tóxicos das ANTs. A quantidade exacerbada de mitocôndrias neste órgão pode aumentar significativamente a produção de espécies reativas de

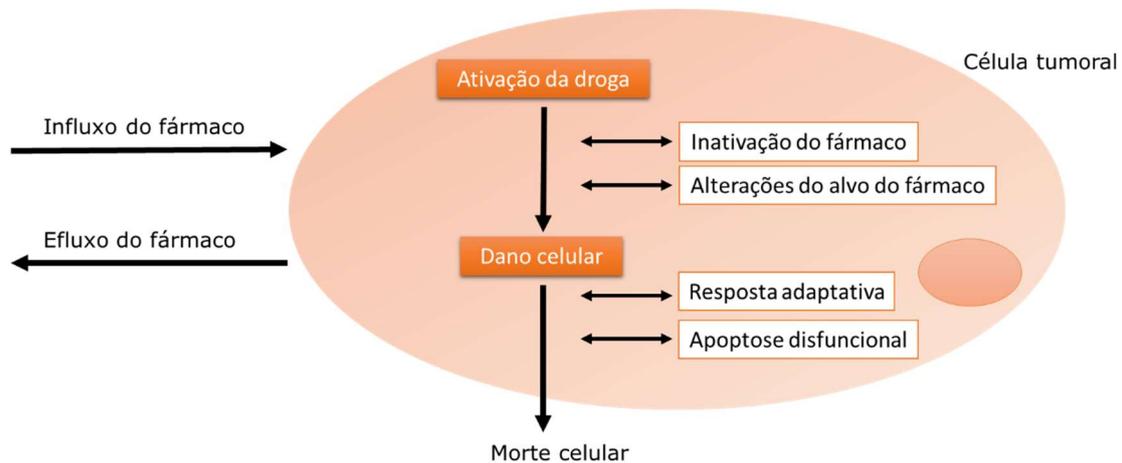
oxigênio devido ao ciclo de oxidação da droga e ocasionar dano mitocondrial no miocárdio. Uma outra teoria sugere que devido aos níveis mais baixos das enzimas catalase e glutathione peroxidase no tecido cardíaco, a atividade antioxidante endógena seria reduzida. Outros fatores envolvem a desregulação do equilíbrio de  $\text{Ca}^+$  na mitocôndria e do fluxo de  $\text{Ca}^+$  no retículo sarcoplasmático, responsável pela contração muscular e pela perturbação da expressão genética mitocondrial (ADAO, 2013). Sugere-se ainda que o acúmulo das antraciclinas seria maior no tecido cardíaco do que em outros tecidos (SIMUNEK et al., 2009).

A potente eficácia terapêutica da DOX está associada a outros efeitos adversos que incluem alterações hematológicas (anemia, leucopenia e trombocitopenia); gastrointestinais (vômitos, náuseas, ulcerações e anorexia); dermatológicas (alopecia, urticária e eritema facial) (MACHADO *et al.*, 2008).

Além dos efeitos adversos da quimioterapia associados ao tratamento com a DOX, a eficácia dessa terapia tem sido limitada pelo processo de resistência ao fármaco utilizado.

A resistência a quimioterápicos é responsável pelo insatisfatório índice terapêutico em aproximadamente 90% dos pacientes que possuem metástases (HALOHAN et al., 2013). Essa resistência pode ser intrínseca ou adquirida. Quando intrínseca, os fatores que são responsáveis pela resistência já se encontram entre as células tumorais, o que inativaria o tratamento. Quando adquirida, as células tumorais que eram sensíveis ao tratamento sofrem mutações adquirindo vias de sinalização compensatórias, sendo assim, essas células passam a não responder mais ao tratamento e o tumor volta a proliferar (LONGLY et al., 2005).

Os mecanismos que causam a resistência tem sido amplamente estudados e alguns fatores influenciadores descritos. Esses fatores incluem: quantidade do fármaco que entra ou sai na célula (influxo ou efluxo); inativação nos processos que estão envolvidos na ativação da ação do fármaco; alterações que modificam os alvos do fármaco na célula e indução da otimização do processamento do dano causado pelo fármaco (HALOHAN et al., 2013) (Figura 5).



**Figura 5:** Principais mecanismos de resistências a quimioterápicos: redução do influxo do fármaco; aumento de efluxo do fármaco; Inativação do fármaco; Alterações no sítio alvo do fármaco; Mudanças na resposta adaptativa e apoptose disfuncional (adaptado de HALOHAN et al., 2013).

O processo de resistência que tem sido relacionado à DOX envolve a inibição da topoisomerase. A topoisomerase cliva e religa a fita dupla de DNA para aliviar a tensão durante o processo de replicação. A doxorubicina atua impedindo que a topoisomerase religue a molécula de DNA, o que pode gerar quebras duplas do DNA e conseqüentemente morte celular (LIU et al., 2000). A redução da expressão, atividade e mutações impedem a interação da doxorubicina com a topoisomerase, inativando a ação do fármaco (FRICHE et al., 1991; HOFMANN et al., 1993; LI et al., 1996).

As principais explicações para o alto índice de efeitos adversos é relacionado à baixa seletividade não só da DOX como dos fármacos convencionais aos tecidos neoplásicos, podendo, em algumas situações ser mais absorvidos por órgãos como fígado, baço, coração e medula óssea, do que pelos tecidos neoplásicos propriamente ditos. Devido a isto, uma evolução da metodologia tradicional, baseada na necessidade de aumentar o índice terapêutico dos fármacos, diminuir a toxicidade em células normais e superar a resistência à quimioterápicos está sendo buscada.

### 2.3 Nanotecnologia

Entre as possíveis estratégias desenvolvidas, os nanossistemas são concebidos para se obter uma concentração plasmática ou níveis de concentração teciduais de fármacos de forma controlada ou não, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando

possíveis reações tóxicas inerentes ao composto, além de aumentar significativamente a entrega de fármacos aos tecidos neoplásicos (SAKATA et al., 2007). Basicamente, as nanopartículas precisam ser direcionadas ao local alvo e então liberar controladamente ou não o princípio ativo no tumor. De maneira ideal, para que fármacos anticâncer sejam efetivos na terapia, eles devem primeiro, após a administração, serem capazes de atingir o tecido tumoral através da penetração de barreiras no corpo com o mínimo de perda do volume da nanopartícula ou atividade na circulação sanguínea. Após atingir o tumor, fármacos devem possuir a habilidade de matar seletivamente células cancerosas sem afetar células normais (CHO et al., 2008). As características que vão controlar o direcionamento da nanopartícula ao tumor podem ser controladas durante o processo de síntese. Os nanossistemas de liberação controlada de medicamentos são desenvolvidos para se obter uma concentração plasmática ou níveis de concentração teciduais de fármacos de forma controlada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações adversas inerentes ao composto. Estes sistemas podem controlar a liberação do princípio ativo, prolongar a sua liberação e/ou direcioná-lo a sítios específicos de ação (células, órgãos, microrganismos). Na terapia medicamentosa utilizando formas farmacêuticas convencionais como comprimidos, soluções, suspensões, cápsulas, entre outros, torna-se difícil manter as concentrações plasmáticas de fármacos em nível terapêutico por um longo período de tempo, devido à liberação imediata de todo o conteúdo de fármaco. Este fato gera, inicialmente, um pico máximo de concentração plasmática que pode atingir níveis tóxicos. Após esse pico máximo, a concentração plasmática torna-se insuficiente para ação farmacológica atingindo então a faixa subterapêutica, proporcionando flutuações aleatórias da biodisponibilidade do princípio ativo (LEE & ROBINSON, 2004). O principal objetivo de uma forma farmacêutica de liberação controlada é, portanto, manter a concentração plasmática constante do fármaco no nível terapêutico, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento com dose subterapêuticas ou efeitos tóxicos da substância ativa.

O fenômeno de acúmulo do fármaco no tecido tumoral se deve ao processo de vetorização passiva, denominado efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR) que pode ser atingido pela junção da entrega do fármaco no tumor e pela manutenção dos níveis plasmáticos. O efeito EPR é uma combinação do aumento de permeabilidade vascular endotelial com uma drenagem linfática limitada do interstício dos tumores sólidos, como o câncer de mama. A presença de uma vascularização malformada, o que

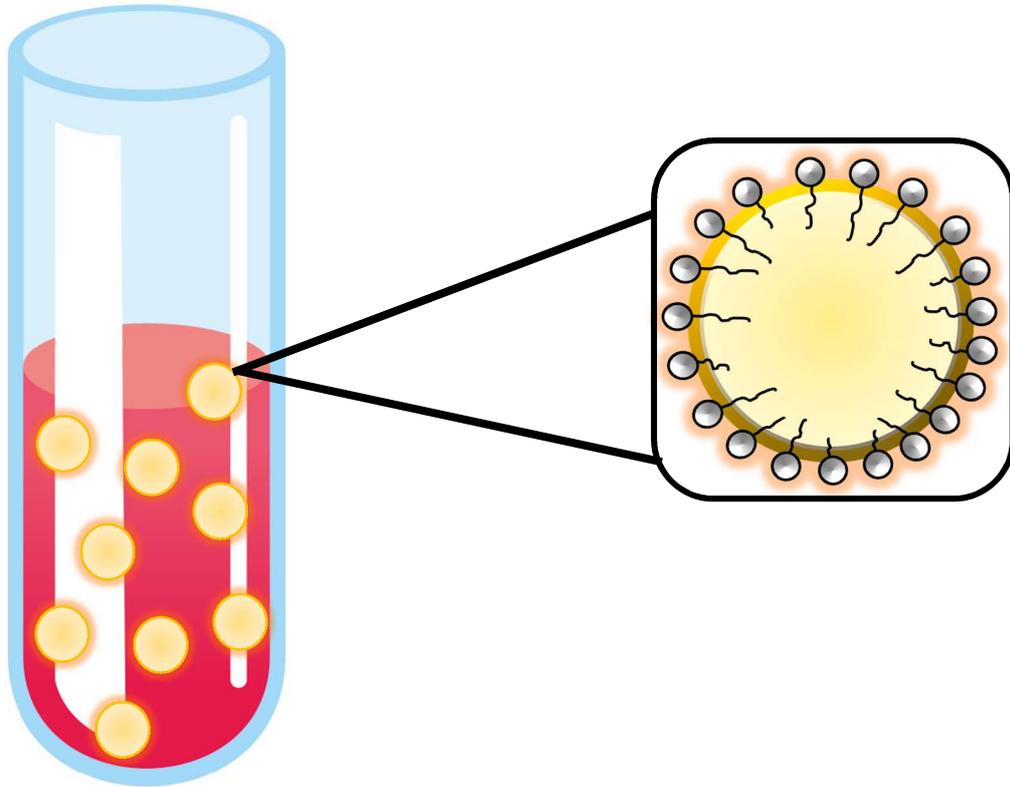
ocasiona maiores fenestras no tecido, permite que as nanopartículas penetrem os tecidos do tumor. Devido às limitações tumorais, estas nanopartículas são ineficientemente removidas pela drenagem linfática, levando ao maior acúmulo e conseqüente maior entrega da droga no tumor (KOUSHIK, 2016). Entretanto, um estudo recente baseado nas pesquisas publicadas nos últimos 10 anos sobre eficiência dos mais variados tipos de nanopartículas, revelou que o acúmulo passivo de nanopartículas no tumor sólido em modelos de camundongos é na ordem de 7 a cada de 1000 nanopartículas injetadas. Algumas características foram observadas por aumentar a eficácia das nanopartículas: (1) formuladas com materiais inorgânicos; (2) diâmetro hidrodinâmico menor que 100 nm; (3) potencial zeta neutro entre -10 a +10 mV; (4) estratégias de alvo ativo; (5) formato redondo; (6) e o uso de modelo tumor ortotópico (WIHELM et al., 2016).

Nas últimas décadas, diversos nanossistemas foram desenvolvidos visando melhorar a biodistribuição, eficácia terapêutica e diminuir os efeitos adversos da doxorubicina. Na década de 90 o Doxil®, doxorubicina nanoveiculada, foi aprovado pela FDA (USA Food and Drug Administration). Este lipossoma lançado apresentava algumas vantagens em relação a droga livre como o maior tempo de circulação na corrente sanguínea devido a pegulação do sistema; carregamento maior e mais estável da DOX e a composição do lipossoma (bicamada lipídica estabilizada por colesterol) (BARENHOLZ, 2012). Entretanto, a forma lipossomal da doxorubicina apresentou um novo efeito adverso: síndrome mão-pé. A eritrodisestesia palmo-plantar (EPP) é uma reação dermatológica tóxica associada ao uso de quimioterápicos e que causa vermelhidão, inchaço e dor nas palmas das mãos e dos pés. A forma lipossomal da DOX também induziu mielossupressão (LORUSSO, 2007).

Devido as complicações no uso do Doxil®, novas tecnologias continuam sendo desenvolvidas utilizando a DOX como princípio ativo para o tratamento de neoplasias. Novos nanossistemas foram desenvolvidos recentemente, porém ainda não possuem autorização da ANVISA para serem comercializadas.

Dentre os nanocarreadores, as nanoemulsões (NE) se destacam por serem de fácil preparação, estáveis, apresentarem ausência de coalescência, fácil escalonamento, serem biocompatíveis e possuírem capacidade de encapsular uma ampla gama de princípio ativos (SHAH et al., 2010). São sistemas macroscopicamente homogêneos com a dispersão de dois líquidos imiscíveis estabilizados pela presença de um tensoativo, que reduz a tensão superficial da fase dispersa, produzindo gotículas de tamanhos variáveis entre 1 e 100 nm, em relação a dispersão por número e volume (MASON, 2006). Essas

dispersões coloidais podem ser do tipo óleo em água (O/W) ou água em óleo (W/O), a depender se as gotículas estão dispersas em água ou no óleo (Figura 6). Devido ao tamanho reduzido em relação a outros sistemas emulsificantes, nanoemulsões tendem a aumentar a atividade anticâncer (ALKHATIB, 2015).



**Figura 6:** Diagrama esquemático de um sistema de nanoemulsão óleo em água na presença de um tensoativo produzindo gotículas estáveis. Em destaque, o núcleo de óleo hidrofóbico estabilizado por cadeia de tensoativo anfifílico.

Nanoemulsões são obtidas por diferentes métodos, sendo geralmente formuladas por homogeneização a alta pressão; métodos de emulsificação de baixa energia (autoemulsificação; método de inversão de fase por temperatura) ou métodos de emulsificação de alta energia (ultrasonicação) (SHAH et al., 2010). Dentre os métodos de emulsificação de baixa energia pode ser mencionado a autoemulsificação, em que as gotículas são formadas devido a energia interna dos componentes, sendo necessário geralmente apenas agitação mecânica branda (SOLANS & SOLÉ, 2012). As NE possuem algumas características particulares que diferem de outros sistemas coloidais (tabela 1).

**Tabela 1:** Características da NE em diferentes parâmetros.

Parâmetro	Nanoemulsão
<b>Aparência</b>	Transparente
<b>Diâmetro hidrodinâmico</b>	1 a 100 nm
<b>Formulação</b>	Agitação mecânica
<b>Fase</b>	Monofásica
<b>Concentração de tensoativo</b>	Baixa (3-10% da massa total)

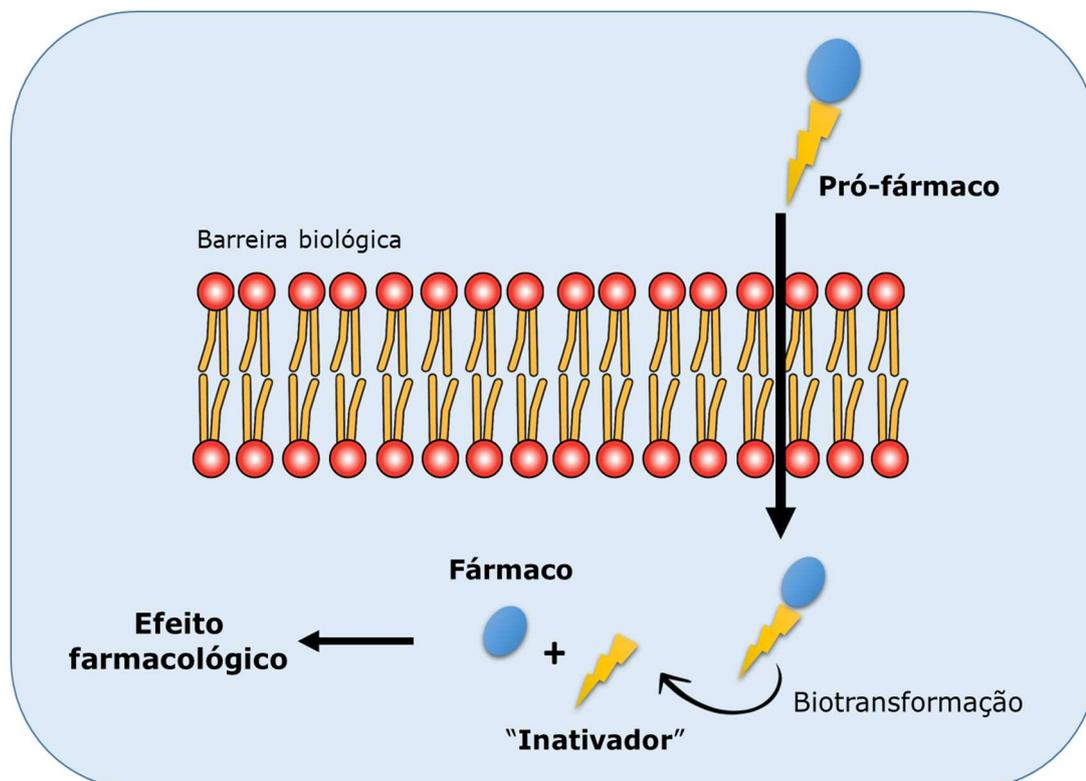
## 2.4 Latenciação de fármacos

A latenciação de fármacos, ou seja, a presença de fármacos na forma inativa devido a processos bioreversíveis foi proposta em 1959 por Harper. Existem diversos fármacos, altamente potentes, que possuem limitações que se caracterizam como barreiras para a sua aplicação clínica, como é o caso da DOX em consequência dos inúmeros efeitos adversos. Para otimizar as propriedades físico-químicas de um fármaco, alguns processos bioreversíveis podem ser utilizados por meio da conjugação de pequenas moléculas orgânicas, o que mascara tal característica sem alterar a função farmacológica permanentemente (ZHENG et al., 1999; HAN et al., 2000; ETTMAYER et al., 2004).

Como forma de potencializar o efeito terapêutico das nanoemulsões, uma nova abordagem tem sido testada. Nanopartículas ou nanossistemas que encapsulam conjugados que possuem o mecanismo de liberação do fármaco controlado por estímulos químicos, tal como pH, tem recebido maior atenção em se tratando da terapia do câncer. As nanoemulsões pH-sensíveis são estáveis no pH fisiológico, ou seja, não liberam o fármaco, porém em pH ácido (como dentro dos endossomos), sofrem quebra das ligações e liberam o princípio ativo (DE OLIVEIRA et al., 1998; PATRICK et al., 2013). Nesse contexto, utilizar as características patofisiológicas do tumor como pH, atividade enzimática e propriedades redox com o intuito de aumentar a eficácia terapêutica do fármaco de forma direcionada, reduzindo assim os efeitos colaterais, tem sido uma perspectiva extensamente estudada nas últimas décadas.

Fármacos latentes são transportados na forma inativa e sofrem transformação, *in vivo*, por meio de uma reação química ou enzimática, o que leva a liberação da porção ativa no local de ação ou próxima dele. Esses compostos são definidos como pró-

fármacos pois necessitam de biotransformação para exibir seus efeitos farmacológicos (CHUNG et al., 2005) (Figura 7).



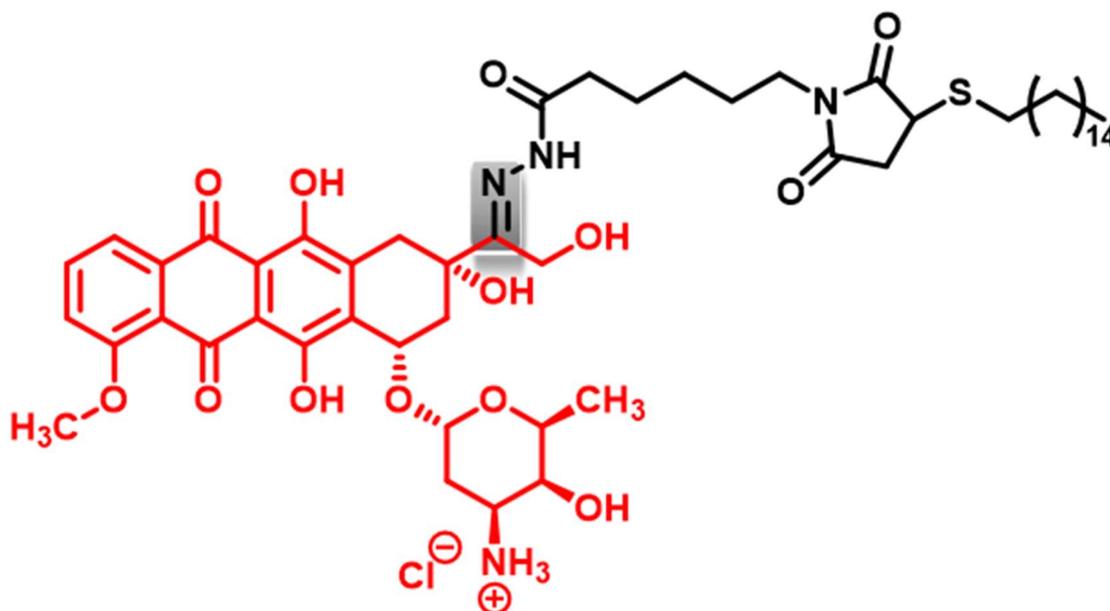
**Figura 7:** Representação esquemática do conceito de pró-fármaco. O pro-fármaco ultrapassa a barreira biológica na forma inativa, sofre biotransformação química ou enzimática ficando livre para ter ação farmacológica antes ou após alcançar o local de ação (adaptado de Chung, 2005).

A necessidade da latência do fármaco, ou seja, a necessidade da modificação da molécula no tratamento do câncer pode ser explicado por diversas razões: problemas farmacocinéticos (ocasionam baixa disponibilidade do fármaco no local de ação); elevada toxicidade e baixa estabilidade química (CHUNG et al., 2005).

Alguns fatores devem ser considerados na síntese ou obtenção dos pró-fármacos. O “transportador”, ou seja, a molécula que tornará o fármaco inativo, deve ser: atóxica; promover inatividade ou menor atividade; possuir uma cinética adequada de biotransformação e ser de obtenção por síntese menos complexa.

Muitos ligantes que podem ser clivados na presença de pH ácido tem sido utilizados, dentre eles a hidrazona, uma classe de compostos orgânicos (KRÜGER, 2015). Neste estudo, foi utilizado o pró-fármaco C16-DOX, em que o fármaco DOX está ligado a uma cadeia de 16 carbonos por meio de uma ligação hidrazona, a qual apresenta

sensibilidade a pH ácido. Na presença de ambiente ácido tumoral a ligação hidrazona é quebrada e a DOX é liberada exibindo seu potencial terapêutico (Figura 8).



**Figura 8:** Estrutura química do pró-fármaco C16-DOX. Em vermelho, a DOX; sombreado em cinza, hidrazona; em preto, cadeia carbônica lipofílica.

Em pH ácido, onde prótons são fornecidos, o nitrogênio é protonado permitindo o ataque de uma molécula de água porque o carbono ao lado do nitrogênio protonado se torna mais eletrofílico. Após o deslocamento do próton do oxigênio da água para o nitrogênio, ocorre a clivagem e a formação da hidrazona e do grupo carbonila da DOX. A clivagem é mais corretamente chamada de hidrólise porque é causada pela água. Esta reação ocorre em equilíbrio, ou seja, pode ir em ambas direções. O produto principal (lado esquerdo ou direito da equação) depende da quantidade de prótons disponível, isto é, do valor do pH. Quanto mais ácido for o ambiente, mais prótons estarão disponíveis o que levará a maior hidrólise/clivagem (lado direito da equação) (WEST et al., 2005).

Para a terapia do câncer é possível usar a sensibilidade ao pH devido às características fisiopatológicas deste tecido tumoral. Quase todos os tipos de tumores possuem pH menor em comparação com os tecidos saudáveis normais. À medida que o tumor cresce mais rápido, a angiogênese não é capaz de suprir todas as novas células formadas. A consequência fisiológica é que os tecidos tumorais tem uma distribuição diferente de vasos sanguíneos, fato que cria regiões com menor suprimento de oxigênio.

Esta condição modifica o fenótipo do tumor, alterando o metabolismo do tumor de respiração aeróbica para anaeróbica. Esta situação produz emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e ácido carbônico em excesso, o que quebra o tamponamento e reduz o pH do tecido. Dependendo do grau de densidade vascular tumoral, essas reações podem ser mais ou menos intensas. Esta é a maneira pela qual o tipo de tumor pode influenciar nos sistemas sensíveis ao pH (ZIYAD & IRUELA-ARISPE, 2011).

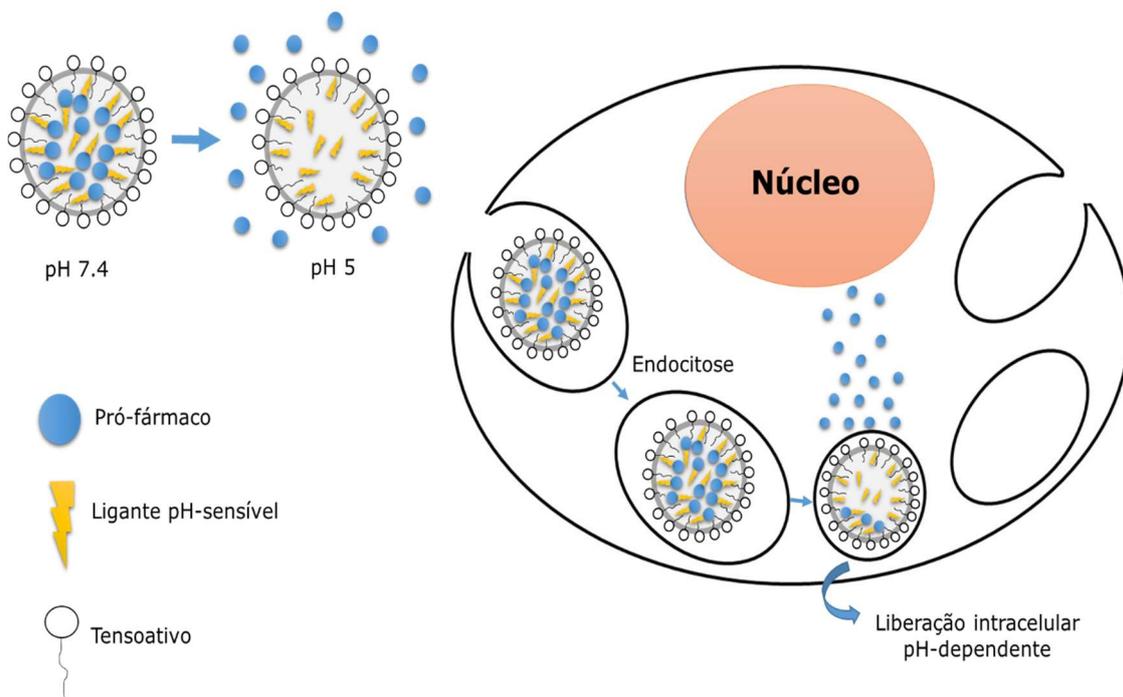
Com o propósito de utilizar as propriedades patofisiológicas do tumor e aumentar a entrega do fármaco no sítio alvo, diferentes nanossistemas tem sido obtidos utilizando a latenciação de fármacos. A Tabela 2 mostra um sumário dos diferentes nanossistemas pH-sensíveis obtidos para o carreamento da DOX.

**Tabela 2:** Sumário dos nanossistemas obtidos utilizando pH-estímulos para o carreamento de doxorubicina.

<i>Nanossistema</i>	<b>Propriedades</b>	<b>Atividade terapêutica</b>	<b>Referência</b>
<i>Polimérica</i>	Induz o colapso de macromolécula em condições ácidas e desestabiliza a membrana da vesícula intracelular	Aumentou a atividade anticâncer em modelos de tumor em camundongos	DUFRESNE et al., 2004
<i>Micelas</i>	Alta liberação de DOX sob condições de pH baixo (5-5,5) em lisossomos/endossomos	Aumentou a atividade anticâncer em modelos de tumor em camundongos	BAE et al., 2005
<i>Lipossomas</i>	Aumentou a liberação intracelular de DOX	Efeito citotóxico em células B-linfoma	BAE et al., 2005
<i>Dendrímeros</i>	Aumento da liberação intracelular da DOX após a Internalização fotoquímica	Aumentou a citotoxicidade em células Ca9-22	LAI et al., 2007

As nanoemulsões não tem sido vastamente exploradas utilizando a latenciação de fármacos com propriedades pH-sensíveis, basicamente as NE que têm sido obtidas utilizam polímeros e/ou copolímeros sensíveis em baixos pHs (LIU et al., 2014). Devido a maior complexidade durante a síntese desses polímeros/copolímeros novas estratégias são necessárias.

Dessa forma, acredita-se que a nanoemulsão é incorporada pela célula tumoral, possivelmente em consequência da vetorização passiva (efeito EPR) e das características físico-químicas do sistema; transportada em endossomos/lisossomos onde a ligação hidrazona será clivada e assim então a DOX será liberada podendo ser ativada no sítio alvo como no núcleo da célula (Figura 9).



**Figura 9:** Ilustração esquemática da incorporação da NE C16-DOX; clivagem da ligação hidrazona e ativação da DOX dentro da célula (adaptado de GANTA et al., 2008).

Após a administração na corrente sanguínea a nanopartícula começa uma jornada que passa por diversos estágios: circulação, extravasamento, acumulação, distribuição, endocitose, fuga endossomal, localização intracelular e por final, ação. Durante o processo de síntese/obtenção das nanopartículas todas as particularidades de cada etapa devem ser levadas em consideração. Na circulação sanguínea as nanopartículas podem ser opsonizadas ou captadas pelo Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), extravasado

para tecidos normais ou ser depurado pelo fígado ou rins. O efeito EPR é uma das explicações e estratégias que podem levar a acumulação da nanopartícula no tumor. Após encontrar o tecido tumoral, as nanopartículas precisam sair do vaso sanguíneo do tumor e entrar no interstício. A Elevada Pressão Intersticial Tumoral (EPI) presente na maioria dos tumores ajuda a eliminar as forças responsáveis pelo extravasamento das nanopartículas do tumor. O extravasamento também é limitado devido a saturação no tumor. As nanopartículas que não atingiram o interstício do tumor são capazes de permanecer fora das fenestras bloqueando a saída de outras nanopartículas. A entrada das nanopartículas nas células tumorais pode ser dificultada pela presença da matriz extracelular, já que essas células possuem a matriz mais densa e reticulada, e por serem bem compactadas. A entrada da nanopartícula vai depender então do seu tamanho, do tamanho do diâmetro da malha da matriz celular, bem como das suas interações químicas. Após atingir o tecido tumoral, a nanopartícula deve entregar o encapsulado atravessando a membrana celular e então seguramente entregar o princípio ativo no sítio de ação, seja no citoplasma, núcleo celular ou outra organela (NICHOLS & BAE, 2012).

Existem diversos mecanismos possíveis que podem ocorrer durante a interiorização da nanopartícula na célula tumoral, sendo a endocitose o principal mecanismo. A endocitose é um processo biológico dependente de energia, que ocorre devido ao dinâmico rearranjo da membrana e do citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários). Fisiologicamente, isso é realizado pelas células para interiorizar nutrientes, realizar transdução de sinais, modular a composição da membrana plasmática, reciclar receptores de membrana e fazer o transporte através de células endoteliais (transcitose). No caso da interiorização das nanopartículas, esse processo vai depender do funcionamento coordenado dos lipídios e proteínas da membrana plasmática. As propriedades físico-químicas da nanopartícula (tamanho, composição química, carga, funcionalização da superfície, reatividade superficial, adsorção superficial, etc.) são aspectos que influenciam a via de interiorização. As vias de endocitose podem ser classificadas em fagocitose e pinocitose. A pinocitose é dividida em endocitose mediada por receptores ligados à clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose e endocitose clatrina-caveolina independentes (VERMA & STELLACCI, 2010; IVERSEN et al., 2011; FERREIRA et al., 2014).

Levando em consideração a ação conjunta dos efeitos acima descritos com as características pH-sensíveis do sistema (NE C16-DOX), supõe-se que o efeito terapêutico da DOX pode ser aumentado com redução dos efeitos colaterais.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O câncer tornou-se indiscutivelmente um problema de saúde pública mundial após dados apresentados no levantamento *World cancer report 2014* pela OMS. É esperado que nas próximas décadas o impacto do câncer na população seja de 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025. O câncer de mama será o mais frequente nas mulheres, correspondendo a 25,2% dos casos (INCA, 2016).

Atualmente, a quimioterapia apresenta limitações causadas pelos efeitos adversos e pela resistência das células tumorais aos tratamentos. A DOX é um dos mais potentes antineoplásicos e o mais utilizado atualmente tanto de forma isolada ou na poliquimioterapia, ou seja, em uso concomitante com outros quimioterápicos. Entretanto, a alta cardiotoxicidade e outros efeitos adversos limitam o seu uso na terapia do câncer. Por isso é necessário o desenvolvimento e obtenção de novas terapias que sejam capazes de circundar essas limitações.

A nanotecnologia é uma ciência que propõe a obtenção de nanossistemas capazes de manter a concentração plasmática constante do fármaco no nível terapêutico, eliminando as variações que geralmente são observadas no decorrer do tratamento com dose subterapêuticas ou efeitos tóxicos da substância ativa, reduzindo os efeitos adversos e a resistência das células tumorais. As nanoemulsões são nanossistemas de fácil preparação, escalonamento e biocompatíveis que possibilitam o encapsulamento de uma gama de princípios ativos, incluindo a DOX.

Como forma de potencializar o efeito terapêutico desse sistema, um novo sistema foi obtido neste trabalho (NE C16-DOX) utilizando o processo de latenciação de fármacos. A DOX foi conjugada a um ligante pH-sensível, inativando sua ação farmacológica fora do pH baixo. Outros sistemas já tem sido obtidos porém utilizando sistemas de maior complexidade, o que pode inviabilizar a translação para o uso clínico.

A hipótese deste trabalho é que nanoemulsões se acumulam no tumor em maior proporção do que outros sistemas, que não responsivos, devido conjuntamente ao efeito EPR e características físico-químicas do sistema, ocasionando maior efeito terapêutico com redução dos efeitos adversos devido a liberação do fármaco apenas em pH ácido.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Obter, caracterizar e avaliar a atividade citotóxica e antitumoral de um complexo pH-sensível conjugado a doxorubicina encapsulada em nanoemulsões (NE C16-DOX).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar as nanoemulsões contendo o pró-fármaco pH- sensível C16-DOX (NE C16-DOX);
- Avaliar os efeitos citotóxicos e vias de morte induzidos pela NE C16-DOX frente a linhagens tumorais, não-tumorais e resistentes a DOX;
- Analisar as vias de interiorização celular de nanoemulsões NE C16-DOX;
- Analisar o perfil de distribuição intracelular do fármaco encapsulado e livre;
- Determinar a máxima dose tolerada de NE C16-DOX por camundongos Balb/C;
- Avaliar a eficácia antitumoral da NE C16-DOX em modelo experimental *in vivo* com células 4T1 transplantadas em camundongos;
- Avaliar o perfil de biodistribuição em modelo experimental *in vivo* com células 4T1 transplantadas em camundongos após tratamento com a NE C16-DOX.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Materiais e reagentes

Os materiais e reagentes utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 3.

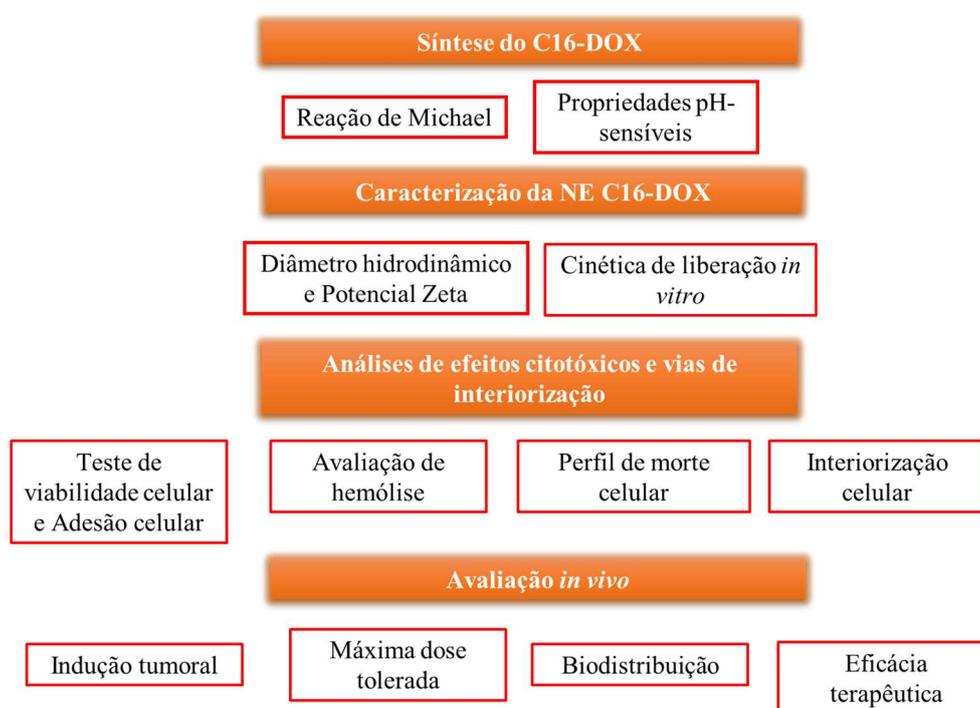
**Tabela 3:** Materiais e reagentes utilizados nos experimentos.

<b>Material/Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
1-hexadecanol	Sigma, EUA
3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo (MTT)	Invitrogen, EUA
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Co., USA
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	BD, EUA
Amilorida	Sigma, EUA
Anexina V	Invitrogen, EUA
Ázida sódica	Sigma, EUA
Azul de tripan	Sigma, EUA
Bicarbonato de Sódio	Sigma-Aldrich Co., USA
Citocalasina D	Sigma, EUA
Cloreto de sódio	J.T. Backer, BRA
Cloridrato de doxorubicina	Sigma, EUA
Criotubos	TPP, ALE
Cubeta de plástico	Labolan, ESP
DAPI	Sigma, EUA
Diclorometano	Sigma, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma, EUA
Estreptomina	Gibco, EUA
Éter etílico	Sigma, EUA
Formaldeído	Sigma, EUA
Frascos de Cultura	TPP, ALE
Isoflurano	Sigma, EUA
Isopropanol	Sigma, EUA
Ketamina	Agener União, BRA
Kolliphor® (Kolliphor® ELP)	Sigma-Aldrich Co., USA
Lamínula	Perfecta, BRA
Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	Invitrogen, EUA
Membranas de diálise	Spectrum Laboratories, EUA
Membranas de diálise (10 kDa)	Spectrum Labs, EUA
Metanol	Vetec, BRA
MTT	Invitrogen, EUA
Nistatina	Sigma, EUA
Óleo de Rícino (Castor oil)	Sigma-Aldrich Co., USA
Parafina	Vetec, BRA
Paraformaldeído	Vetec, BRA
Penicilina	Gibco, EUA
Placas de 96 poços	TPP, ALE
Placas de cultura de células	TPP, ALE

Soro fetal bovino	Gibco, EUA
Tampão de ligação (0,1M de HEPES; 1,4M de NaCl e 25 mM de CaCl <sub>2</sub> )	Sigma, EUA
Tampão fosfato salino (PBS)	Laborclin, BRA
Tripsina	Gibco, EUA
Tubos Falcon de 15 e 50 mL	TPP, ALE
Xilazina	Agener União, BRA

## 4.2 Delineamento experimental

O presente estudo seguiu o delineamento experimental ilustrado na Figura 10. Foi desenvolvido em três etapas: i) Caracterização e avaliação das propriedades pH-sensíveis da NE C16-DOX; ii) Avaliação citotóxica e vias de interiorização da NE C16-DOX e iii) Avaliação *in vivo*.



**Figura 10:** Delineamento experimental esquematizando a metodologia utilizada nas etapas de caracterização e avaliação das propriedades pH-sensíveis; avaliações *in vitro* e avaliações *in vivo* após tratamento com a nanoemulsão neste estudo.

## 4.3 C16-DOX

### 4.3.1 Síntese do C16-DOX

A versão lipídica do pró-fármaco DOXO-EMCH (doxorubicina com ligante pH-sensível) foi sintetizada com a adição de solução de 1-hexadecanol (49,3 mg/91 mmol)

em diclorometano (3 mL) a solução de DOXO-EMCH (30 mg/38 mmol) em metanol (3 mL). A mistura foi mantida sob agitação por 2 horas. O tiol contendo a extremidade alquila reagiu rapidamente com a 2-pirrolidona da DOXO-EMCH através da reação de Michael. A progressão da reação foi monitorada por cromatografia em camada fina. Após finalizada, a mistura foi precipitada com éter etílico gelado. O produto foi lavado três vezes com o mesmo solvente, isolado por centrifugação e depois utilizado sem purificação adicional após secagem a vácuo. O pró-fármaco foi caracterizado por espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de  $^1\text{H}$  utilizando o Jeol ECX-400 (IET, EUA) e Espectrometria de Massa de Alta Resolução utilizando Agilent 6210 ESI-TOF (Agilent Technologies, EUA) para análise dos sinais da DOXO-EMCH e do 1-hexadecanol utilizado na reação.

#### 4.3.2 Avaliação das propriedades pH-sensíveis do pró-fármaco C16-DOX

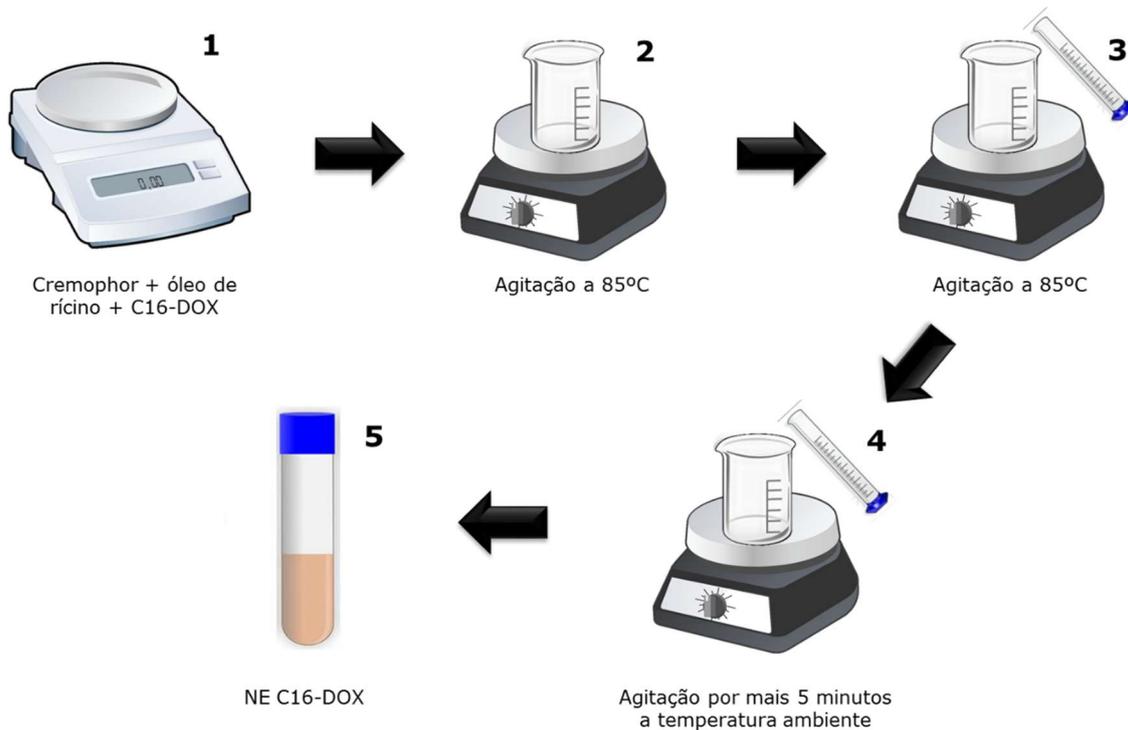
Foram feitos testes para se confirmar as propriedades pH-sensíveis do pró-fármaco. Na primeira etapa, o pró-fármaco C16-DOX insolúvel em água foi disperso em PBS pH 7,4 a 25°C. Após o tempo de 1 minuto, foi adicionado tampão fosfato pH 3 até que o pH se tornasse ácido. A fluorescência da DOX (excitação: 488 nm/ emissão: 588 nm) foi mensurada por meio do equipamento de imageamento Lumina (IVIS Spectrum, Caliper, EUA). Os dados de fluorescência foram coletados ao longo do tempo em RFU (unidade de fluorescência relativa).

### 4.4 NE C16-DOX

#### 4.4.1 Obtenção da NE C16-DOX

A nanoemulsão foi obtida de acordo com o método de autoemulsificação (MUEHLMAN et al., 2015). Na etapa 1, foram pesados 480 mg da mistura Cremophor + óleo de ricino (fase oleosa) na proporção 3:1 (m/m) em um béquer. Esta proporção foi otimizada após diferentes variações de cada constituinte visando obter monodispersão e diâmetro hidrodinâmico inferior a 50 nm. Em seguida, foi pesado 2, 4 ou 6 mg do conjugado C16-DOX e então adicionado ao béquer anterior. Na etapa 2, o béquer foi mantido sob agitação a temperatura de 85 °C em agitador magnético até que todos os constituintes se tornassem miscíveis. Na etapa 3, foi adicionado 2,5 mL de PBS 0,1M pH

7,4 sendo mantido sob agitação até solubilização da fase oleosa. Em seguida, na etapa 4, foram adicionados mais 2,5 mL de PBS gelado e então o béquer foi mantido sob agitação a temperatura ambiente em agitador magnético por cinco minutos (Figura 11). A nanoemulsão branca foi formulada da mesma forma porém sem adição do conjugado a fase oleosa.



**Figura 11:** Esquema do passo a passo da formulação da nanoemulsão NE C16-DOX. Em (1) a fase oleosa foi pesada juntamente com o pró-fármaco; foi mantida sob agitação a 85°C (2) por alguns minutos e então foi adicionado 2,5 mL de PBS até que os compostos fossem solubilizados (3). Foi adicionado então mais 2,5 mL de PBS e o béquer foi transferido para agitador sob temperatura ambiente (4). A nanoemulsão foi armazenada protegida da luz (5). Fonte: Mind the graph.

A nanoemulsão obtida teve concentração final de 0,4 ou 0,8 ou 1,2 mg/mL de C16-DOX sendo reprodutível por ao menos trinta vezes. Para os testes *in vitro* utilizando células e testes *in vivo* em camundongos, a nanoemulsão foi filtrada utilizando-se filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  com a finalidade de esterilização eliminando possíveis bactérias e fungos.

#### 4.4.2 Quantificação da DOX na NE C16-DOX

A DOX presente na NE C16-DOX foi quantificada utilizando a absorvância pelo método de espectrofotometria (SpectraMax M2®, Molecular Devices, EUA). Previamente, uma solução estoque de DOX foi preparada a 1 mg/mL em água ultrapura para obtenção da curva de calibração. A partir da solução estoque, diluições (80; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 0,125 µg/mL) foram feitas com o fármaco livre e com a nanoemulsão em estudo. Os dados foram coletados no comprimento de onda de 580 nm em triplicata em placas de 96 poços. Uma regressão linear foi obtida para determinar a quantidade de DOX presente na formulação.

#### 4.4.3 Caracterização da NE C16-DOX

##### 4.4.3.1 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico, o potencial zeta e o índice de polidispersão da nanoemulsão foram mensurados por espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforética utilizando-se o Zetasizer Nano (ZS90, Malvern®, EUA). As amostras foram diluídas em água nanopura, na concentração final de 5% (v/v). Foram feitas três leituras a uma temperatura de 25°C com um ângulo de detecção fixado em 90°. Foram utilizadas as médias entre as leituras por distribuição numérica ou por intensidade de dispersão.

#### 4.4.4 Análise de perfil de liberação da NE C16-DOX

O perfil de liberação cinética foi determinado com a NE C16-DOX em soluções de diferentes pHs (7,4 e 4). Foram utilizadas membranas de diálise de celulose com *cut off* de 10 kDa e diâmetro de 20,4 nm, ambas previamente hidratadas conforme indicação do fabricante. Um mL da NE C16-DOX foi adicionada a cada um dos dois sistemas de diálise e as membranas submersas em 7 mL de meio receptor, tampão fosfato 0,1M pH 7,4 ou tampão de ácido acético 0,1M pH 4. Os sistemas ficaram sob agitação contínua em agitador magnético. Aliquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, com reposição sequencial do meio receptor no mesmo volume. As amostras foram mantidas congeladas a -4°C até o fim do experimento. A absorvância da DOX foi quantificada por espectrofotometria (Tecan Infinite M200 Pro™, Suíça) no

comprimento de onda de 580 nm e a concentração do fármaco das amostradas foi calculada utilizando a curva de calibração da DOX.

Como método complementar a diálise, a liberação da DOX foi avaliada utilizando centrifugação (14.000 g por 20 minutos a 10 °C) da NE C16-DOX em tubos de filtração centrífuga (Amicon®, EUA). Os tubos utilizados possuíam membrana de filtração com cut off de 10 kDa, permitindo a separação do fármaco livre. A NE C16-DOX foi incubada em diferentes condições de pH (7,4 e 2) por 6 horas e então as amostras foram centrifugadas. A fluorescência (excitação: 488 nm/ emissão: 588 nm) do fármaco liberado nos tubos foi determinado por meio do imageamento no Lumina® (IVIS Spectrum, Caliper, USA) em RFU.

#### 4.5 Avaliações *in vitro*

##### 4.5.1 Cultivo celular

Células tumorais de adenocarcinoma mamário murino (4T1) foram cedidas pela Profa. Dra. Suzanne Ostrand-Rosenberg da University of Maryland Baltimore County, EUA. Fibroblastos não-tumorais isolados de pele (NIH-3T3) foram adquiridas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC) do Estados Unidos. As células 4T1 e NIH-3T3 foram mantidas como monocamadas em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dubelcco) suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v:v) de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) (Invitrogen, EUA). Células tumorais de colo de útero (HeLa) e células HeLa resistentes a DOX (KB-V1) foram adquiridas do banco de células ATCC. As células HeLa foram mantidas como monocamadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e 1% de aminoácidos não-essenciais (NEAA). As células KB-V1 foram mantidas também em monocamadas em meio DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). As células KB-V1 foram cultivadas na presença de 1µM (concentração final) de DOX para manter a resistência (tabela 4).

As garrafas foram incubadas em estufas a 37 °C e atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Para os experimentos, as células foram expandidas em garrafas de cultivo

de plástico (TPP® Techno Plastic Products, Suíça) de 25 cm<sup>2</sup> e usadas após atingir a fase exponencial de crescimento.

**Tabela 4:** Linhagens e manutenção das células utilizadas.

<b>Linhagem celular</b>	<b>Descrição</b>	<b>Manutenção</b>
<b>4T1</b>	Adenocarcinoma mamário murino	DMEM 10% (SFB) 1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina)
<b>HeLa</b>	Carcinoma cervical	RPMI 10% (SFB) 1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina) 1% NEAA
<b>KB-V1</b>	Carcinoma cervical resistente a multidrogas	DMEM 15% (SFB) 1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina)
<b>NIH-3T3</b>	Fibroblastos não-tumorais de derme	DMEM 10% (SFB) 1% de antibiótico (penicilina + estreptomicina)

#### 4.5.2 Ensaios de citotoxicidade

Os efeitos no crescimento celular foram determinados primeiramente pelo ensaio de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) como descrito previamente (MOSMANN, 1983). O intuito foi determinar duas concentrações da formulação que induzisse perda da viabilidade para posteriormente serem analisadas pela técnica de RTCA (Análise Celular em Tempo Real). As células foram semeadas em placas de 96 poços e após atingirem o estágio de confluência, as células foram tratadas com NE C16-DOX, NE Branco ou DOX livre. Os parâmetros de concentração celular, concentração do fármaco e tempo de incubação variaram nos diferentes tipos celulares

devido as diferentes formas de interação célula-fármaco (tabela 5). Os valores de concentração do fármaco e de tempo de incubação foram definidos após experimentos em triplicata utilizando diferentes valores (dados não mostrados). Transcorridas as 24h, o tratamento foi removido e substituído por meio de cultivo para recuperação das células durante 24h em estufa a 37 °C e atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e então adicionado 15 µL de solução de MTT (5 mg/mL em PBS) e 135 µL de meio completo em cada poço e a placa foi novamente incubada por 3 horas a 37°C e atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante foi removido e foi adicionado 100 µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan e imediatamente após, foi realizada a leitura de absorbância em 595 nm em espectrofotômetro (SpectraMax M2® Molecular Devices, EUA). A viabilidade foi determinada usando células não-tratadas com a nanoemulsão como controle.

**Tabela 5:** Linhagens celulares, concentração de plaqueamento celular, tempo de incubação e concentração de tratamento.

Linhagem celular	[ ] células/mL	Tempo de incubação	[ ] µg/mL
4T1	2,5 x 10 <sup>4</sup>	2 horas	6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100
HeLa	1 x 10 <sup>4</sup>	30 minutos	10 / 50 / 100
KB-V1	1 x 10 <sup>5</sup>	30 minutos	10 / 50 / 100
NIH-3T3	4 x 10 <sup>4</sup>	2 horas	6,25 / 12,5 / 25 / 50 / 100

A análise celular em tempo real foi realizada utilizando o aparelho RTCA (Roche, Suíça). Através do sistema xCelligence, o aparelho monitora em tempo real a proliferação celular e viabilidade em tempo pré-determinados. Foram semeadas 1 x 10<sup>4</sup> células 4T1, HeLa e KB-V1 por poço em microplaca contendo microeletrodos não invasivos de ouro. Após o tempo de aderência das células na placa, 18-24h, foi realizado o tratamento com NE C16-DOX nas mesmas concentrações utilizadas no teste de MTT. As células foram monitoradas por aproximadamente 72 horas.

#### 4.5.2.1 Avaliação de indução de hemólise

A capacidade hemolítica da NE C16-DOX foi analisada *in vitro* utilizando hemácias de camundongo BALB/c. Foi analisado também a capacidade da nanoemulsão branca (sem o pró-fármaco) em causar hemólise.

O sangue total foi centrifugado a 1000 g por 5 minutos a 10 °C, e em seguida, o *pellet* foi ressuspenso com 10 mL de solução salina (NaCl 150mM). As amostras foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente e então novamente centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos a 10°C. O controle positivo foi ressuspenso em água destilada e o controle negativo em NaCl 150mM. O sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada na leitora de microplacas (Spectramax M2, Molecular Devices, EUA) na absorvância da hemoglobina liberada na lise no comprimento de onda a 540 nm.

#### 4.5.4 Análise de mecanismo de morte celular

A fostatidilserina é externalizada durante o processo de apoptose. Anexina V é uma proteína fluorescente com alta afinidade e especificidade por este fosfolípido que é utilizada para marcação de vias de apoptose. Para analisar a perda da integridade da membrana celular, o que corresponde ao sinal de necrose, foi utilizado o fluoróforo 7-AAD (alta fluorescência no comprimento de onda 650 nm), fluoróforo que não sobrepõe a fluorescência da DOX. Células marcadas com FITC-anexina exibem alta fluorescência no comprimento de onda 515-530 nm (ZHIVOTOVSKY et al., 1999) Para este experimento as células foram tratadas por 2h sem recuperação com NE C16-DOX em duas concentrações (50 e 100 µg/mL). Como controle negativo foram utilizadas células sem tratamento com e sem marcação. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS, incubadas com 100µL de tampão de ligação e então marcadas com 5 µL de anexina-V e 10 µL de 7-AAD a temperatura ambiente protegidos da luz. As amostras foram então analisadas no citômetro (FACSVerse, BD, EUA) onde 10.000 eventos foram adquiridos. A análise dos dados foi feita utilizando o *software* FlowJo® vX 0.7 (FlowJo LLC, EUA).

#### 4.5.5 Análise de interiorização

A interiorização foi analisada pela quantificação de DOX utilizando a linhagem celular 4T1. Células foram semeadas em concentração de  $1 \times 10^5$  cels/poço em placas de

cultivo de 12 poços. Após atingirem estágio de confluência, células foram incubadas em diferentes tempos (15, 30, 60 e 120 minutos) com 100 µg/mL de concentração equivalente de NE C16-DOX e de DOX livre. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, EUA) onde a fluorescência da DOX foi detectada utilizando excitação de 488 e emissão de 590 nm. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e posteriormente analisados utilizando o *software* FlowJo® Vx 0.7.

#### 4.5.6 Mecanismo de endocitose

Células foram semeadas em concentração de  $1 \times 10^5$  cels/poço em placas de cultivo de 12 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas por 30 minutos com os seguintes inibidores de vias de endocitose: 1 mM citocalasina D (macropinocitose), 1 M azida sódica (vias dependente de ATP), 1 mg/mL nistatina (mediadas por cavéolas) e 1 mM amilorida (macropinocitose). O objetivo deste experimento foi analisar qual a via de endocitose responsável pela internalização da NE C16-DOX pelas células. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas durante 2 horas com 100 µg/mL de NE C16-DOX e então analisadas em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, EUA) onde a DOX foi detectada utilizando excitação de 488 e emissão de 590 nm. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e posteriormente analisados utilizando o *software* FlowJo® Vx 0.7.

#### 4.5.7 Análise de localização sub-celular da DOX por microscopia confocal

Foram utilizadas as linhagens celulares HeLa e KB-V1 para identificação sub-celular da DOX. Foram semeadas  $1 \times 10^5$  células em placas de cultivo de 12 poços contendo lamínulas redondas estéreis de 18 mm de diâmetro. Após 24 horas, as células foram expostas ao tratamento por 1 hora com concentrações equivalente de 100 µg/mL de NE C16-DOX ou DOX livre. As células foram incubadas nas condições de 37 °C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> umidificada. Após o tempo de incubação, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas 3x com 1 mL de PBS 1x. As células foram fixadas com 10 % de FNT (formalina neutra tamponada - 37% formaldeído 1:10 em PBS) por 20 minutos a temperatura ambiente. O fixador foi removido e as células lavadas 3x PBS. Para marcação de núcleo, as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com 1 µg/mL de DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Sigma, EUA). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas 3x com PBS, as lamínulas foram retiradas com

auxílio de uma pinça e montadas na lâmina.

As imagens foram capturadas com o microscópio confocal de varredura a laser TSC SP5 (Leica, Alemanha) com objetiva de 100x. A fluorescência da DOX e dos marcadores foram obtidas nas condições descritas na tabela 6. Os parâmetros foram definidos no início da sessão de imagens e não mais alterados. As imagens foram analisadas utilizando o programa *ImageJ* (NIH, EUA) para o processamento das imagens.

**Tabela 6:** Faixas espectrais ajustadas para detecção da emissão de fluorescências da DOX e marcadores (fluoróforos).

	Excitação	Emissão
DOX	488	590
DAPI	358	461

#### 4.5.8 Análise de localização sub-celular da DOX por microscopia de fluorescência

Células 4T1 foram semeadas na concentração  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de cultivo de 12 poços contendo lamínulas redondas estéreis de 18 mm de diâmetro. Após 24 horas, as células foram expostas ao tratamento por diferentes tempos (15, 60 e 120 minutos) com concentrações equivalente de 100  $\mu\text{g/mL}$  de NE C16-DOX ou DOX livre. As células foram incubadas nas condições de 37 °C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> umidificada. Após o tempo de incubação, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas 2x com PBS e fixadas com 4% paraformaldeído por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas 2x com PBS e marcadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  de DAPI por 30 minutos a temperatura ambiente. O grupo controle representa o grupo não tratado. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas 3x com PBS, as lamínulas foram retiradas com auxílio de uma pinça e montadas na lâmina.

As imagens foram capturadas com o microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Alemanha) e os parâmetros foram definidos e não mais alterados. As imagens foram analisadas utilizando o programa *ImageJ* (NIH, EUA). A DOX foi quantificada por fluorescência (excitação: 488 nm/ emissão: 590 nm) medindo o núcleo de 10 células. Para cada célula, a fluorescência vermelha foi medida pelo menos em 5 pontos diferentes.

#### 4.6 Avaliações *in vivo*

##### 4.6.1 Manutenção dos animais

Os animais utilizados nesse estudo foram camundongos fêmeas da linhagem BALB/c obtidos do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN – CNEN/SP). Os animais possuíam aproximadamente 8 semanas de idade e pesavam entre 25 e 30 gramas. A manutenção dos animais foi feita em condições adequadas de temperatura ( $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ), umidade ( $50\% \pm 10\%$ ) e ciclo circadiano automatizado (12 horas de ciclos claros/escuros) e filtragem de ar individual no Biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, GEM-IB-UNB. Durante toda a quarentena e experimento, os animais foram mantidos em caixas plásticas separados nos devidos grupos em estudo, com dieta com ração comercial e água filtrada *ad libitum*.

Os procedimentos experimentais utilizados nesse estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDoc nº 142293/2014 (anexo I).

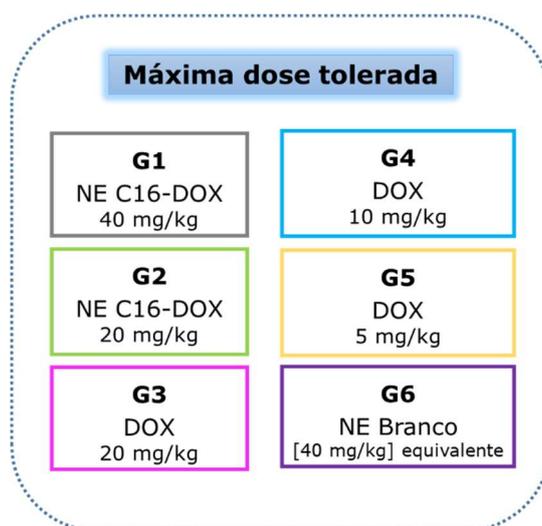
##### 4.6.2 Indução do tumor

Os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com 100 µL de solução de cloridrato de cetamina (União Química Farmacêutica Nacional S/A., Brasil) e cloridrato de xilazina 2% (Syntec do Brasil, Ltda., Brasil) (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). Em seguida, foi realizada tricotomização dos pelos do flanco direito. Os camundongos receberam injeção subcutânea utilizando seringas de insulina com capacidade de 0,3 mL (8 mm x 0,3 mm) de células 4T1 na concentração de  $4 \times 10^5$  células/mL no volume de 50 µL em meio de cultivo sem soro fetal bovino. O controle negativo não recebeu injeção de células.

##### 4.6.3 Máxima dose tolerada (MDT)

Para avaliar a máxima dose tolerada, 24 camundongos BALB/c fêmeas saudáveis foram randomicamente distribuídos em 6 grupos experimentais (n=4) (Figura 12). O grupo controle (n=4) não recebeu nenhum tratamento. Os animais tratados com DOX

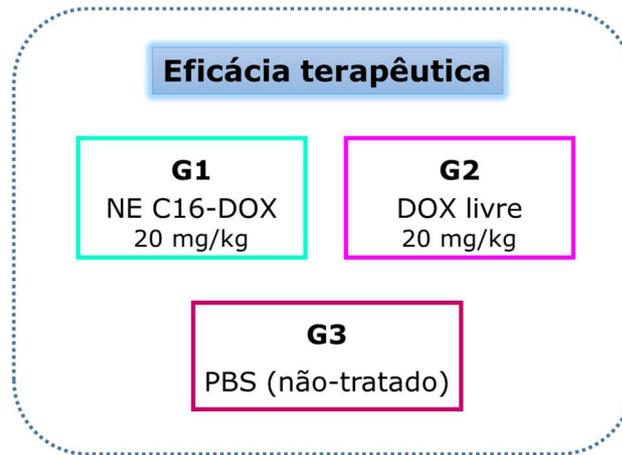
livre ou NE C16-DOX receberam doses com concentração de DOX equivalentes. Os grupos experimentais receberam injeção de 500  $\mu$ L com o tratamento por via intraperitoneal 1x por dia durante 5 dias. A via intraperitoneal foi escolhida devido ao volume de tratamento. Os animais foram pesados e observados clinicamente diariamente após as injeções. No dia 14, todos os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico.



**Figura 12:** Delineamento experimental da máxima dose tolerada dosagem/grupo experimental.

#### 4.6.4 Eficácia terapêutica

Quinze dias após indução do tumor como descrito acima, os animais foram divididos em 3 grupos experimentais (n=4) (Figura 13). Os grupos experimentais foram tratados com 1 injeção de 500  $\mu$ L por via intraperitoneal diariamente durante 5 dias consecutivos. O volume tumoral dos animais foram medidos todos os dias durante todo o período de tratamento experimental (5 dias) e 15 dias após o término do tratamento. A taxa de sobrevivência também foi avaliada. Os órgãos (fígado, baço e pulmão) foram coletados para análise *ex vivo* dos aspectos macroscópicos e do peso absoluto (n=2).



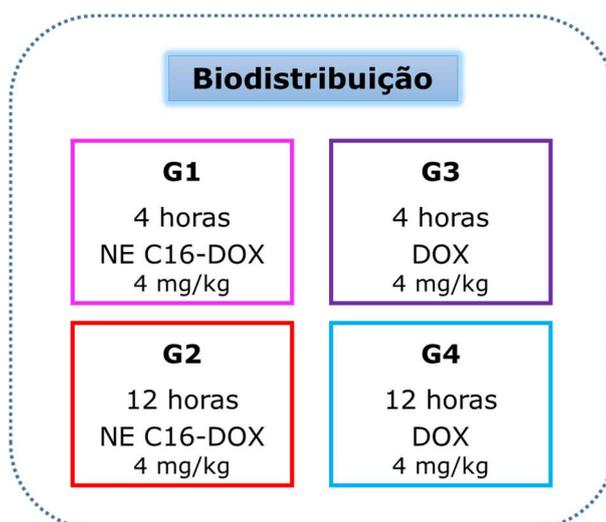
**Figura 13:** Delineamento experimental da eficácia terapêutica dosagem/grupo experimental.

O cálculo do volume tumoral (JIANG et al., 2013) foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\frac{\text{Menor diâmetro} \times \text{Menor diâmetro} \times \text{Maior diâmetro}}{2}$$

#### 4.6.5 Biodistribuição

Camundongos fêmeas BALB/c (8 semanas de idade) foram anestesiados e receberam injeção de células 4T1 na concentração de  $4 \times 10^4$  células/mL no volume de 50  $\mu$ L em meio de cultivo sem soro fetal bovino no flanco esquerdo. Após 14 dias, cada grupo experimental (n=3) recebeu 1 única dose de 500  $\mu$ L de cada tratamento por via intraperitoneal (Figura 13).



**Figura 14:** Delineamento experimental da biodistribuição dosagem/grupo experimental.

A fluorescência qualitativa da DOX (excitação: 488 nm / Emissão: 590 nm) dos órgãos foi observada através do Lumina® (IVIS Spectrum, Caliper, USA).

Após o tempo de tratamento, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico e os órgãos (coração, fígado, baço, pulmão e rins) e tumor foram coletados. Para quantificar a fluorescência, os órgãos e o tumor coletados foram processados para a extração da molécula DOX. Os tecidos foram macerados com a adição da solução de isopropanol acidificada (ácido clorídrico 0,075 N em isopropanol a 90%) até a obtenção do homogeneizado. Após a homogeneização, os tecidos foram transferidos para um microtubo protegido da luz e incubado *overnight* na câmara fria a 4 °C para a extração com isopropanol acidificado. Posteriormente os microtubos foram centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então transferido para um placa preta de 96 poços e a fluorescência da DOX (excitação: 488 nm / Emissão: 590 nm) foi medida por espectrofluorimetria (Bio-Rad, Hercules, CA).

Os dados obtidos foram padronizados levando em consideração o sinal obtido pelo espectrofotômetro, peso individual de cada órgão e a quantidade utilizada de isopropanol ácido para a extração de forma proporcional.

#### 4.7 Análises estatísticas

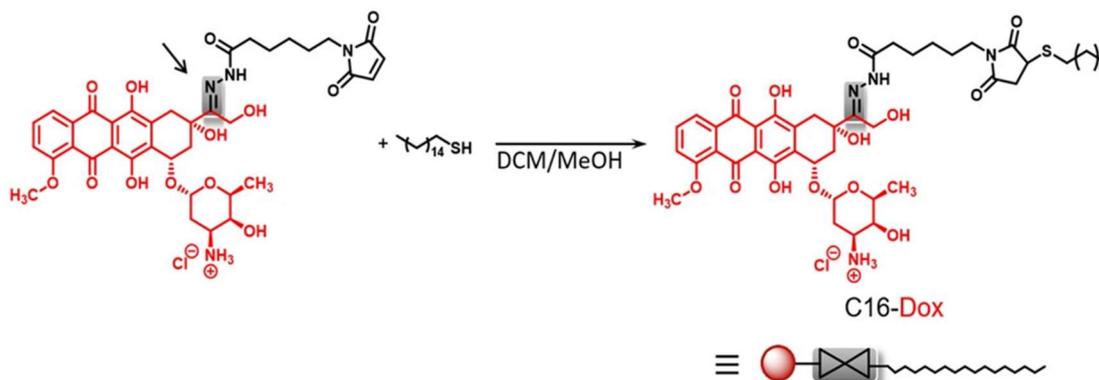
Os resultados foram analisados no software GraphPad Prisma® 6.0 e foram submetidos a testes estatísticos específicos com confiança estatística de 95% ( $p < 0,05$ ).

Diferenças estatísticas foram avaliadas pelos testes ANOVA, de uma ou de duas vias, aplicando pós-testes de múltiplas comparações de Tukey's. Os resultados quantitativos foram descritos como média  $\pm$  erro padrão.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Síntese e caracterização do pró-fármaco C16-DOX

O pró-fármaco C16-DOX foi sintetizado utilizando a DOX-EMCH que reagiu prontamente com o 1-hexadecanol através da reação de Michael (Figura 15).

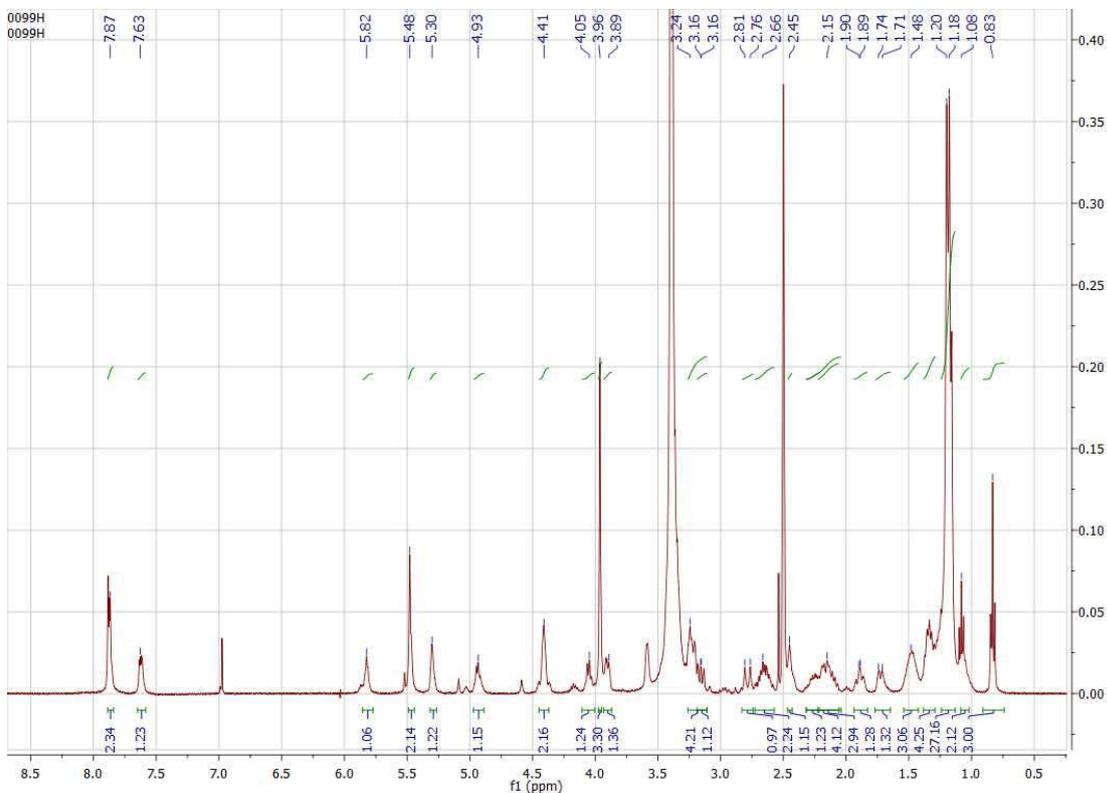


**Figura 15:** Síntese e estrutura do pró-fármaco C16-DOX a partir da DOX-EMCH através da reação de Michael.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos a 400 MHz. Os deslocamentos químicos para os RMN de  $^1\text{H}$  são referenciados utilizando o pico residual do solvente. As análises foram realizadas em solução de DMSO a 2,5 ppm a 25°C. Todos os deslocamentos químicos estão em ppm ( $\delta$ ). Os dados são apresentados na sequência: deslocamento químico; multiplicidade (s = singlete, d = dublete, dd = dublete de dubletes, t = triplete, qua = quadrublete, qu = quintete, m = multiplete, sext = sextete) e constante de acoplamento (em Hertz).

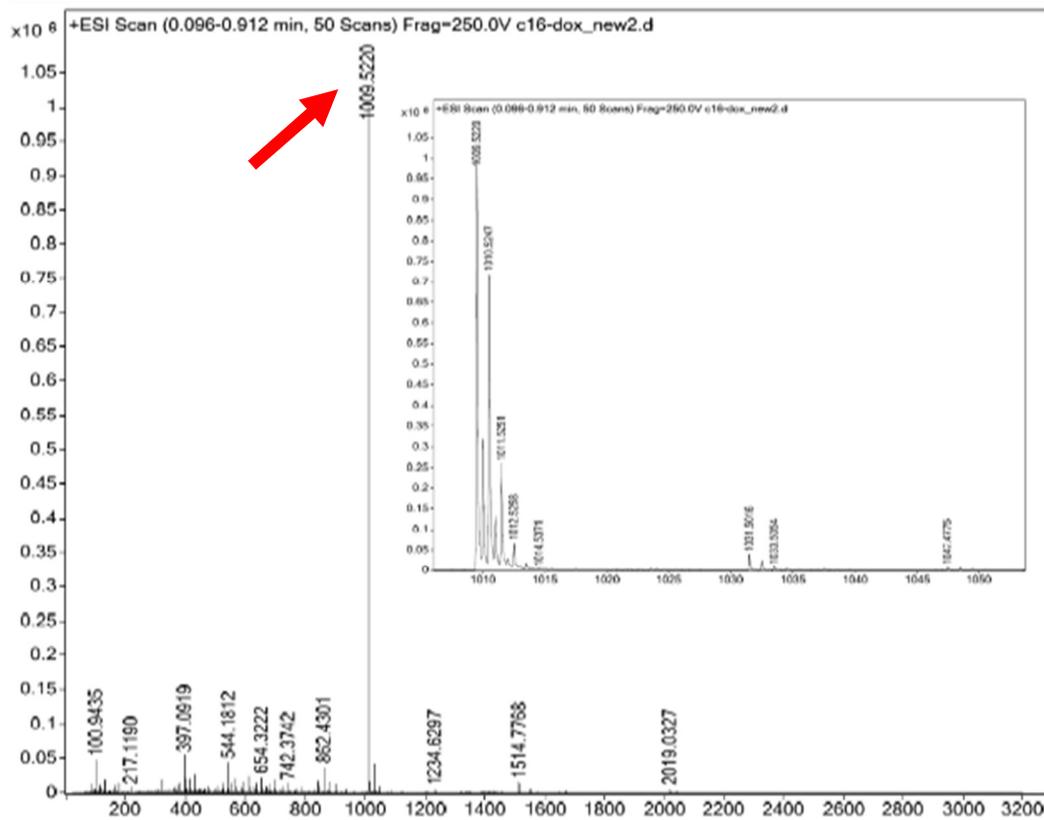
RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO):  $\delta = 7.92 - 7.83$  (m, 2H), 7.62 (dd,  $J = 6.3, 3.1$  Hz, 1H), 5.82 (t,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.94 (q,  $J = 7.2, 6.6$  Hz, 1H), 4.41 (t,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 4.05 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.90 (ddd,  $J = 8.9, 3.8, 2.2$  Hz, 1H), 3.28 – 3.19 (m, 3H), 3.22 – 3.10 (m, 1H), 2.79 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H), 2.73 – 2.57 (m, 2H), 2.45 (t,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 2.33 – 2.21 (m, 1H), 2.21 – 2.06 (m, 2H), 1.89 (dd,  $J = 13.9, 10.1$  Hz, 1H), 1.73 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 1.55 – 1.41 (m, 3H), 1.39 – 1.26 (m, 4H), 1.23 – 1.12 (m, 27H), 1.08 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 0.83 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H).

No espectro mostrado na Figura 15, cada pico corresponde a um sinal e cada sinal corresponde a um próton ( $^1\text{H}$ ) diferente do composto. O pró-fármaco caracterizado mostrou sinal característico da DOXO-EMCH assim como sinais da introdução da cadeia 1-hexadecanol em 1.12 – 1.23 ppm.



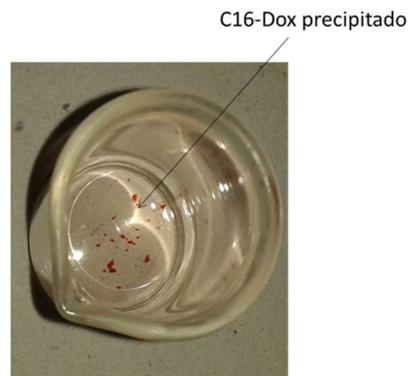
**Figura 16:** Espectro da massa e estrutura da C16-DOX utilizando ressonância magnética nuclear de prótons (RMN).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica em que moléculas em uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa, que são subsequentemente separados no espectrômetro de massa de acordo com sua razão massa ( $m$ ) sobre a carga ( $z$ ),  $m/z$ . A Espectrometria de Massa de Alta Resolução (ESI-TOF) encontrou os seguintes dados:  $m/z$  previamente calculado para ( $[M+H^+]$ ): 1009.5279;  $m/z$  encontrado: 1009.5220 (pico mostrado na figura). O pró-fármaco confirmado por ESI-TOF mostrou que a massa encontrada está em boa conformidade com a massa teórica calculada previamente de 1009.5279 (Figura 17).

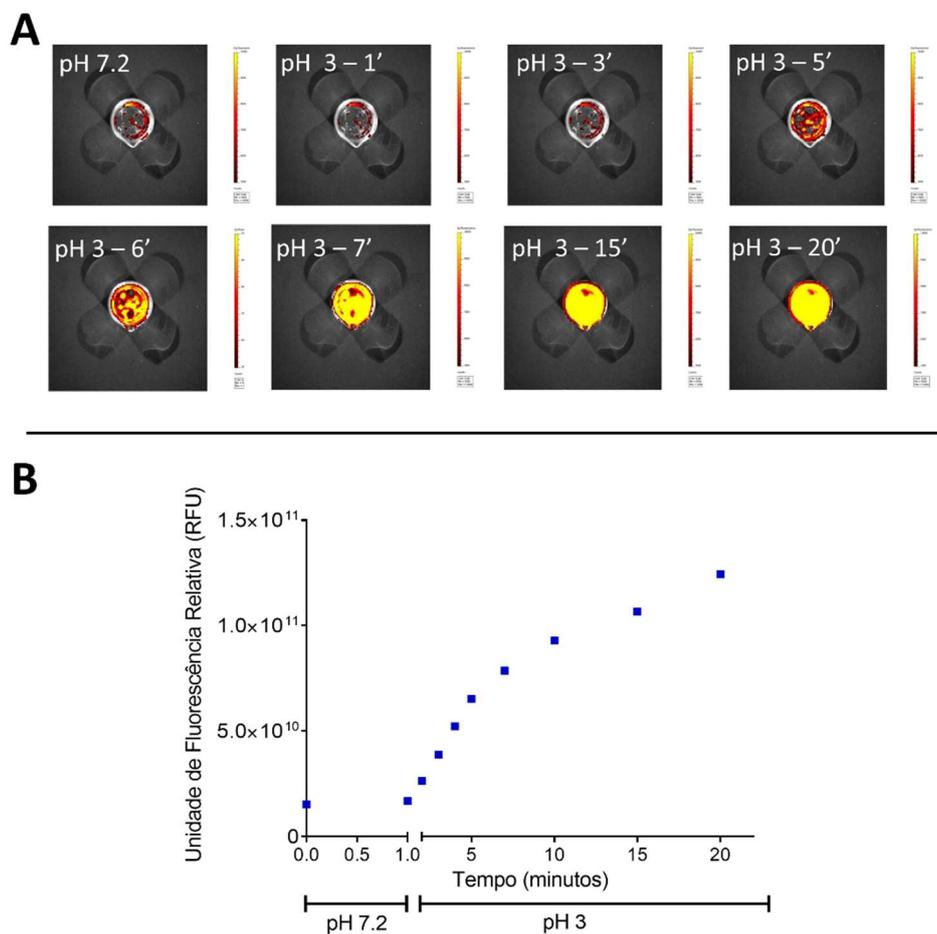


**Figura 17:** Espectrometria de massa do pró-fármaco C16-DOX.

C16-DOX se apresenta na forma de precipitados sendo insolúvel em solventes aquosos em pH neutro (Figura 18). A responsividade do pró-fármaco a ambientes ácidos foi confirmada de forma experimental por meio da solubilização do C16-DOX em pH ácido. Para isso, C16-DOX foi disperso em PBS (pH 7,2) e a fluorescência da DOX foi mensurada (Ex.: 488 nm/Em.: 590 nm). Após reduzir o pH para 3, foi observado significativo aumento da intensidade de fluorescência da DOX com o passar do tempo, indicando clivagem da ligação hidrazona e consequentemente liberação do fármaco para o meio. As mensurações de fluorescência foram feitas de forma qualitativa (Figura 19A) e quantitativa (19B).



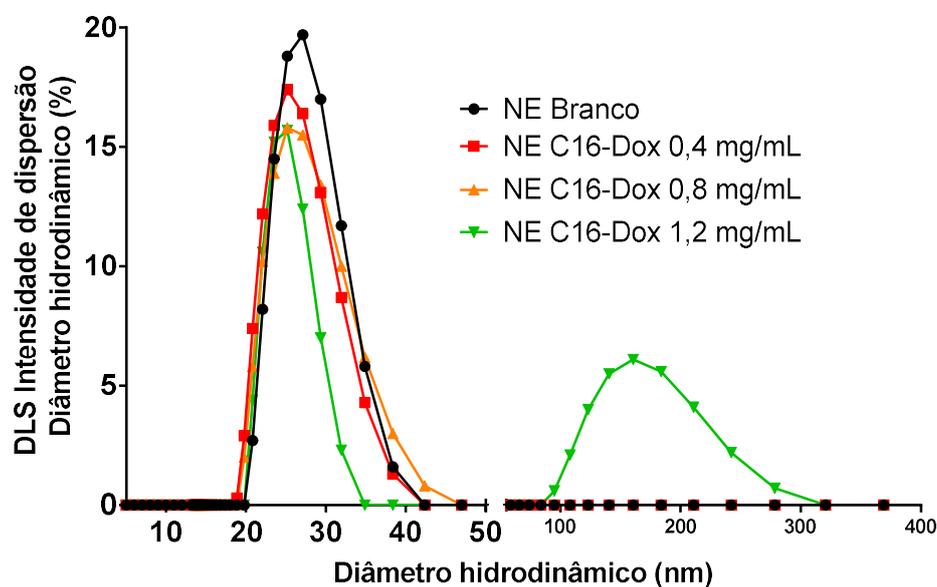
**Figura 17:** Aparência macroscópica do C16-DOX em ambiente neutro.



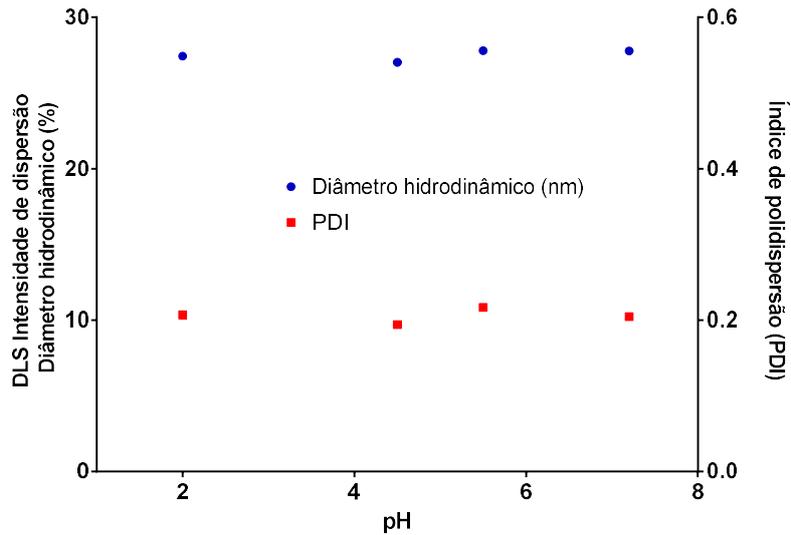
**Figura 19:** Responsividade a pH do C16-DOX. As imagens mostram a liberação da DOX do pró-fármaco após redução do pH: a) representação qualitativa da intensidade de fluorescência ao longo do tempo em pH 7,2 e 3; b) representação gráfica da análise quantitativa em RFU ao longo do tempo.

## 5.2 Obtenção e caracterização da NE C16-DOX

As nanoemulsões foram obtidas com diferentes concentrações finais de C16-DOX: 0,4; 0,8 e 1,2 mg/mL. O diâmetro hidrodinâmico foi avaliado em distribuição por intensidade com o objetivo de analisar todas as populações presentes na formulação. As duas primeiras concentrações (0,4 e 0,8 mg/mL) apresentaram uma única população de nanopartículas com diâmetro hidrodinâmico entre 25 a 30 nm, com uma distribuição de tamanho de partícula estreita. As nanoemulsões obtidas com 1,2 mg/mL apresentaram pelo menos duas populações distintas, com picos em 25 e 160 nm, indicando coalescência das gotículas de óleo (Figura 20). Após 48 horas as NE C16-DOX com 1,2 mg/mL, macroscopicamente, apresentaram separação de fases. A NE com concentração mais alta e sem separação de fase (0,8 mg/mL) foi utilizada nos estudos seguintes. A NE sem C16-DOX, apenas com os constituintes, também foi analisada quanto ao diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão. O diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão também foram estudados em diferentes condições de pH, tendo em vista que a NE foi projetada para liberar a DOX sob condições ácidas. As medições garantem que as NE são estáveis ao longo do intervalo de pH testado de 2 a 7,4 (Figura 21).

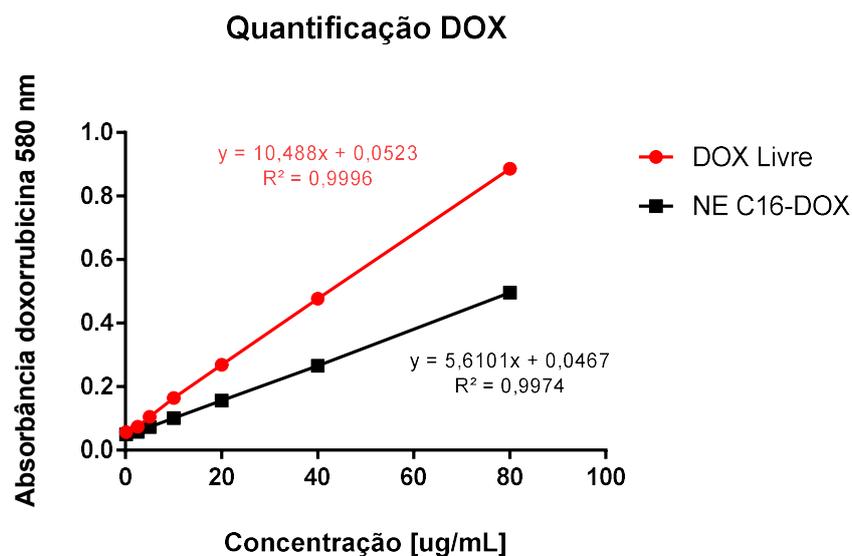


**Figura 20:** Diâmetro hidrodinâmico por intensidade de dispersão das NEs obtidas sem e com diferentes concentrações de C16-DOX (0,4; 0,8 e 1,2 mg/mL).



**Figura 21:** Diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão da NE C16-DOX (0,8 mg/mL) sob diferentes condições de pH.

A massa molecular total do pró-fármaco é calculada pela soma das massas atômicas das moléculas de DOXO-EMCH com a massa da cadeia carbônica. Teoricamente, a massa de DOX utilizada durante a síntese correspondia a 54% do pró-fármaco. A quantidade teórica de DOX presente na NE C16-DOX foi confirmada experimentalmente por medições UV/Vis e uma correlação espectrofotométrica entre C16-DOX (mg/mL em dispersão NE) e DOX livre (mg/mL em PBS) (Figura 21).



**Figura 22:** Quantificação da DOX através de absorbância na NE C16-DOX por espectrofotometria. As duas amostras foram diluídas em 0,125; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80

$\mu\text{g/mL}$  a partir de uma solução estoque de  $1 \text{ mg/mL}$  e uma regressão linear foi obtida a partir das absorvâncias da DOX.

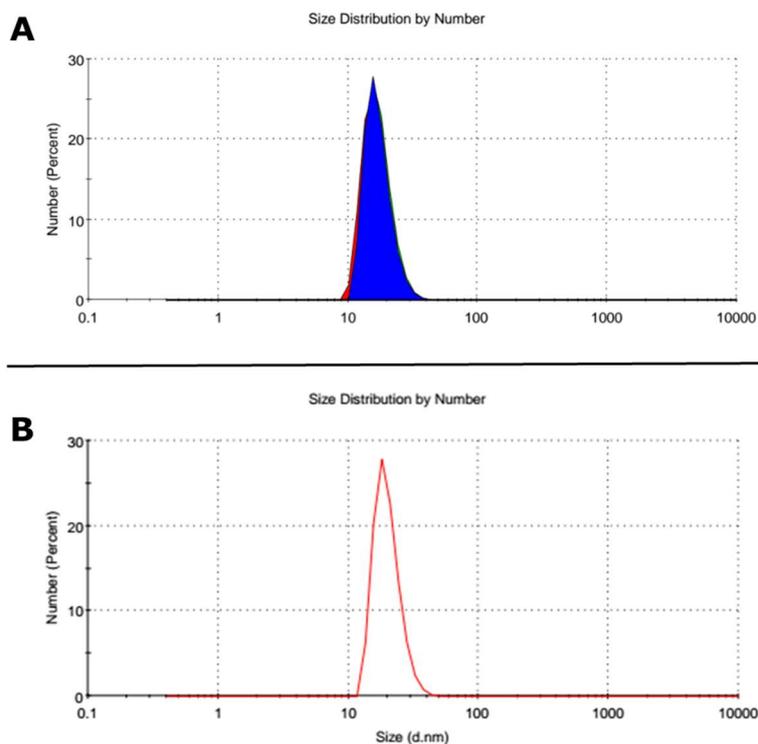
Foram feitas medidas de transmitância de uma série de amostras de concentrações conhecidas de DOX. O gráfico foi construído a partir da resolução da equação da reta de DOX livre ( $y = 10,488x + 0,0523$ ) e de NE C16-DOX ( $y = 5,6101x + 0,0467$ ), onde o X da equação refere-se a absorvância encontradas nas amostras analisadas. Dessa forma, foi possível analisar o gráfico determinando a concentração experimental de DOX presente na NE.

A quantificação realizada utilizando espectrofotometria na região UV revelou que 55,3% da massa teórica da doxorubicina estava presente na pró-fármaco. A NE escolhida obtida com concentração de C16-DOX de  $0,8 \text{ mg/mL}$  representa então a concentração real de aproximadamente  $0,4 \text{ mg/mL}$  DOX equivalente, ou seja, na concentração formulada com  $4 \text{ mg}$  do pró-fármaco apresenta  $2 \text{ mg}$  de DOX.

A nanoemulsão se apresentou macroscopicamente translúcida, alaranjada e com ausência de precipitação ou floculação (Figura 23). A NE C16-DOX apresentou diâmetro hidrodinâmico de  $23,72 \pm 1,28 \text{ nm}$  e índice de polidispersão  $0,082$  em dispersão numérica (Figura 24A). A NE teve uma carga positiva tendo o potencial zeta de  $4,49 \text{ mV} \pm 0,26$ . A NE obtida sem o pró-fármaco obteve diâmetro hidrodinâmico de  $26,55 \text{ nm}$  e índice de polidispersão  $0,058$  (Figura 24B).

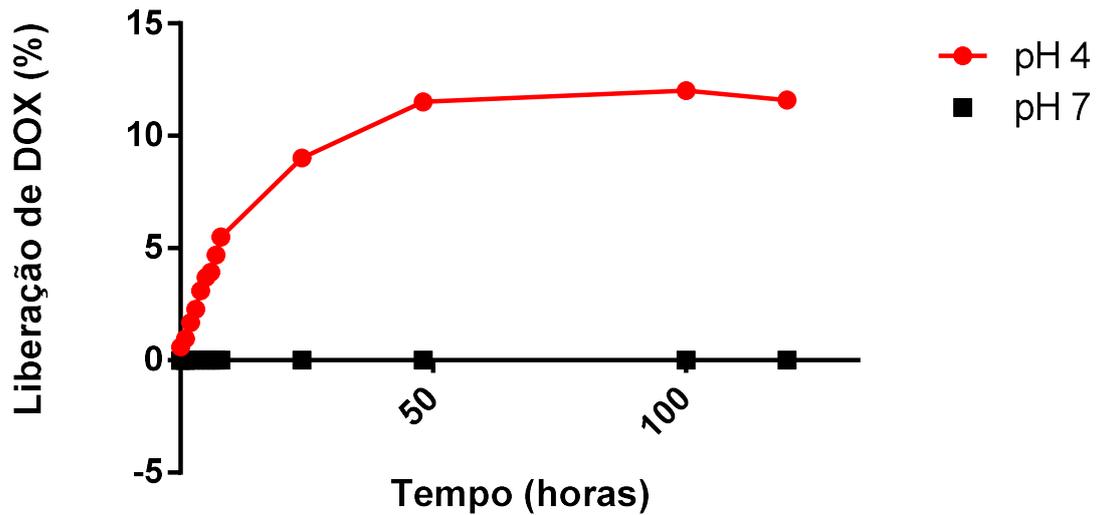


**Figura 23:** Aparência macroscópica da NE C16-DOX.



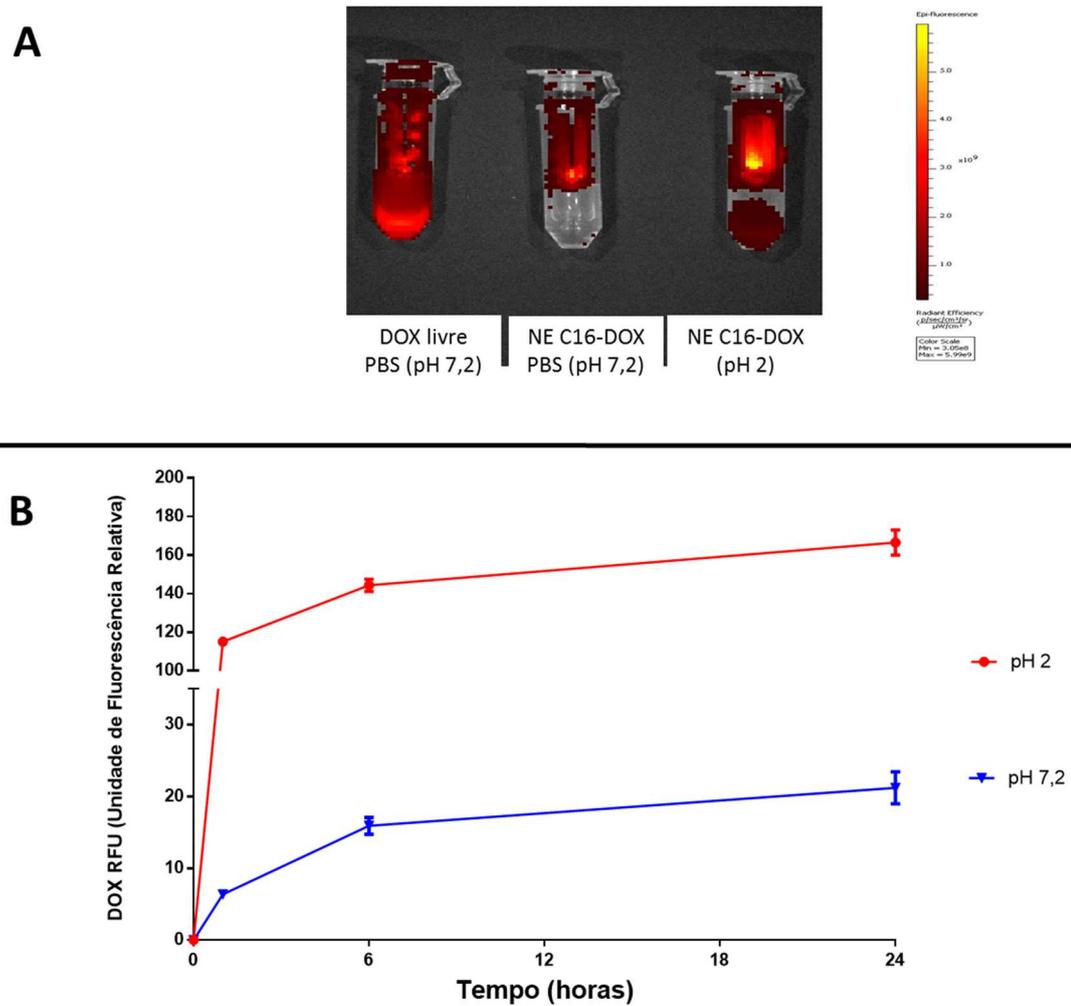
**Figura 24:** Em A, dispersão da população da NE C16-DOX em percentual numérico com diâmetro hidrodinâmico de 20,63 nm e em B, dispersão da população da NE branca em percentual numérico com raio hidrodinâmico de 26,55 nm.

O estudo de perfil de liberação *in vitro* tem objetivo de analisar a quantidade de droga liberada da nanoemulsão ao longo do tempo. Na análise do perfil de liberação da DOX que está representado graficamente na Figura 25 pode-se observar que o ensaio mostrou a liberação da NE C16-DOX de forma lenta e sustentada até atingir o platô após 48 horas. Após 120 horas, 12% da droga havia sido liberada no meio receptor. Após 24 horas não houve aumento significativo. A concentração máxima de DOX liberada foi de 24  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 25:** Perfil de liberação cinética da NE C16-DOX por diálise em pH ácido e pH fisiológico ao longo do tempo. Dados representados em % de DOX (A).

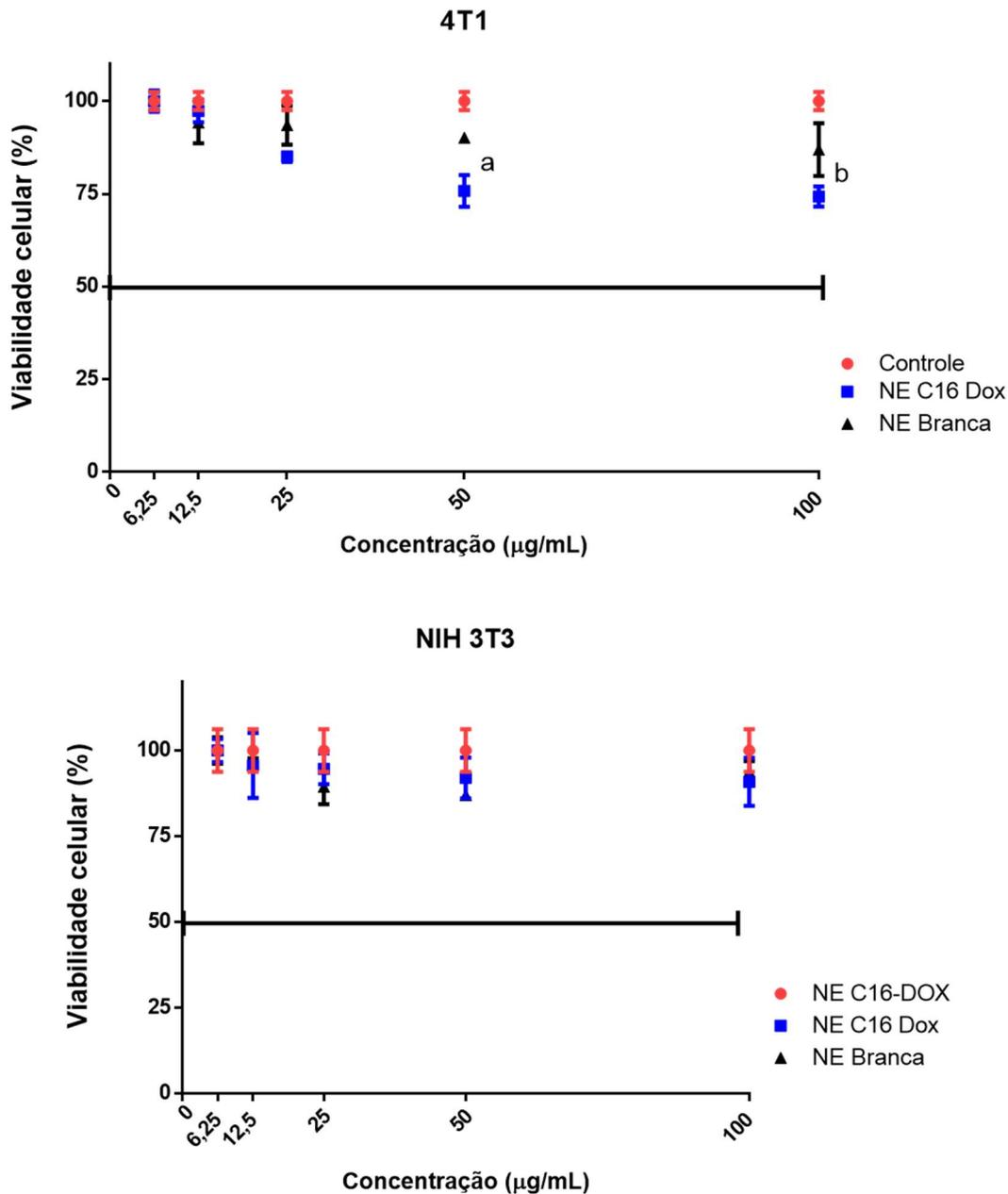
A liberação de DOX do nanocarreador NE C16-DOX, uma característica chave deste sistema, também foi avaliada qualitativamente por centrifugação. A figura 26A mostra microtubos Amicon com DOX sob diferentes condições. A solução de DOX livre pode passar a membrana, e a molécula é detectada no fundo do microtubo após a centrifugação. Na NE C16-DOX, foi qualitativamente observada uma liberação de DOX dependente de pH (Figura 26A), onde sob condições ácidas (pH 2) a molécula é liberada a partir da NE, enquanto que ao pH fisiológico (7.2) a fluorescência DOX é observada apenas na parte superior do tubo. Na análise quantitativa os dados confirmaram aumento significativo da fluorescência da DOX em pH 2 (Figura 26B).



**Figura 26:** Perfil de liberação de DOX: avaliação qualitativa (A) e quantitativa (B) da liberação de DOX por fluorescência em microtubos de amicon.

### 5.3 Ensaios de citotoxicidade

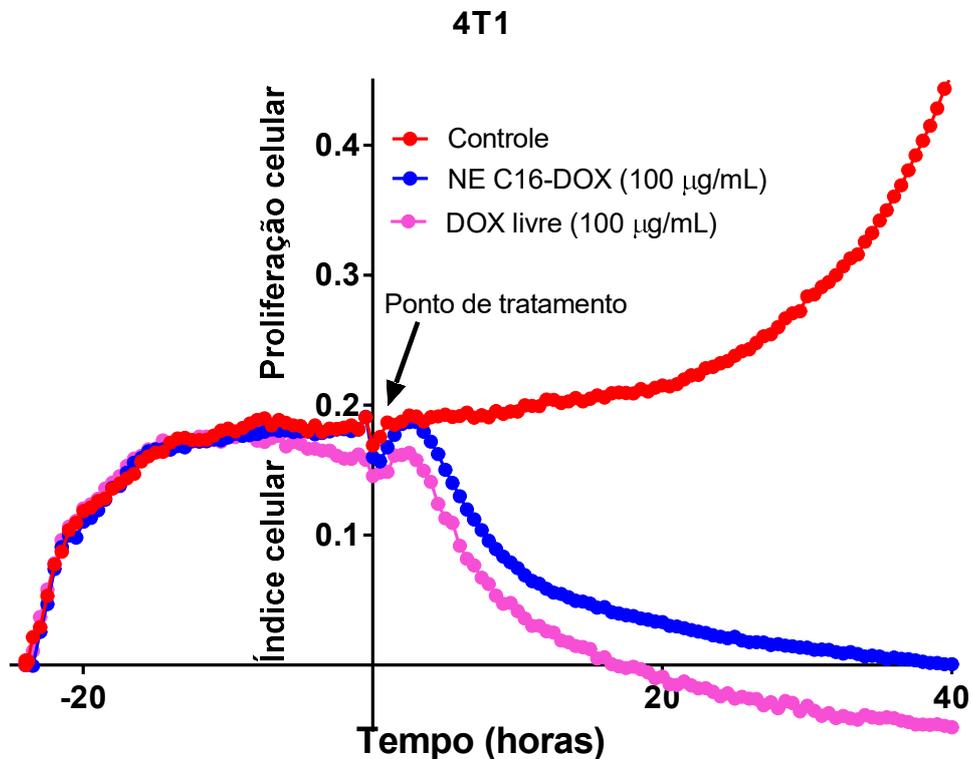
Através do ensaio de viabilidade celular (MTT) foi possível observar que nas concentrações de 50 $\mu$ g/mL e 100 $\mu$ g/mL a NE C16-DOX, com 2 horas de exposição e 24h de recuperação, reduziu significativamente a viabilidade nas células tumorais ( $p < 0,05$ ) 4T1 (Figura 26A). Já as células não-tumorais testadas para avaliar a segurança do nanocarreador tiveram redução de menos de 15% da viabilidade (Figura 26B). A nanoemulsão branca não apresentou toxicidade considerável em nenhuma das duas linhagens testadas, reduzindo menos de 15% da viabilidade em ambos testes (Figuras 26A e 26B).



**Figura 27:** Teste de viabilidade (MTT) das células 4T1 (A) e NIH 3T3 (B) após 2 horas de exposição a diferentes concentrações de NE C16-DOX e NE Branca com mais 24 horas de recuperação com meio de cultivo. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. a =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e NE Branca na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . b =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e NE Branca na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

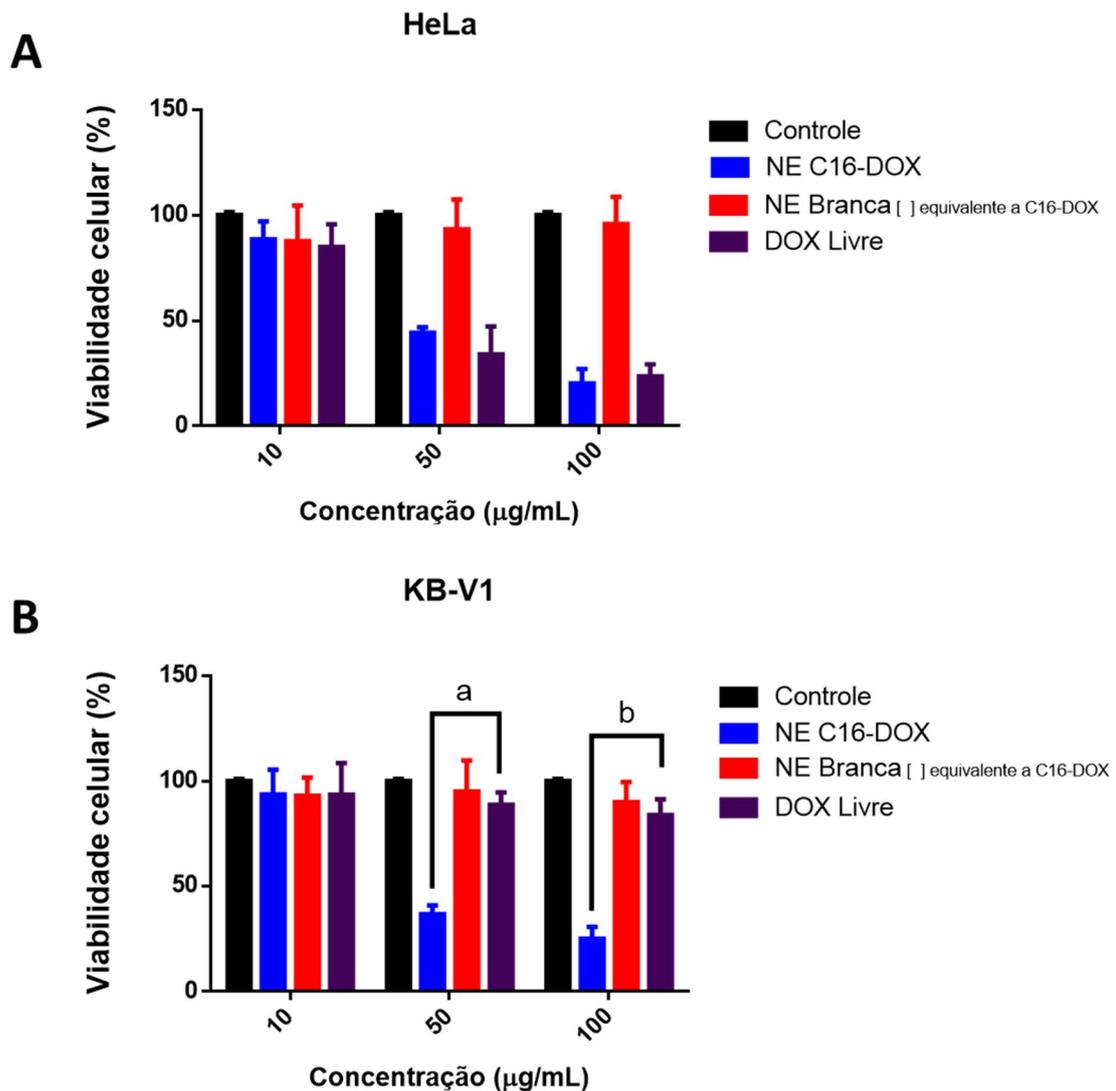
O teste de viabilidade em tempo real (RTCA) também foi realizado em células 4T1 utilizando a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 28). Após o tempo de 40 horas houve perda total do sinal de bioimpedância, indicando perda da viabilidade de todas as

células. Em até 10 horas mais de 50% das células tornam-se inviáveis indicando o efeito antiproliferativo da NE C16-DOX nas concentrações testadas.



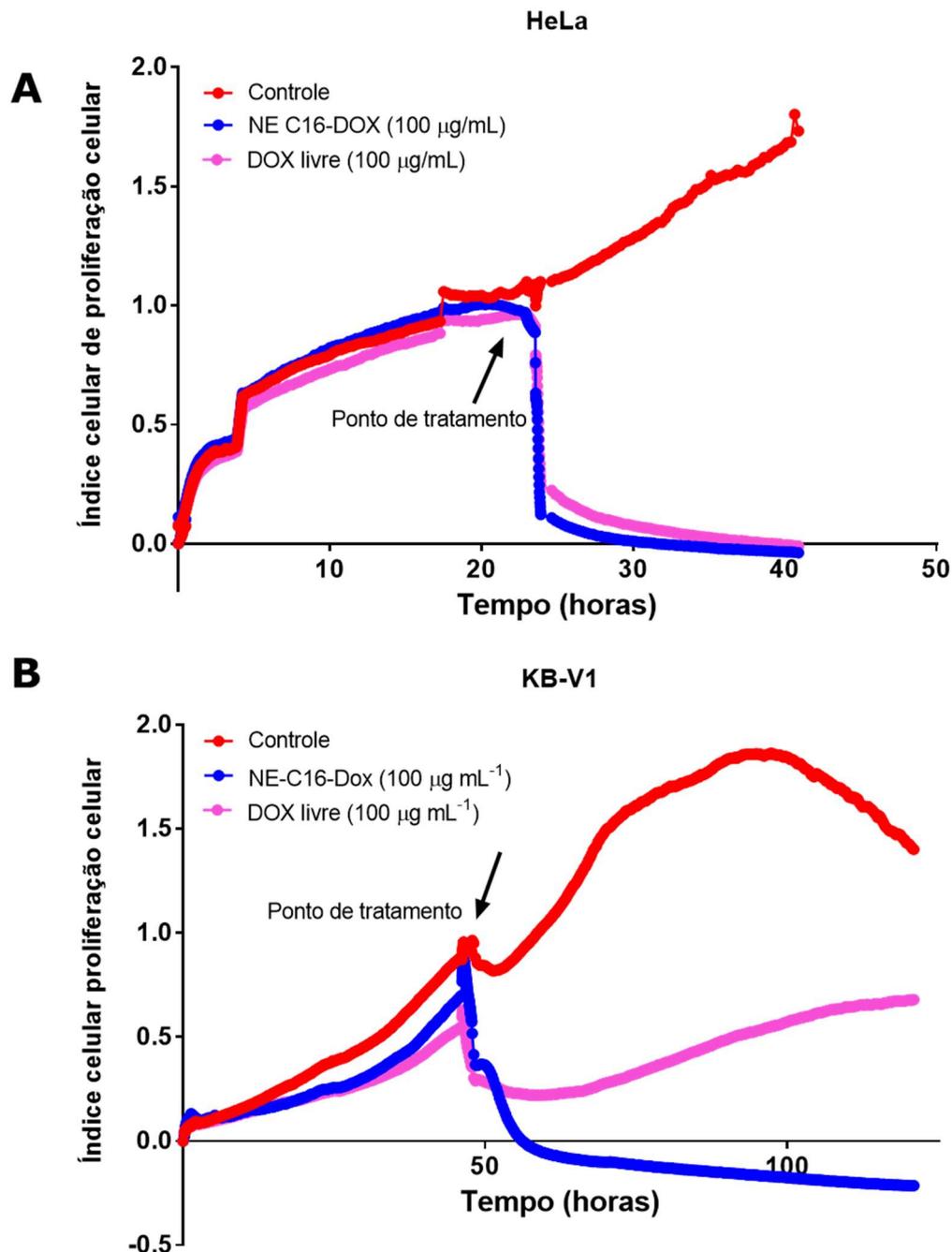
**Figura 28:** Teste de viabilidade por análise celular de 4T1 em tempo real (RTCA) após exposição de 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre ao longo de 40 horas sem recuperação. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Em relação as células resistentes, houve uma maior redução da viabilidade nas células KBV-1 (resistentes a DOX) em relação as células HeLa (não-resistentes) quando tratadas com a NE C16-DOX. Na maior concentração testada, a NE C16-DOX reduziu 79,8% de viabilidade das células HeLa e 85% das KB-V1, enquanto que, o fármaco livre reduziu 76,4% na HeLa e 16,1% na KB-V1 (Figura 29).



**Figura 29:** Teste de viabilidade (MTT) das células HeLa (A) e KB-V1 (B) após 30 minutos de exposição a diferentes concentrações de NE C16-DOX, NE Branca e DOX livre com mais 24 horas de recuperação com meio de cultivo. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. a =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e DOX livre na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . b =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos NE C16-DOX e DOX livre na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

O teste de viabilidade em tempo real (RTCA) também foi realizado utilizando as células resistentes na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 30).

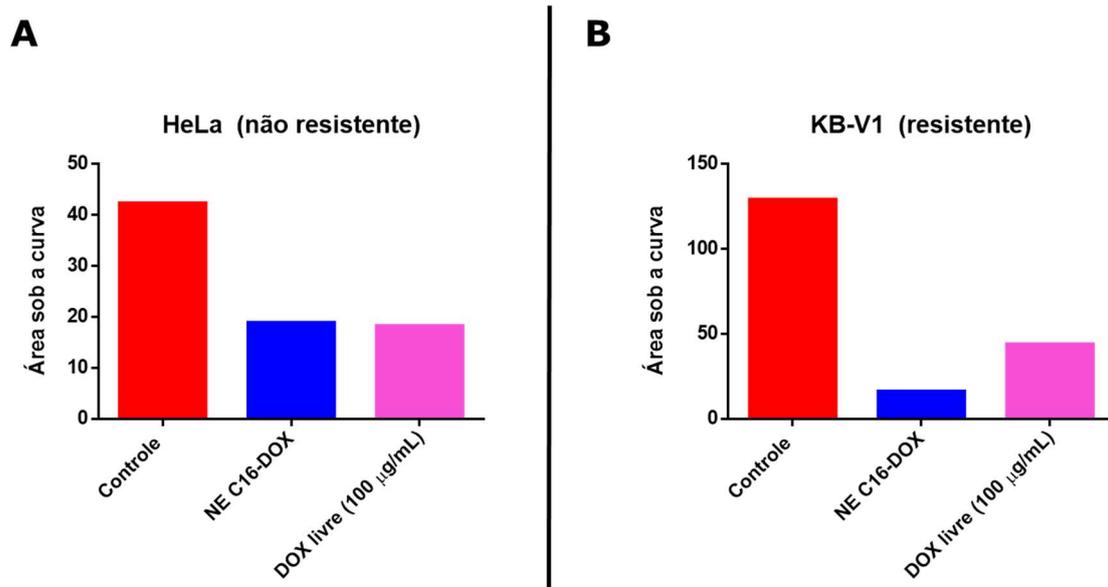


**Figura 30:** Teste de viabilidade por análise celular em tempo real (RTCA) de células HeLa (A) e KB-V1 (B) após exposição de 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre ao longo de 170 horas. Dados expressos como média ± erro padrão da média.

Após 20 horas houve perda total do sinal de bioimpedância das células HeLa, indicando perda da viabilidade de todas as células. Já nas células resistentes a DOX, KB-V1, 21 horas após o tratamento com a NE C16-DOX todas as células tornam-se inviáveis indicando o efeito antiproliferativo da nanoemulsão na concentração testada. No mesmo

tempo após o tratamento, 26% das células dessa mesma linhagem tratadas com o fármaco livre permaneciam viáveis voltando a proliferar até 100 horas após o tratamento.

Foi feita a análise da área sob a curva do índice de proliferação celular após exposição aos tratamentos (Figura 31).



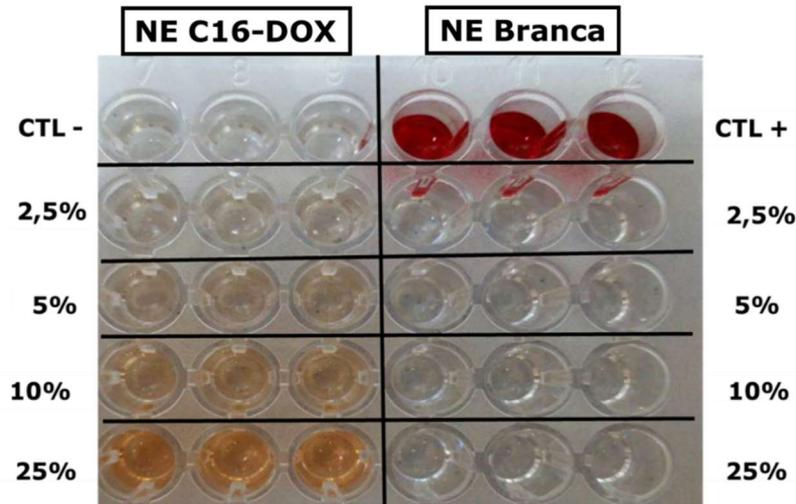
**Figura 31:** Análise da área sob a curva do índice de proliferação celular após exposição de 100 µg/mL de NE C16-DOX e DOX livre ao longo de 170 horas.

Na análise da área sob a curva nas células HeLa não é possível observar diferenças entre os tratamentos NE C16-DOX e a DOX livre. Entretanto, nas células resistentes KB-V1 é possível notar uma maior redução de viabilidade nas células que foram tratadas com a NE C16-DOX quando comparado com as células que foram tratadas com o fármaco livre.

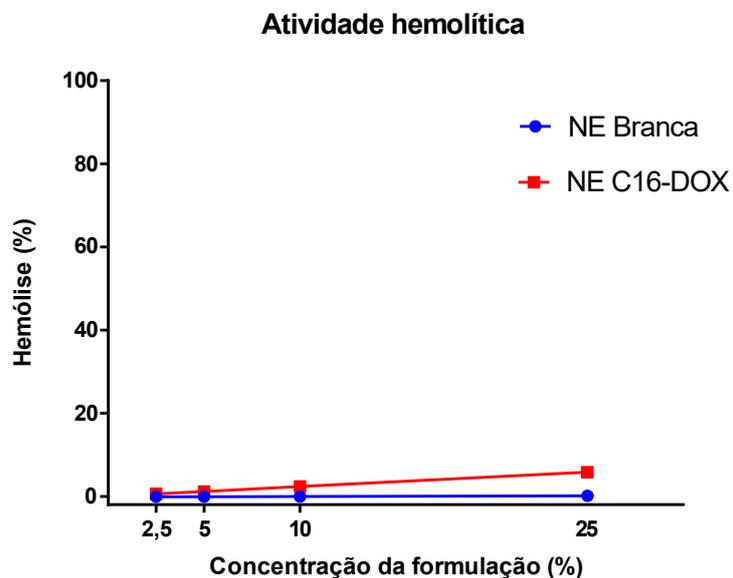
#### 5.4 Avaliação da atividade hemolítica

O objetivo deste ensaio foi investigar a capacidade da doxorubicina e dos componentes da nanoemulsão em causar toxicidade sobre os eritrócitos. Devido a toxicidade já sabida do tensoativo utilizado, cremophor, tornou-se necessário a investigação deste parâmetro. A análise dos resultados foi realizada de forma qualitativa por meio da

comparação colorimétrica com os controle negativos (NaCl) e positivos (água destilada) (Figura 32) e de forma por meio de análise espectrofotométrica utilizando a excitação da hemoglobina (Figura 33).



**Figura 32:** Análise qualitativa da atividade hemolítica da NE C16-DOX e NE Branca em diferentes concentrações em comparação com os controles. O controle negativo (NaCl) e positivo (água destilada) estão representados por CTL- e CTL+, respectivamente.

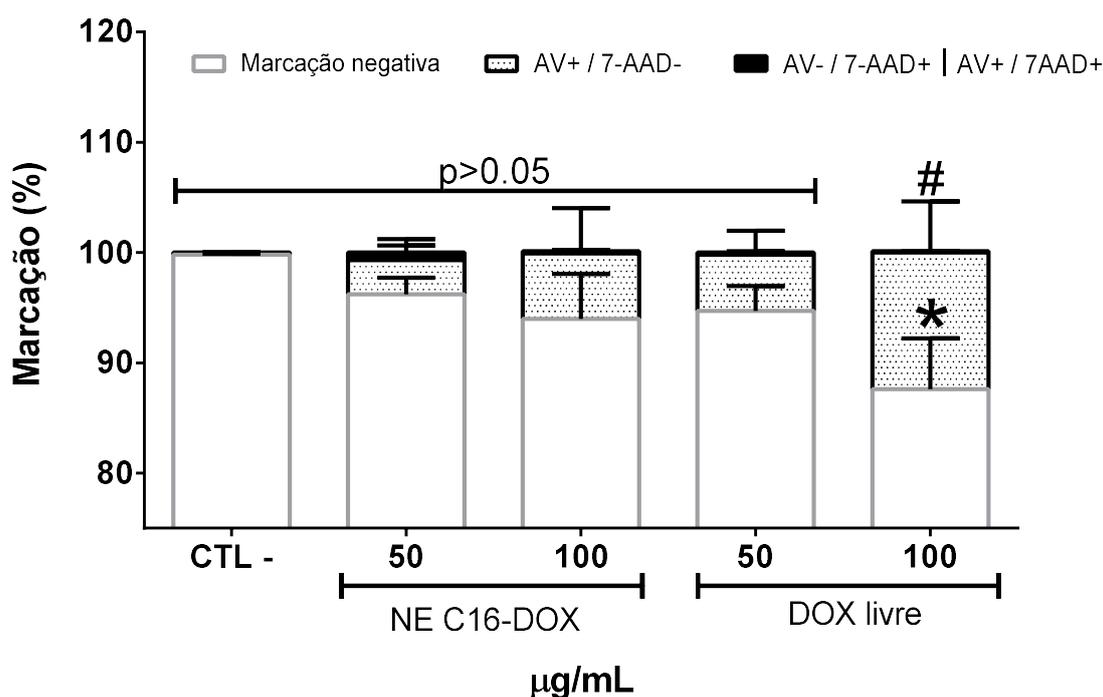


**Figura 33:** Análise quantitativa da atividade hemolítica das nanoemulsões C16-DOX e Branca em diferentes concentrações de formulação no sangue por espectrofotometria utilizando a absorbância da hemoglobina.

A nanoemulsão contendo doxorubicina induziu menos de 6% de hemólise. Já com a nanoemulsão sem o fármaco, a taxa de hemólise foi menor que 1% demonstrando que o tensoativo na concentração utilizada não induz atividade hemolítica nos eritrócitos.

### 5.5 Análise de mecanismo de morte

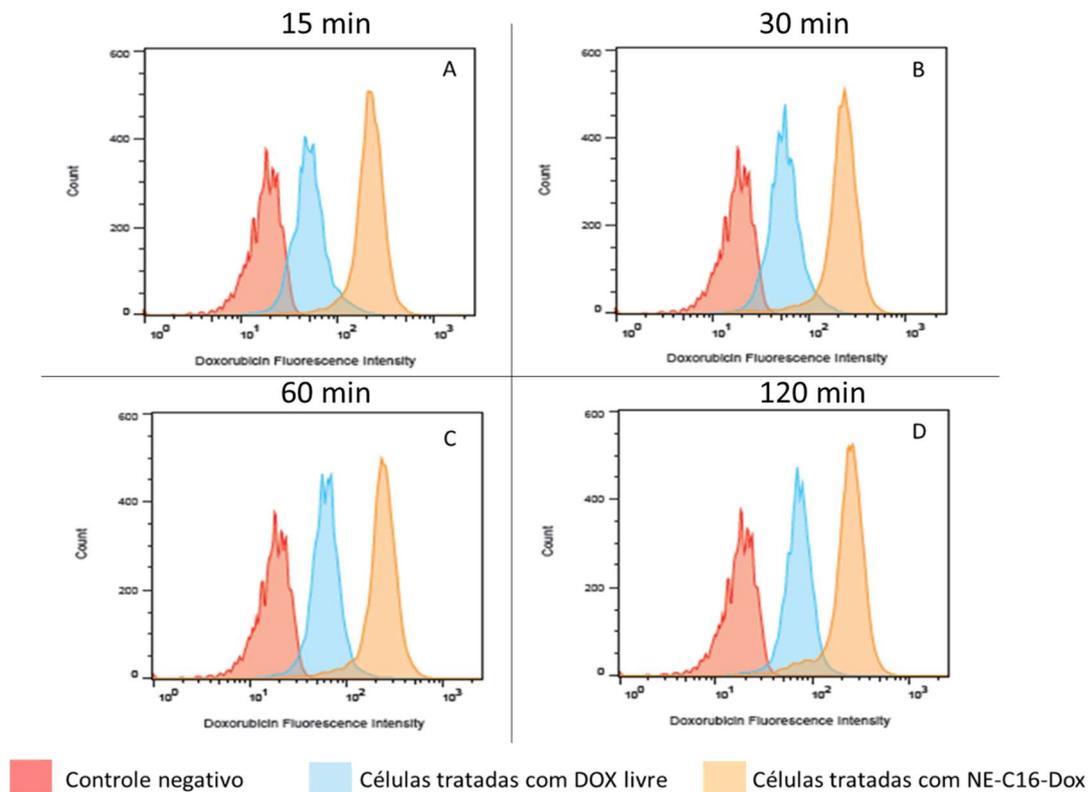
Células 4T1 foram tratadas com 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  de NE C16-DOX e DOX livre (concentrações equivalentes) por 2 horas para detectar marcação com anexina V e 7-AAD. Foi observado que houve uma maior exposição da fosfatidilserina A induzida pelo tratamento com a nanoemulsão em ambas concentrações, sugerindo apoptose inicial. Houve um aumento da porcentagem de células marcadas com anexina V nas células tratadas com NE C16-DOX; 3,10% nas células tratadas com 50  $\mu\text{g/mL}$  e 5,90% com 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 34).



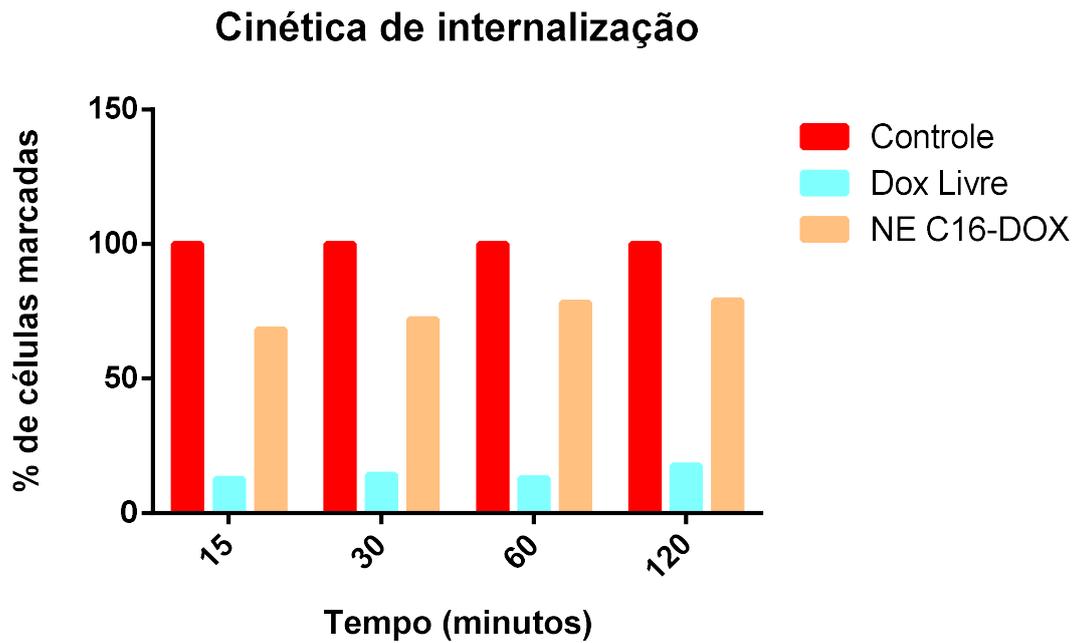
**Figura 34:** Representação gráfica da análise de parâmetros indicadores de mecanismo de morte de células 4T1 expostas por 2 horas sem recuperação a 100  $\mu\text{g/mL}$  de NE C16-DOX e DOX livre utilizando os marcadores de morte Anexina V e 7-AAD por citometria de fluxo. Marcação negativa pode indicar células viáveis, AV+ / 7-AAD- pode ser indicador de apoptose e AV- / 7-AAD+ | AV+ / 7-AAD+ pode ser indicador de necrose. # e \* simboliza diferença estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparado ao grupo controle (CTL-).

## 5.6 Análise de associação

A interiorização da DOX por células 4T1 foi analisada por citometria de fluxo em diferentes tempos de exposição. A porcentagem de interiorização foi calculada com base na fluorescência captada da DOX no canal FLH-2 do citômetro. A captação da DOX pelas células foi significativamente maior em todos os tempos de exposição na NE C16-DOX em comparação ao fármaco livre. Após 15 minutos de exposição a droga, 68,2% da DOX da NE C16-DOX havia sido interiorizada pelas células enquanto que apenas 12,7% da droga livre havia sido captada. No tempo de 2 horas após a exposição, 79% da DOX havia sido interiorizada após tratamento com a NE C16-DOX e 17,7% após a DOX livre (Figura 35 e Figura 36).



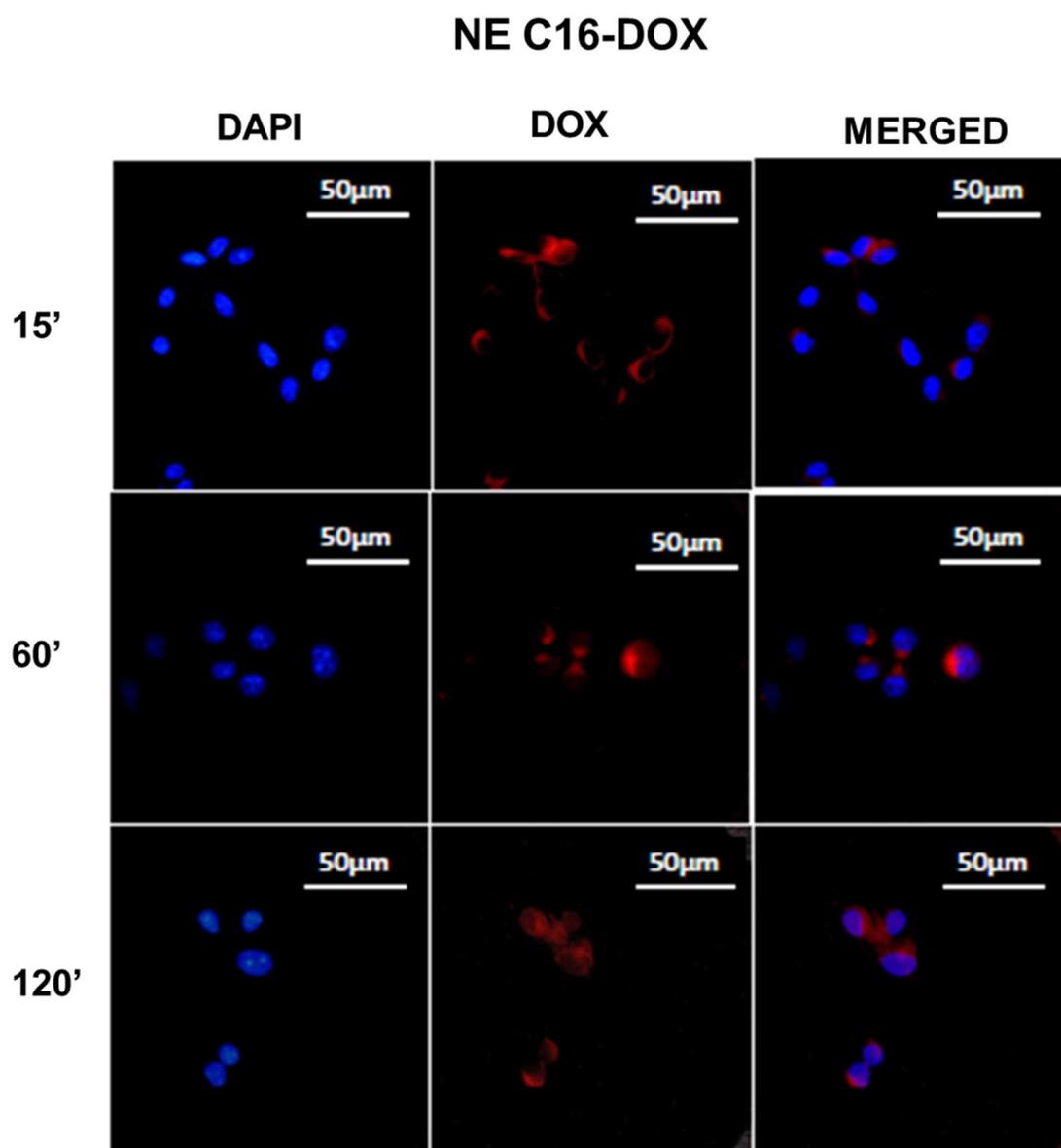
**Figura 35:** Histogramas da cinética de internalização utilizando o deslocamento da fluorescência da DOX em células 4T1 por citometria de fluxo: A) após 15 minutos de exposição; B) após 30 minutos; C) após 60 minutos e em D) após 120 minutos exposição. O arraste pro lado direito do eixo X indica maior fluorescência captada.



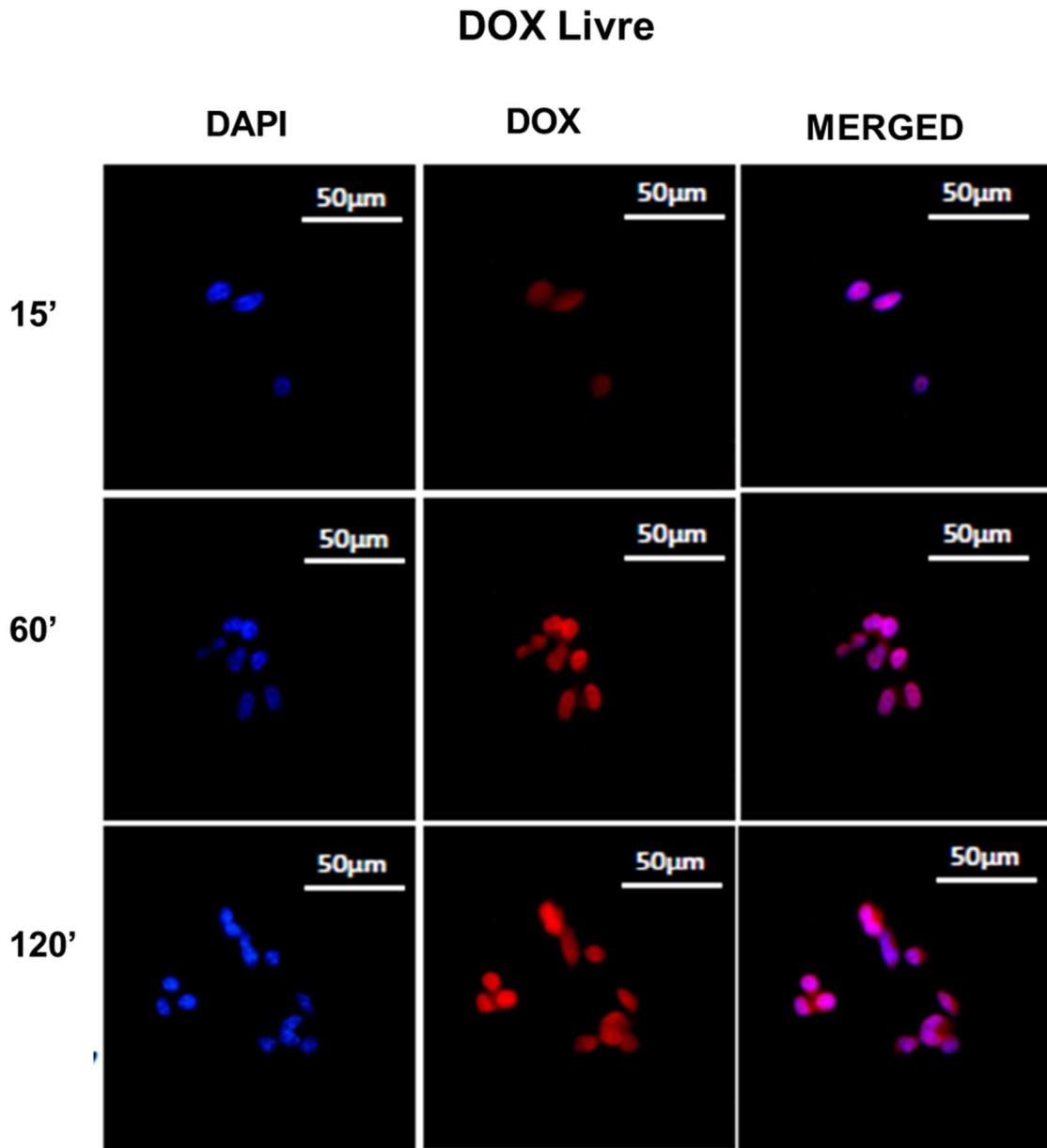
**Figura 36:** Representação gráfica da cinética de associação utilizando a porcentagem da fluorescência da DOX em células 4T1 por citometria de fluxo em diferentes tempos de exposição.  $p < 0,05$  versus todos os tratamentos e em todos os tempos. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

### 5.7 Microscopia de fluorescência

Células 4T1 foram tratadas com diferentes tempos de incubação com NE C16-DOX (Figura 37) e com DOX livre (Figura 38). Células tratadas com DOX livre apresentaram maior concentração do fármaco no núcleo já aos 15 minutos de incubação. Já nas células tratadas com NE C16-DOX, a DOX foi primeiro observada no citoplasma e então transportada para o núcleo.



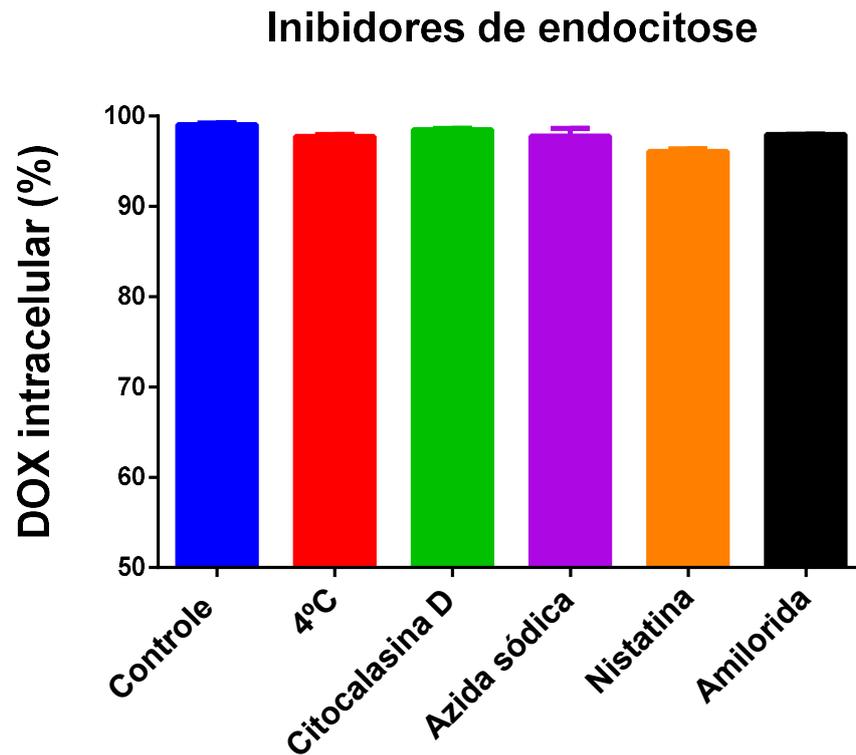
**Figura 36:** Fotomicrografia de fluorescência de células 4T1 após tratamento com NE C16-DOX em diferentes tempos de incubação. Fluorescência azul indica núcleo (corado por DAPI) e vermelho DOX.



**Figura 38:** Fotomicrografia de fluorescência de células 4T1 após tratamento com DOX livre em diferentes tempos de incubação. Fluorescência azul indica núcleo (corado por DAPI) e vermelho DOX.

### 5.8 Mecanismo de endocitose

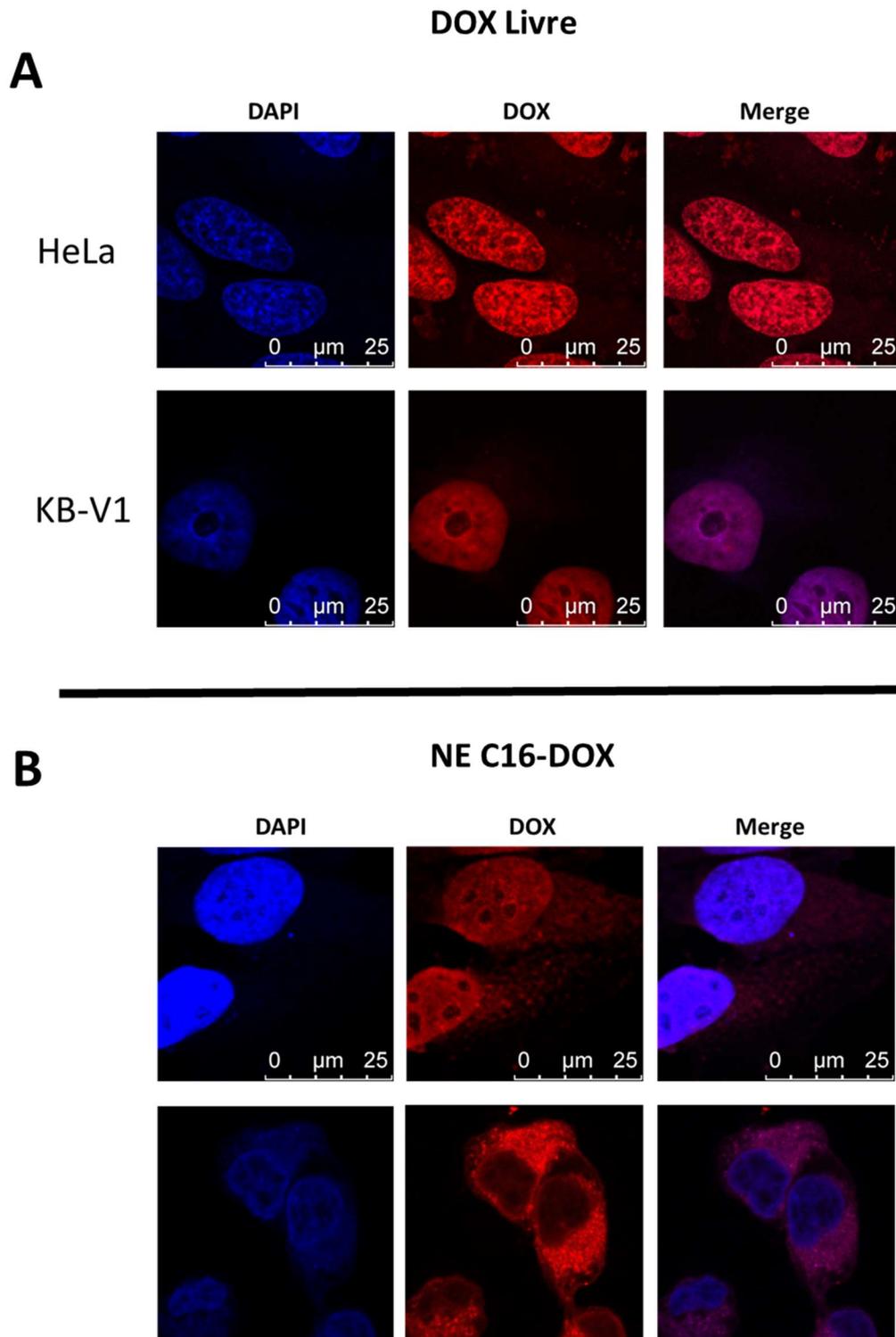
As vias de endocitose foram investigadas utilizando bloqueadores de vias específicas e incubando as células a 4 °C para bloquear vias dependentes de energia. Não houve redução da interiorização da DOX significativa em nenhuma das amostras com diferentes bloqueadores testados (Figura 39). Este experimento sugere que a interiorização da nanoemulsão ocorre por difusão simples, independente de energia.



**Figura 39:** Representação gráfica da DOX intracelular após tratamento por 30 minutos com diferentes bloqueadores de endocitose seguido por tratamento por 2 horas com a NE C16-DOX analisadas por citometria de fluxo.  $p < 0,05$  versus todos os tratamentos. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

### 5.9 Análise de sub-localização celular

A localização sub-celular (núcleo) da DOX em células HeLa e KB-V1 foi analisada após 1 hora de exposição aos tratamentos com DOX livre (Figura 40A) e NE C16-DOX (Figura 40B).



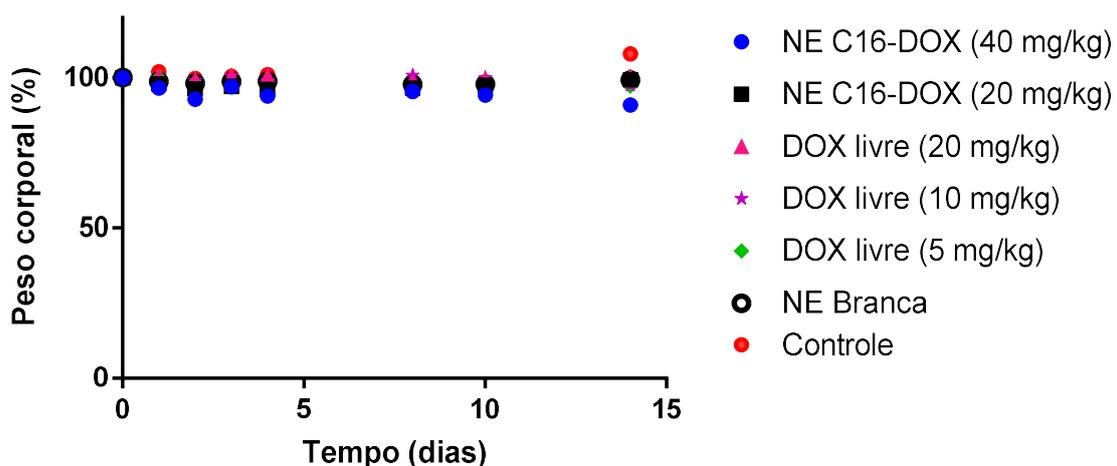
**Figura 40:** Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de células HeLa e KB-V1 tratadas com DOX livre (A) e NE C16-DOX (B) após 1 hora de exposição. O núcleo foi marcado com DAPI (azul). A DOX é indicada pela fluorescência vermelha. Imagens tratadas no *software ImageJ*.

Nas células HeLa tratadas com DOX livre, houve uma maior concentração de fármaco no núcleo e nas células tratadas com NE C16-DOX, houve maior concentração no núcleo com presença no citoplasma. Já nas células resistentes, houve maior concentração no núcleo das células tratadas com DOX livre e no citoplasma das células tratadas com NE C16-DOX.

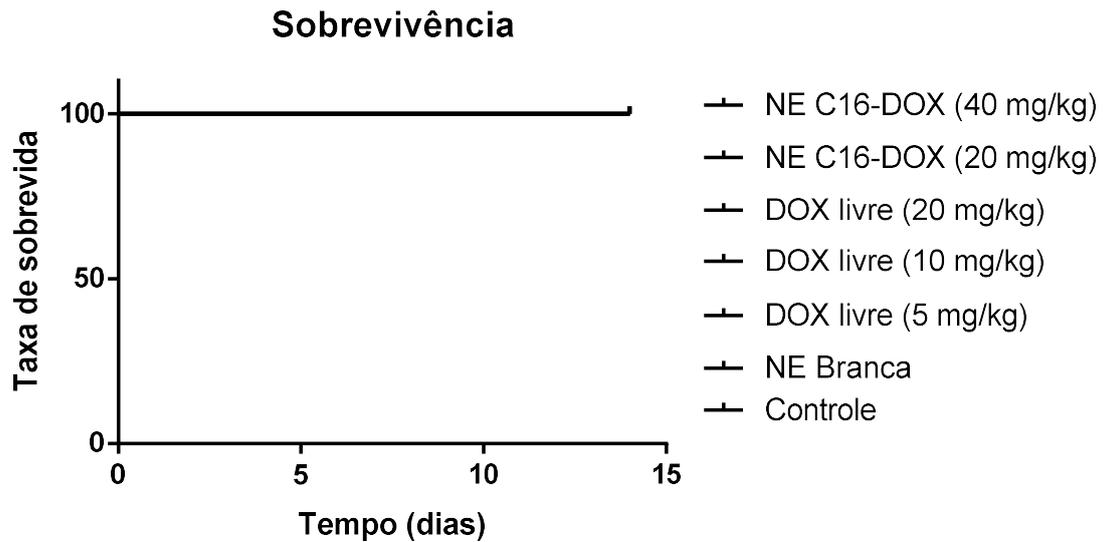
#### 5.10 Máxima dose tolerada (MDT)

Após as avaliações *in vitro*, a capacidade antitumoral da NE C16-DOX foi avaliada em modelo murino. Esse estudo de toxicidade aguda em animais saudáveis foi utilizado para estabelecer a MDT em cada grupo experimental tendo em vista que a DOX é bem conhecida pelos seus efeitos adversos, principalmente a cardiotoxicidade, o que reduz a dose aplicada e conseqüentemente o índice terapêutico. Para o estudo de MDT, animais saudáveis foram avaliados durante 14 dias após diferentes tratamentos.

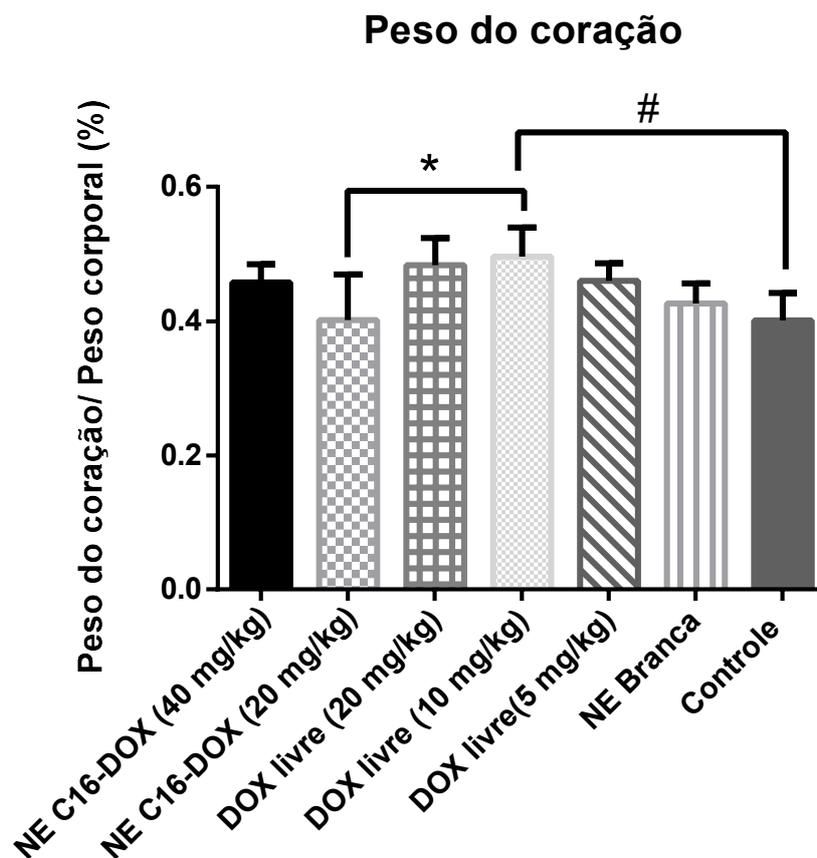
Os resultados mostraram que não houve perda de peso significativa (Figura 41), mortalidade (Figura 42) mas houve diferença significativa no peso do coração na comparação entre o grupo tratado com NE C16-DOX 20mg/kg e DOX livre 10 mg/kg e na comparação entre DOX livre 10 mg/kg e o grupo controle (Figura 43). Em ambas comparações o peso do coração foi maior nos animais tratados com DOX livre 10 mg/kg ( $p < 0,05$ ).



**Figura 41:** Variação do peso corporal de camundongos Balb/C fêmeas observada durante 14 dias após a administração via intraperitoneal de diferentes tratamentos. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ; ANOVA).



**Figura 42:** Taxa de sobrevivência de camundongos Balb/C fêmeas observada durante 15 dias após a administração de diferentes tratamentos.

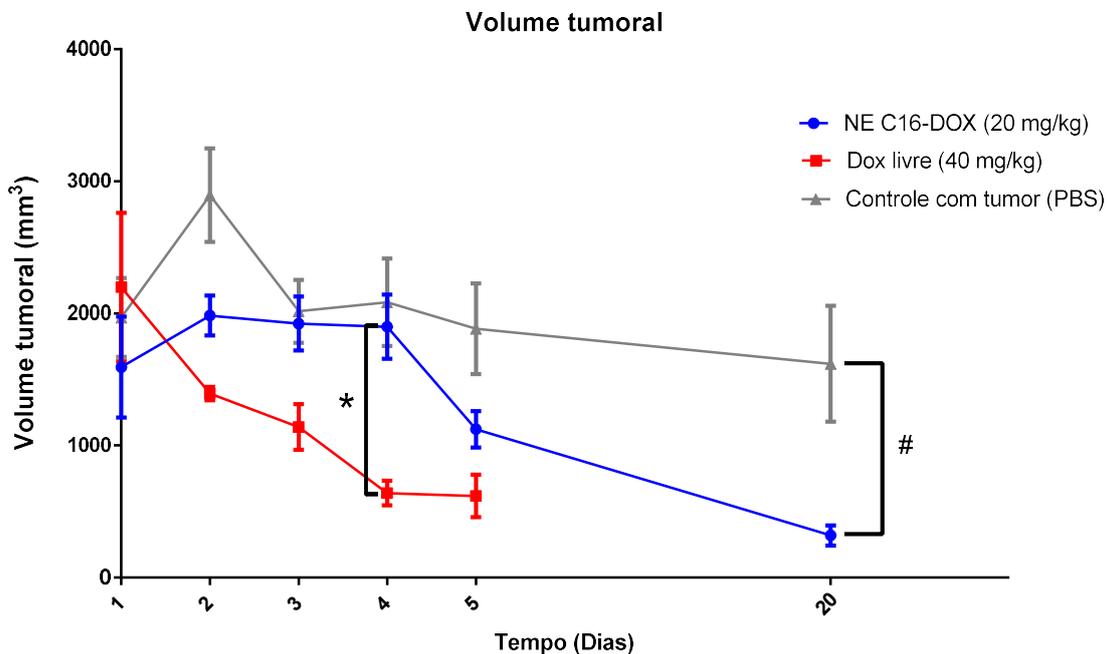


**Figura 43:** Variação do peso do coração em relação ao peso corporal de camundongos Balb/C fêmeas observada durante 14 dias após a administração de diferentes tratamentos. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* =  $p < 0,05$  na comparação entre

os tratamentos NE C16-DOX 20 mg/kg e DOX livre 10 mg/kg. # =  $p < 0,05$  na comparação entre os tratamentos DOX livre 10 mg/kg e o grupo controle. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

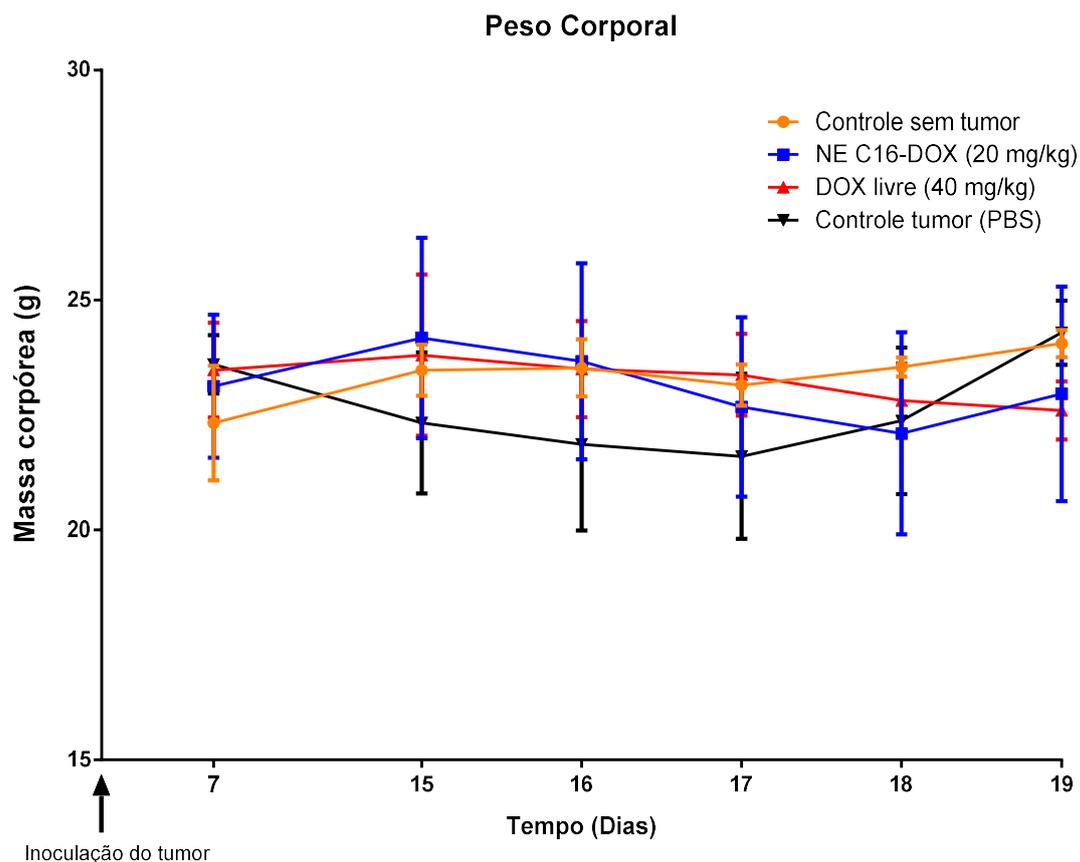
### 5.11 Eficácia terapêutica

A eficácia terapêutica e os possíveis efeitos tóxicos da NE C16-DOX (20 mg/kg) foram avaliados em modelo experimental de tumor murino induzido com células 4T1. Os animais foram tratados com também com DOX livre (40 mg/kg) e com PBS. Este experimento foi feito como um teste piloto de avaliação de eficácia terapêutica. Na avaliação de eficácia terapêutica, o crescimento do tumor foi determinado pelo volume tumoral e a massa corpórea dos animais foi medida ao longo do experimento. No quarto dia de tratamento houve redução significativa do volume tumoral dos animais tratados com DOX livre quando comparados com o grupo tratado com NE C16-DOX. Ao final do experimento, 15 dias após o último dia de tratamento, os animais tratados com NE C16-DOX tiveram redução significativa do volume tumoral quando comparados aos animais do grupo não-tratado ( $p < 0,05$ ) (Figura 44).



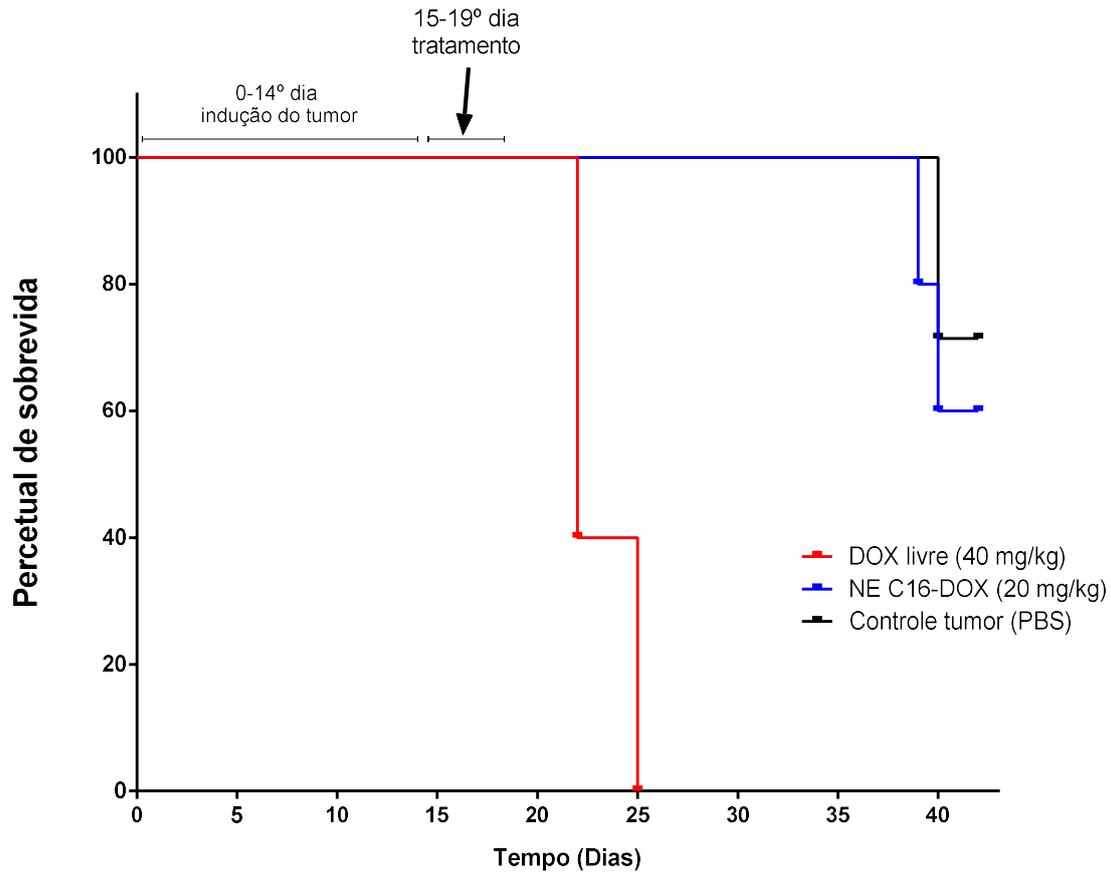
**Figura 44:** Variação do volume de tumores 4T1 de camundongos tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg), DOX livre (40 mg/kg) e controle com tumor (PBS). Os tratamentos foram realizados no dia 1, 2, 3, 4 e 5. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. \* =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com a DOX livre (40 mg/kg). # =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX





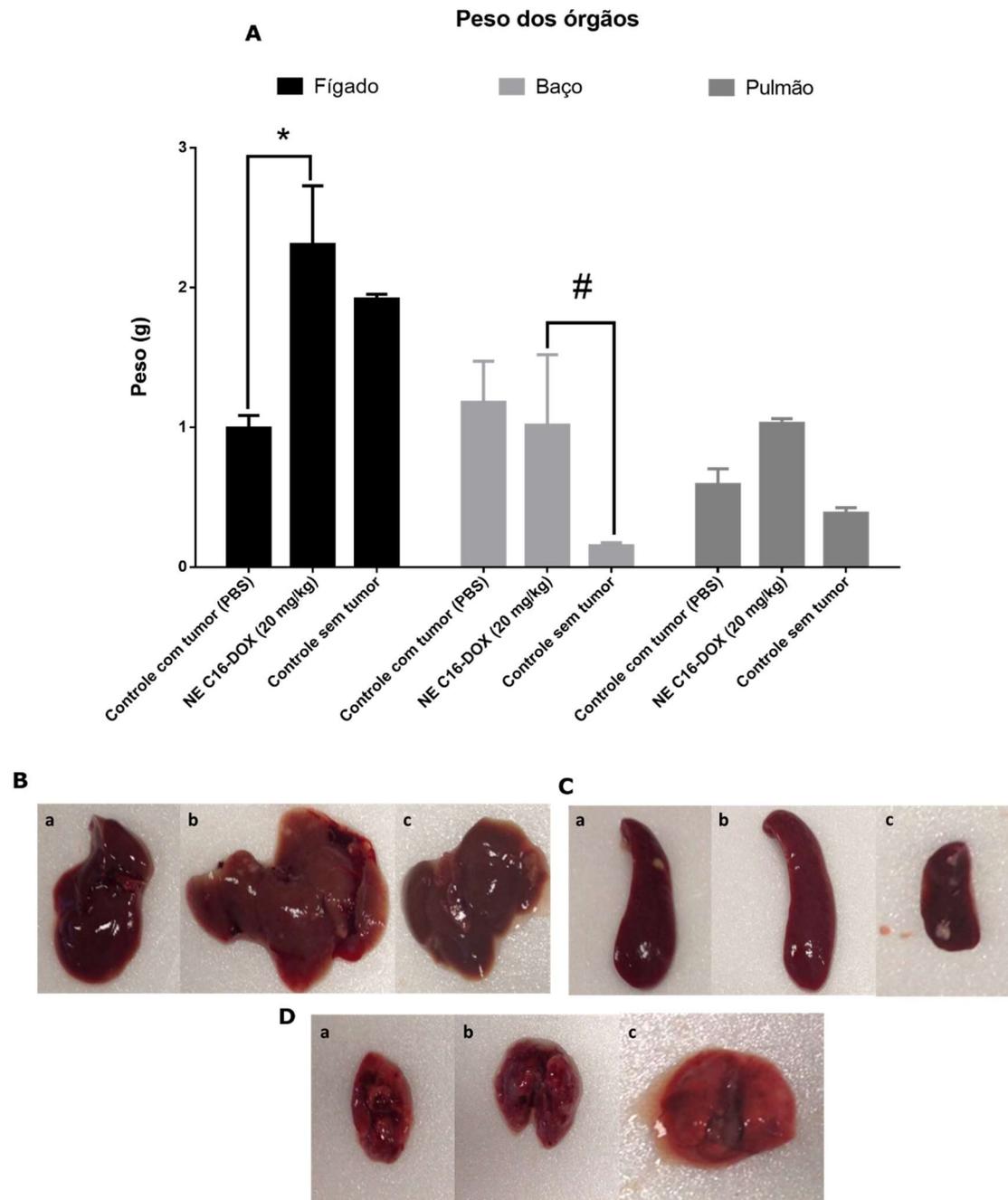
**Figura 46:** Massa corpórea dos camundongos tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg), DOX livre (40 mg/kg) e controle tumor (PBS). Os tratamentos foram realizados no dia 15, 16, 17, 18 e 19. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's.

Os animais com tumor tratados com DOX livre (40 mg/kg) não resistiram até o final do experimento, vindo a óbito dias depois do final do período de tratamento. Os animais tratados com NE C16-DOX ou PBS vieram a óbito após cerca de 20 dias do final do tratamento. (Figura 47).



**Figura 47:** Percentual de sobrevivência dos animais tratados com DOX livre (40 mg/kg), NE C16-DOX (20 mg/kg) e controle tumor (PBS) ao longo do experimento.

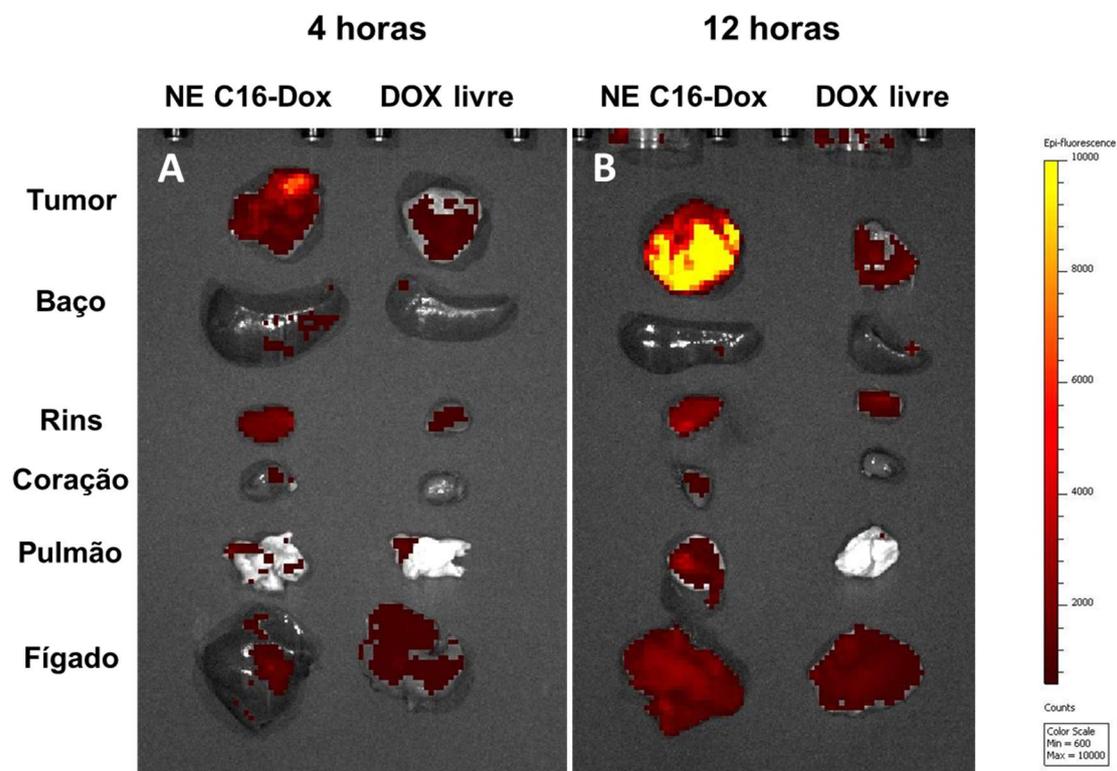
Os órgãos sistêmicos (fígado, baço e pulmão) dos animais foram avaliados *ex vivo* com o objetivo de observar alterações macroscópicas e alterações do peso absoluto entre os diferentes grupos experimentais. Foi observada diferença estatística significativa no peso do fígado dos animais tratados com NE C16-DOX quando comparado aos animais tratados com PBS. Em relação ao baço, macroscopicamente pode-se observar um caso de esplenomegalia nos animais tratados com NE C16-DOX quando comparado ao grupo controle sem tumor, sendo esta diferença de peso absoluto estatisticamente significativa. Não houve diferença significativa no peso do pulmão em nenhum dos grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) (Figura 48).



**Figura 48:** Peso dos órgãos *ex vivo* de camundongos tratados com controle com tumor (PBS), NE C16-DOX (20 mg/kg) controle sem tumor (A). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram usados 4 animais por grupo. \* =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com controle com tumor (PBS). # =  $p < 0,05$  na comparação da NE C16-DOX (20 mg/kg) com controle sem tumor. Análise estatística: ANOVA em duas vias e teste de múltiplas comparações de Tukey's. Aspecto macroscópico do fígado (B), baço (C) e pulmão (D) excisados de camundongos portadores de tumor controle (PBS) (a), tratados com NE C16-DOX (20 mg/kg) (b) e animais saudáveis sem tumor (c).

## 5. 12 Biodistribuição

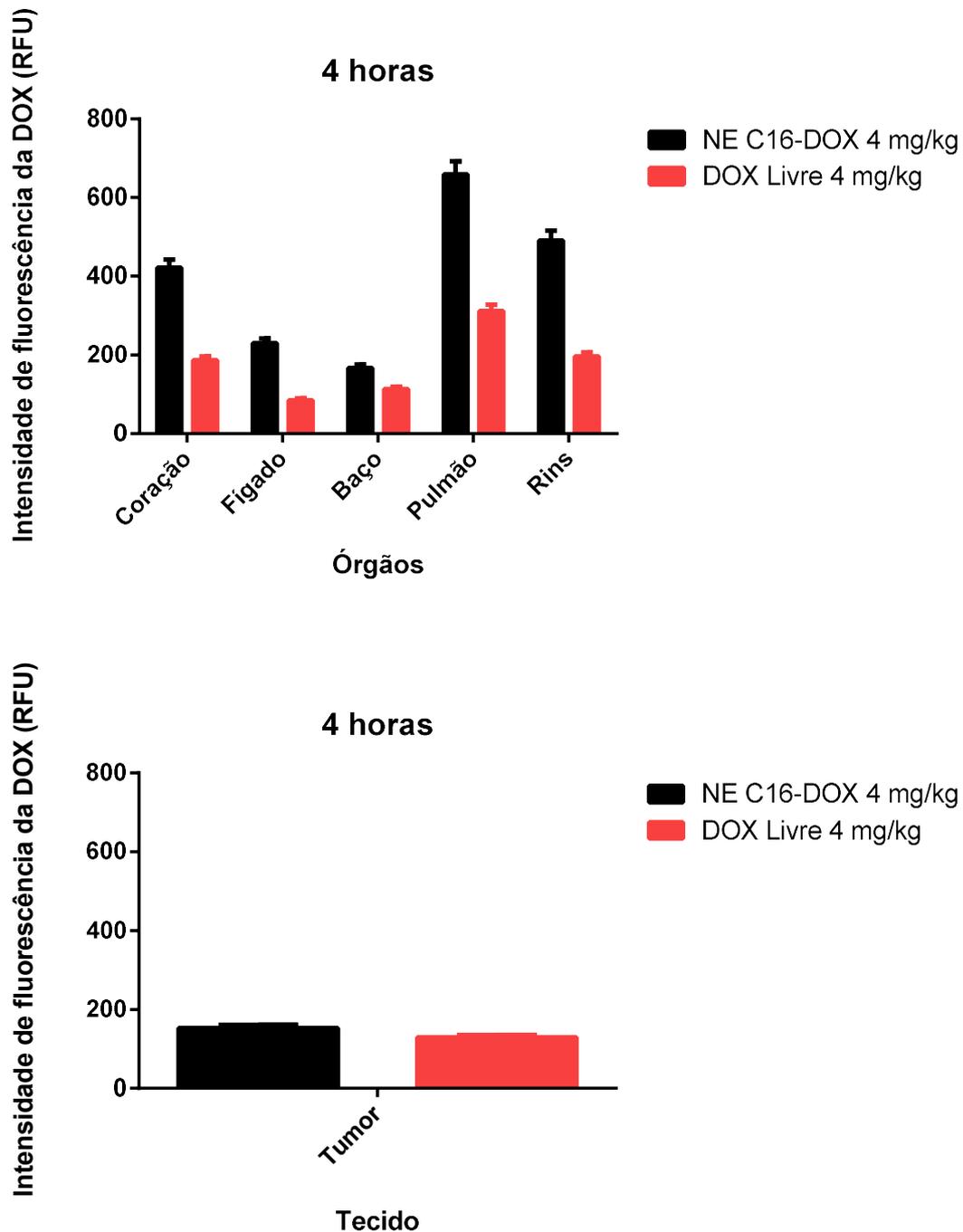
No estudo de biodistribuição, animais com a presença de tumor tratados com NE C16-DOX apresentaram uma diferença significativa no perfil farmacocinético nos órgãos em comparação aos animais tratados com o fármaco livre. Na análise qualitativa foi possível observar que os animais tratados com a NE C16-DOX apresentaram maior concentração de DOX no tumor quando comparado com os animais tratados com DOX livre mas a diferença não foi significativa. Já no tempo de 12 horas, a diferença da fluorescência foi significativamente maior no tumor dos animais tratados com NE C16-DOX do que nos animais tratados com DOX livre ( $p < 0,05$ ) (Figura 49).



**Figura 49:** Biodistribuição qualitativa da DOX em camundongos com tumor 4 e 12 horas após tratamento com NE C16-DOX e DOX livre. A barra de escala na parte direita da figura representa a quantificação de emissão por fluorescência. A emissão amarela indica maior quantificação de DOX, enquanto a emissão vermelha indica menor quantificação ( $p < 0,05$ ).

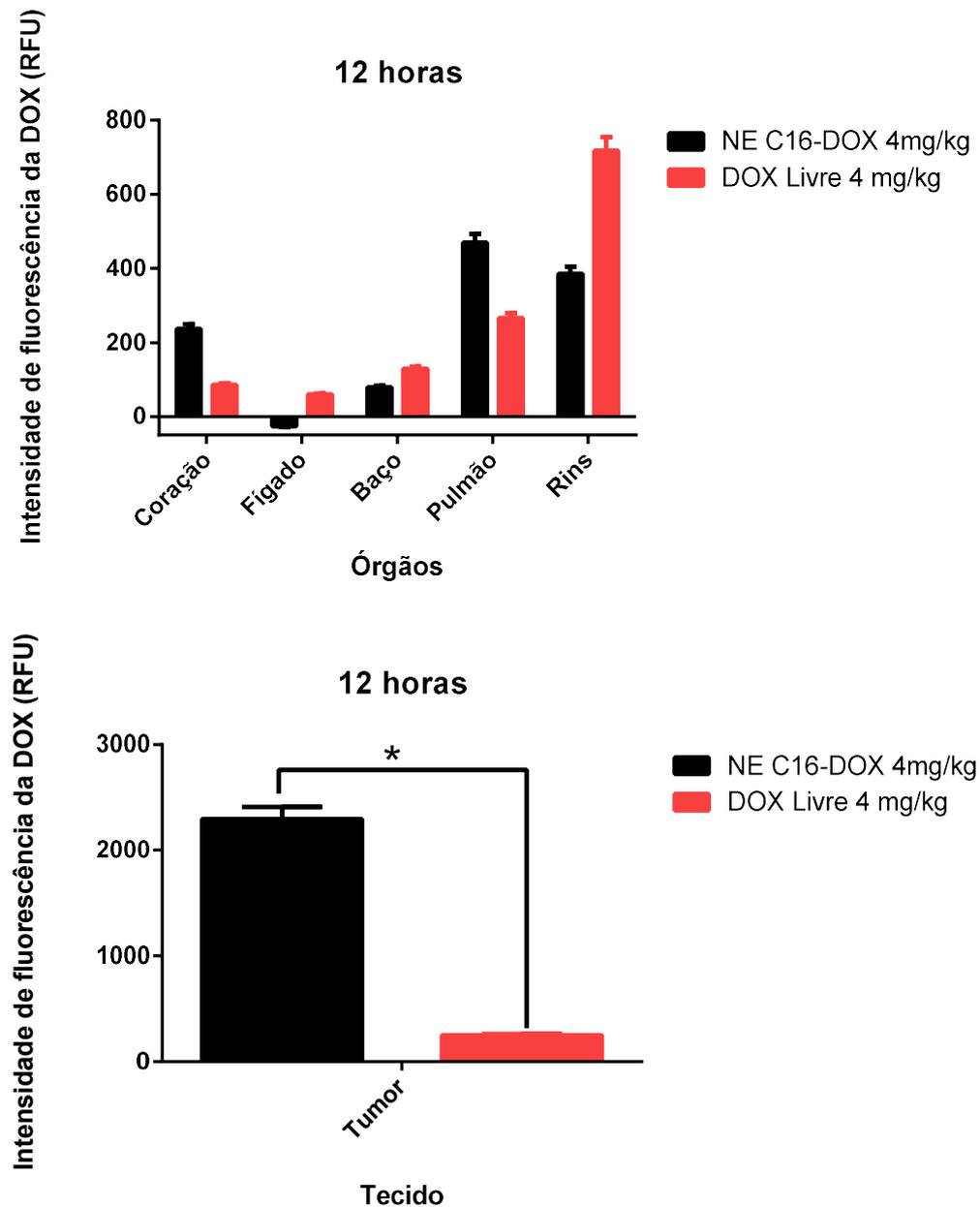
Na análise quantitativa, foi possível observar que nas primeiras 4 horas houve maior distribuição da DOX nos órgãos mais vascularizados como o coração, pulmão e

rins. Nota-se também que em 4 horas não houve diferença significativa na concentração de DOX no tumor após o tratamento com NE C16-DOX ou DOX livre (Figura 50).



**Figura 50:** Distribuição quantitativa de DOX livre nos órgãos coletados (A) e no tumor (B) após 4 horas de administração de NE C16-DOX 4 mg/kg ou DOX livre 4 mg/kg ( $p < 0,05$ ).

No tempo de 12 horas, os dados mostram baixa concentração da DOX nos órgãos (exceto nos rins) após ambas terapias sugerindo processo de eliminação do fármaco livre (Figura 51A). Enquanto que no tumor, a concentração de DOX após o tratamento com a NE C16-DOX foi 9 vezes maior do que a concentração no tumor dos animais tratados com o fármaco livre (Figura 51B).



**Figura 45:** Distribuição quantitativa de DOX livre nos órgãos coletados (A) e no tumor (B) após 12 horas de administração de NE C16-DOX 4 mg/kg ou DOX livre 4 mg/kg ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Apesar do expressivo progresso na terapia do câncer nas últimas cinco décadas, o câncer continua sendo uma das principais causas de morte no mundo inteiro ocasionando a morte de mais de 8 milhões de pessoas por ano (QIN et al., 2017). O tratamento baseado radioterapia, hormonoterapia e quimioterapia clássica tem se mostrado ineficiente contra determinadas células cancerosas que desenvolvem mecanismos de resistência aos agentes anticâncer, ocasionando baixo índice terapêutico (PARHI, MOHANTY & SAHOO, 2012; DE SOUZA et al., 2014). Sendo a quimioterapia a tática predominante da terapia do câncer, a procura por novos agentes anticâncer é de suma importância devido aos indesejáveis baixos índices terapêuticos e alta toxicidade dos atuais quimioterápicos.

O antibiótico antineoplásico citotóxico estudado nesta tese, a doxorubicina, apresenta potente eficácia terapêutica nos tratamentos de diversos tumores sólidos (TREVISAN & POPPI, 2003). Entretanto, sua efetividade no tratamento anticancerígeno está associada aos mais variados efeitos adversos (dermatológicos, gastrointestinais, hematológicos) devido a sua baixa seletividade e ao processo de resistência aos fármacos utilizados. Diante dessa problemática, a nanotecnologia surge como uma nova abordagem visando o emprego de nanocarreadores para entrega do fármaco anticâncer, protegendo-o da rápida depuração sanguínea/renal e acumulando-o preferencialmente dentro dos tumores sólidos devido ao efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR) (QIN et al., 2017).

Atualmente, existem alguns nanomedicamentos aprovados para o tratamento clínico do câncer. Entre eles estão: Oncaspar®, aprovado em 1994, PEGasparaginase indicado para leucemia; Doxil (Caelyx) aprovado em 1995, uma doxorubicina peguilada indicado para o câncer de ovário e mama; DaunoXome®, aprovada em 1996, daunorrubicina encapsulada em lipossomas indicado para sarcoma; Myocet, aprovado em 2000 na Europa e no Canadá, doxorubicina encapsulada em lipossomas indicado para câncer de mama; e Abraxane, aprovado em 2013, que são nanoesferas paclitaxel ligado a albumina indicados para diversos tipos de câncer (CÂMARA et al., 2017),

Apesar de essa tecnologia já ser utilizada com a DOX e alguns medicamentos já terem sido aprovados pela FDA, o surgimento de novos efeitos adversos e complicações sugerem a desenvolvimento de novos sistemas que atendam às necessidades da terapia anticâncer com os mínimos efeitos indesejados. Dentre os nanossistemas, as

nanoemulsões se destacam por serem sistemas coloidais constituídos por dois líquidos imiscíveis que produzem gotículas de tamanho nanométrico dispersas em uma fase aquosa, sendo cineticamente estáveis (TADROS, 2004). Com a intenção de potencializar o índice terapêutico das nanoemulsões, foi utilizado nesta tese uma nova abordagem que possui a liberação do fármaco a partir da NE através de estímulo químico, o pH.

Para a terapia do câncer, é possível utilizar a responsividade a pH devido às características fisiopatológicas do tecido maligno. Como quase todos os tipos de tumores têm um pH mais baixo em comparação com os tecidos saudáveis normais, várias abordagens inovadoras relacionadas com nanopartículas sensíveis ao pH tem sido testadas para avaliação antitumoral. Silva et al. (2012), por exemplo, relataram o perfil de biodistribuição de lipossomas de longa circulação sensíveis ao pH (Sphl) contendo (<sup>99m</sup>Tc) DOX em camundongos Balb/C portadores de tumor 4T1, mostrando maior acúmulo das nanopartículas na área do tumor, o que sugere a entrega seletiva de doxorubicina ao tumor. Kamiri et al. (2017) descreveram nanopartículas magnéticas como um sistemas pH-sensível para entrega de metotrexato em tecidos tumorais na quimioterapia. Ainda com este objetivo, Tang et al. (2017) relataram a obtenção de uma micela pH-sensível contendo paclitaxel capaz de inibir 77,7% de crescimento tumoral e 88,3% de metástase no pulmão sem toxicidade significativa, sendo um nanocarreador promissor na terapia de tumores metastáticos. Com base nesses resultados, este sistema responsivo específico pode ser apresentado como uma inovação para a terapia do câncer, evitando um dos principais problemas, efeitos colaterais. Apesar de promissores, a complexidade do desenvolvimento e altos custos desses sistemas podem inviabilizar a translação para o uso clínico, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos sistemas que facilitem essa translação (CÂMARA et al., 2017).

A nanoemulsão NE C16-DOX foi obtida pelo método de autoemulsificação proposto por MUEHLMANN et al. (2015). Neste método, utiliza-se a energia química liberada devido ao processo de difusão do tensoativo e do solvente da fase dispersa para a fase contínua sem mudanças na curvatura espontânea do tensoativo em uma temperatura constante, levando a formação de um sistema óleo em água (O/A). Este tipo de sistema permite o carregamento de fármacos lipofílicos em meio aquoso, sendo uma vantagem para a indústria farmacêutica devido ao baixo custo. O tensoativo utilizado, o Kolliphor<sup>®</sup> ELP, óleo de castor polietoxilado, estabiliza as nanogotículas formadas possibilitando a sua interação com o meio aquoso, sendo suficiente para estabilização interfacial do sistema. A fase oleosa é composta pelo óleo de rícino, um triglicerídeo composto de vários ácidos

graxos, sendo o ácido ricinoleico o componente mais abundante.

Sendo a nanoemulsão O/A ideal para a encapsulação de fármacos lipofílicos, o pró-fármaco C16-DOX foi sintetizado por meio da modificação da DOXO-EMCH em uma versão lipídica pela inserção de uma cadeia carbônica hexadecil hidrofóbica que permitiu dissolver a DOX na fase oleosa do nanossistema em estudo. A reação de Michael resultou no pró-fármaco contendo uma ligação hidrazona clivável em pH ácido, liberando o fármaco na forma protonada, solúvel em água e terapeuticamente ativa.

A DOX emite fluorescência em comprimento de onda em torno de 570 nm devido a presença do núcleo naftacenediona fluorescente no carbono 7 (TREVISAN & POPPI, 2003). Técnicas cujo o princípio consiste na excitação de compostos fluorescentes (fluoróforos) com luz no específico comprimento de onda com subsequente captura da emissão das fluorescência em regiões espectrais permitem a detecção da presença de substâncias específicas. Sendo o pró-fármaco estudado responsivo a pH, é primordial certificar-se a efetividade do gatilho de liberação do fármaco. A fluorescência da DOX em ambiente ácido foi detectada por meio de equipamento de imageamento no espectro próprio do fármaco, confirmando a presença e a eficácia da ligação hidrazona. Outro fator que interfere na fluorescência da DOX é que pelo fato da molécula estar agregada quando em solução PBS, a fluorescência é reduzida provavelmente pelo efeito da supressão da fluorescência (*Quenching*). A fluorescência da DOX é auto-apagada (*self-quenched*) quando em solução em altas concentrações, ou seja, quanto mais moléculas de DOX próximas uma da outra, menor a fluorescência (MOHAN & ROPOPORT, 2010).

Durante o processo de desenvolvimento do protocolo para a obtenção da nanoemulsão, foi observado que conforme aumentou-se a quantidade de tensoativo, menor foi o diâmetro hidrodinâmico das nanogotículas. Isso ocorre porque concentrações altas de tensoativo na fase contínua reduzem a tensão superficial, aumentando a estabilidade das nanogotículas evitando a fusão destas (FRYD E MASON, 2012). Essa estabilidade cinética, juntamente com o baixo custo durante o processo de obtenção, tem aumentado o interesse por uso de nanoemulsões devido a sua aplicabilidade no campo dos cosméticos, agroquímicos, indústria química e na farmacêutica para a entrega de fármacos (SOLÈ et al., 2010).

Foram obtidas três nanoemulsões contendo diferentes concentrações de C16-DOX (0,4; 0,8 e 1,2 mg/mL). As duas primeiras apresentando-se monodispersas e com diâmetro hidrodinâmico entre 25 a 30 nm, já na concentração mais alta apresentou polidispersão com picos em 25 e 160 nm, apresentando coalescência das nanogotículas

após 48 horas de preparo. Como revisado por Fryd e Mason (2012), as características físico-químicas das nanopartículas como diâmetro hidrodinâmico e dispersão precisam ser controladas durante o processo síntese. Desta forma, durante o processo de síntese pode-se alterar a quantidade dos constituintes, alterando desta forma o tamanho e uniformidade da população de nanopartículas para se obter o nanossistema desejado. Diante disso, a NE com concentração de 0,8 mg/mL foi escolhida para testes seguintes por apresentar as melhores características físico-químicas.

De acordo com a literatura, nanopartículas com tamanhos que variam de 30 nm a 200 nm pode ser especificamente absorvidas pelos tecidos tumorais em consequência do clássico fenômeno bem conhecido com efeito de permeabilidade de retenção aumentada (EPR) (ALBANESE et al., 2012; LONGO et al., 2015). Os capilares responsáveis pela nutrição de certos tumores sólidos possuem fenestras com diâmetros entre 200 e 800 nm (PASZKO et al, 2011), as quais são muito maiores que as fenestras de tecidos saudáveis – por volta de 6 nm (XIANG & ANDERSON, 2006). Experimentalmente, nanoestruturas com diâmetro de até 400 nm acumulam-se preferivelmente em certos tumores (YUAN ET AL., 1995). As nanopartículas são mantidas em tumores por longos períodos, em função da baixa densidade de drenagem linfática, que é típica de tecidos tumorais (MATSUMURA & MAEDA, 1986).

Em relação a aparência macroscópica, o pró-fármaco C16-DOX apresenta-se na forma de precipitado vermelho quando disperso em ambiente neutro, o que representa sua forte hidrofobicidade. Enquanto que, a NE C16-DOX se apresenta como uma dispersão clara e translúcida sem a presença de agregados. Isto prova que o C16-DOX está completamente dissolvido no núcleo oleoso das nanogotículas.

A quantidade de DOX presente na nanoemulsão foi analisada com a técnica analítica de espectrofotometria na de absorção no UV-visível, que usa a luz para medir as concentrações das soluções, através da interação da luz com a matéria. O resultado foi obtido por meio da correlação entre o C16-DOX (disperso na NE C16-DOX em mg/mL) e a DOX livre (disperso em PBS em mg/mL) que revelou que a concentração obtida da NE escolhida era de 0,4 mg/mL em concentração de DOX equivalente. É importante ressaltar que a quantidade total utilizada de C16-DOX usado no processo de obtenção da NE foi incorporado dentro da fase descontínua, confirmando que este nanossistema é adequado para carrear pró-fármacos hidrofóbicos com o C16-DOX.

O perfil de liberação da DOX da NE C16-DOX é uma característica fundamental do sistema para o controle de qualidade de formas farmacêuticas. Neste trabalho foi

utilizado a técnica convencional de sacos de diálise e por centrifugação com Amicon® para a tal avaliação. Em ambos os testes, qualitativo e quantitativo, a concentração de DOX foi maior no ambiente ácido em relação ao ambiente neutro. Esses resultados comprovam que a NE C16-DOX libera o fármaco especificamente em valores de pH ácidos. Essa propriedade é favorável no direcionamento para o tumor em função da redução na densidade dos vasos sanguíneos em comparação aos tecidos saudáveis (GATENBY & GILLIES, 2004). Essa condição produz baixo oxigênio e alta tensão de dióxido de carbono, o que acidifica o ambiente e conseqüentemente pode ativar o gatilho de liberação de DOX da NE C16-DOX. Além disso, as organelas das células podem atingir pH ácido no valor de 5, no caso dos endossomos, ou até mesmo no valor de 4, como nos lisossomos. Nesses ambientes internos da célula as ligações hidrazona intracelularmente podem ser clivadas (LI et al., 2016). Em conjunto com o efeito EPR, o ambiente ácido do tumor são os dois mecanismos mais importantes que podem ser explorados com a NE C16-DOX para aumentar a entrega de DOX nos tecidos tumorais.

Uma vez confirmado as características físico-químicas adequadas e a responsividade a pH ácido da NE C16-DOX obtida, procedeu-se testes em modelos *in vitro*.

A citotoxicidade da NE C16-DOX foi avaliada em células tumorais e não tumorais por diferentes ensaios *in vitro*. Dentre as características ideais de uma NE para a terapia do câncer, a de não produzir ou produzir em níveis mínimos efeitos tóxicos em células não tumorais, é uma das premissas mais importantes. As doses utilizadas para os demais testes foram escolhidas após o tratamento das células com 5 diferentes concentrações da NE. Foram testadas tanto a NE contendo o pró-fármaco com a NE vazia, com o intuito de demonstrar a segurança dos constituintes do sistema. Tendo em vista que a NE vazia não apresentou uma toxicidade significativa, reduzindo apenas 15% da viabilidade na célula tumoral (4T1) e menos de 15% na normal (NIH 3T3) com subsequente volta da proliferação, foi considerado com um indício de que a concentração do tensoativo utilizada no nanocarreador não é tóxica para as células. Já foi reportado na literatura que as células normais ativam mecanismos de reparo diante do dano causado por fármacos, enquanto algumas células tumorais são deficientes nestes mecanismos (TIAN et al., 2013). Em conjunto, os dados sugerem que a quantidade de tensoativo utilizado no sistema estava dentro dos padrões de toxicidade. A toxicidade do tensoativo utilizado vem sido bastante discutida nas últimas décadas em razão da perda de viabilidade das células quando em altas concentrações. O Kolliphor® é um tensoativo não iônico que tem sido

utilizado amplamente para dissolver diversos fármacos como a ciclosporina e o diazepam, sendo conhecido também pela sua característica de não ser inerte fisiologicamente, ou seja, ser um composto ativo (DORR, 1994). Sendo assim, atestar a segurança da concentração utilizada no sistema é imprescindível quando a finalidade é a administração parental.

Em relação à atividade antiproliferativa da NE C16-DOX, houve redução significativa nas concentrações testadas na linhagem 4T1. Na linhagem NIH 3T3, não houve redução significativa, com redução de apenas 10% da viabilidade e com subsequente volta da proliferação. Como a inibição da atividade antiproliferativa da DOX já é conhecida, esses testes permitiram uma maior investigação e análise do perfil de antiproliferação da NE e do fármaco livre. Como já dito anteriormente, características físico-químicas da nanopartícula (tamanho, forma, carga, hidrofobicidade e etc) estão relacionadas com a forma de interação das células alvo e aumentam a efetividade da NP no tumor (WIHELM et al., 2016). Outro aspecto observado em relação a interação da NP com as células tumorais é que a rápida proliferação durante a carcinogênese necessita de uma alta demanda energética, que entre outros processos, pode ser suprida pela captura de lipídeos exógenos para obtenção de ácidos graxos. Esse processo é conhecido como lipolítico e pode ser uma das explicações pela maior perda de viabilidade das células tumorais em relação as normais. Além disso, células tumorais possuem mais receptores de lipídeos na sua membrana plasmática do que células normais (ZAIDI et al., 2013).

No teste de adesão celular (RTCA), o fármaco livre e a NE C16-DOX apresentaram um perfil similar na redução da viabilidade. Sendo a DOX um potente antineoplásico citotóxico, já era esperado que em altas concentrações como 100 µg/mL houvesse grandes danos as células. É notável que a NE C16-DOX se mostrou tão potente quanto, confirmando o encapsulamento da DOX e atividade citotóxica com a liberação do fármaco dentro das células. O efeito antiproliferativo do fármaco foi maior neste teste em comparação com o MTT em consequência do tempo de exposição ter sido maior, no caso do teste de adesão celular, as células ficaram em contato direto com o fármaco interruptamente sem a recuperação com meio de cultivo.

Interessantemente, no teste de MTT a NE C16-DOX demonstrou ser maior sensibilidade e consequente redução da viabilidade (85%) nas células resistentes a DOX, diferentemente do fármaco livre. O monitoramento celular em tempo real corroborou o resultado obtido anteriormente com total taxa de perda de viabilidade nas células tratadas com a NE C16-DOX, demonstrando ainda que as células resistentes tratadas com o

fármaco livre voltaram a proliferar após certo tempo. Esse resultado é de suma importância no processo de desenvolvimento de novos medicamentos anticâncer, especialmente devido a problemática da resistência aos fármacos clássicos durante a terapia do câncer. Sendo os dois maiores problemas na quimioterapia os efeitos tóxicos a células normais e o desenvolvimento de resistência aos fármacos pelas células tumorais, a entrega do princípio ativo por nanopartículas é uma forma de superar ambos problemas por meio do direcionamento pro tumor. Algumas nanopartículas tem sido obtidas com a intenção de superar os mecanismo de resistência das células tumorais. Dong e colaboradores (2009) obtiveram nanopartículas lipídicas contendo DOX e paclitaxel; Meng e colaboradores (2010) desenvolveram uma nanopartícula mesoporosa de sílica para a entrega de DOX e de RNA interferente (RNAi) da glicoproteína-P (gpP); Chen e colaboradores (2010) obtiveram lipossomas constituídos de lipídios aniônicos ou catiônicos para entrega simultânea de DOX e RNAi; Wang e colaboradores (2011) desenvolveram um sistema com DOX ligada a superfície de nanopartículas de ouro, e Kievit e colaboradores (2011) optaram pelo desenvolvimento de uma nanopartícula de óxido de ferro contendo DOX. Todas as nanopartículas estudadas tiveram bons resultados citotóxicos, superando a resistência das células tumorais a DOX, porém são sistemas grandiosamente elaborados e de alto custo. Estudos com nanoemulsões, que são nanossistemas de fácil obtenção e baixo custo, são escassos para esse propósito o que torna ainda mais interessante a NE C16-DOX devido aos bons resultados. Os mecanismo de superação da resistência ao fármaco necessita ser mais profundamente estudados em pesquisas posteriores.

O ensaio de hemólise foi realizado complementarmente aos testes de citotoxicidade para confirmar a segurança dos constituintes da NE e do próprio fármaco na concentração obtida de 0,8 mg/mL. Esse teste revelou baixa capacidade hemolítica da formulação contendo DOX, apresentando sutil coloração avermelhada (quantificada em 6%) na suspensão celular quando comparada ao controle positivo. Em relação a NE, não houve indução significativa confirmando mais uma vez a segurança do carreador. A leve alteração eritrocítica causada pela NE C16-DOX pode ser explicada pela sensibilidade das hemácias ao estresse oxidativo, que é um dos mecanismos de ação da DOX, com conseqüente indução de danos às membranas celulares. A indução de hemólise é um teste importante no desenvolvimento de novos nanocarreadores já que existem diversos estudos que apontam a toxicidade da nanoemulsão causada pelo tensoativo utilizando para estabilizar as gotículas de óleo (NORNOO et al., 2008).

A quantificação e a determinação do mecanismo de morte induzida pela NE foi feita por meio da citometria de fluxo para discriminar entre apoptose e necrose, e tem como objetivo auxiliar a elucidar os efeitos citotóxicos causados pela NE. Uma das alterações morfológicas das células apoptóticas é a exposição da fosfatidilserina A na face externa da membrana plasmática. A fosfatidilserina é um fosfolípide encontrado na face interna da membrana de células viáveis e, quando externalizada em células em processo de apoptose, serve tanto para o reconhecimento e remoção de corpos apoptóticos por fagócitos como também proporciona um local de ligação para a proteína anexina V (FADOK et al.,1992). A anexina V, o marcador utilizado, tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípides de membrana plasmática sendo essa ligação uma forte evidência da fase precoce da apoptose (MOCHIZUKI et al.,2003; MOSS & MORGAN, 2004). Já entre as características básicas da necrose, inclui-se o aumento do volume celular, dilatação das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, desagregação dos ribossomos, hidrólise do DNA e perda da integridade de membranas, inclusive dos lisossomos (KOMATSU et al., 2005; KUMAR et al., 2005). A alteração na permeabilidade da membrana, por diminuição nos níveis de ATP, compromete a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  e de outros fenômenos que são ATP-dependentes (TRUMP et al., 1997). Com o rompimento das organelas e da membrana plasmática há a liberação de componentes intracelulares o que leva a uma reação inflamatória local (KERR et al., 1995; BOUJRAD et al., 2007). Para marcação de necrose foi utilizado o 7-AAD, esse marcador foi escolhido por ser detectado no intervalo de espectro no vermelho distante (650 nm), diferentemente do pico de emissão da DOX (590 nm). De acordo com os dados obtidos, houve maior exposição da fosfatidilserina A induzida pelo tratamento com a NE C16-DOX nas concentrações testadas, o que sugere morte pelo processo de apoptose. A indução de apoptose é um processo observado em células tratadas com DOX (YANG et al., 2014). Isso é causado pela interação do fármaco com o núcleo das células, produzindo adutos de DNA ou comprometimento da atividade transcricional, que culminam na ativação da morte celular por apoptose (SWIFT et al., 2006).

A DOX induz diferentes mecanismos de citotoxicidade (intercalação do anel de antraciclina (ANT) no DNA, atuação a nível de membrana celular, indução de estresse oxidativo) que irão variar se o fármaco estiver livre ou nanoestruturado e de acordo com sua forma de interiorização. A exposição de células 4T1 a NE C16-Dox ou à solução de DOX livre, quantitativamente, produziu diferentes cinéticas de internalização do fármaco. Enquanto o fármaco livre foi absorvido 17,7% nos primeiros 120 minutos de exposição,

a DOX da nanoemulsão foi interiorizado 68,2% nos primeiros 15 minutos de exposição.

A maioria das nanopartículas que carregam DOX são capturadas por células utilizando uma via endocítica. Sendo assim, essa possibilidade foi a primeira a ser testada. Entretanto, após testar o processo de interiorização com diferentes tipos de inibidores endocíticos, incluindo um inibidor de ATPase como azida sódica, observou-se que nenhuma das vias endocíticas testadas inibem a absorção de NE C16-DOX. Além disso, as células captaram a mesma quantidade de DOX quando tratadas com a NE C16-DOX a 37 °C e a 4 °C, indicando que a NE C16-DOX foi interiorizada por uma via de difusão independente de energia, através da membrana plasmática, e não por endocitose.

A internalização por difusão pode ocorrer pela fusão de nanogotículas com a membrana celular. Esse mecanismo, mediado por tensoativos, é relatado na literatura (THIAM et al., 2013) e provavelmente foi responsável pelo aprimoramento da interiorização da NE C16-DOX em comparação com DOX livre. Por outro lado, as moléculas DOX livre são absorvidas por mecanismos diferentes que incluem os transportadores de fármacos ativos dependentes de energia presentes na membrana e difusão simples da forma não-iônica da molécula (OKABE et al., 2005). A interiorização passiva das nanogotículas de óleo inteiras, cada uma carregada com várias moléculas de C16-DOX, pode ser responsável pela interiorização mais intensa observada para esta formulação em comparação com DOX livre. Provavelmente, tanto o transporte ativo de DOX livre como sua difusão através da membrana após sua desprotonação são processos comparativamente mais lentos.

Além da diferença na taxa de interiorização de NE C16-DOX e DOX livre, é claro que as células tratadas com DOX livre concentraram este fármaco principalmente no núcleo, mesmo no primeiro ponto de tempo experimental (15 minutos). Em contraste, a DOX do tratamento com NE C16-DOX foi observado primeiro no citoplasma e depois transferido para o núcleo, o que está de acordo com a hipótese de permeação passiva da nanogotículas inteira de NE C16-DOX através da membrana. Uma vez dentro da célula, NE C16-DOX serve como um compartimento de liberação controlada de fármaco, liberando lentamente a DOX, que vai para o núcleo de forma dependente do tempo. Como o mecanismo de ação mais discutido da DOX é a intercalação da molécula com o DNA, prejudicando a atividade transcricional celular, os resultados sugerem que este mecanismo de citotoxicidade da DOX é mantido com a NE C16-DOX.

Correlacionando os dados obtidos *in vitro* de citotoxicidade e de microscopia, sugere-se que a maior fluorescência de DOX livre no núcleo tanto de células 4T1, de

células não-resistentes HeLa e de células resistentes KB-V1 com potente efeito antiproliferativo seja devido ao processo de entrada por difusão, que facilita o transporte intracelular para o núcleo. Há algumas hipóteses para explicar os diferentes perfis de distribuição intracelular da DOX livre e da NE C16-DOX. Uma delas é que, a presença do nanocarreador dificulta a intercalação da DOX com o DNA. O fármaco liberado a partir da NE C16-DOX acumulou-se em maior concentração no citoplasma, o que sugere fusão das nanogotículas com a membrana e que pode ter induzido diferentes mecanismo de ação do fármaco que não a intercalação de DNA. A NE apresentou o mesmo perfil de distribuição intracelular e de citotoxicidade tanto nas células-resistentes quanto nas resistentes. Os mecanismos de resistência a DOX podem também levar ao acúmulo no citoplasma. Uma outra hipótese é sobre o possível efeito de supressão de fluorescência (*quenching*) sofrido pelo fármaco dentro da célula. A DOX livre presente no núcleo tem a fluorescência quenchiada pelo DNA e aumentada pelas histonas, ou seja, a fluorescência é partilhada entre a molécula de DNA (reduzida) e a proteína histona (aumentada). A atividade da DOX no núcleo como principal mecanismo de ação aumenta a eficácia terapêutica. A presença de DOX no citoplasma produz a fluorescência real, nem quenchiada e nem aumentada. Porém, a atividade terapêutica é reduzida. Sendo a fluorescência da DOX passível de diferentes interpretações, faz-se necessário um estudo aprofundado que pode ser feito combinando a microscopia confocal com a técnica de imageamento do tempo de vida de fluorescência (FLIM) para analisar o comportamento da captação celular da NE C16-DOX. O FLIM quantifica por meio de pixels codificados e produz imagens da distribuição espacial da molécula fluorescente em conjunto com informações sobre o seu nanoambiente, dando informações sobre a interação molecular da DOX dentro da célula (DAI et al, 2008; MOHAN & RAPOPORT, 2010). Sendo assim, existe a possibilidade da DOX estar quenchiada no núcleo das células tratadas com NE C16-DOX, sendo a intercalação do DNA seu principal mecanismo de ação, o que justifica o seu potente efeito antiproliferativo e antitumoral.

Um padrão semelhante também foi observado por outros autores (LIANG et al., 2014). O mecanismo de internalização da NE-C16-DOX pode ser utilizado para superar alguns mecanismos de resistência a fármacos. Em geral, os mecanismos de efluxo de antineoplásicos em células tumorais multirresistentes a fármacos envolvem geralmente a captura das moléculas de fármaco isoladas no citoplasma por complexos de proteínas, como a P-glicoproteína, que ativamente joga para fora os agentes anticancerígenos (SWIFT et al., 2006; YAMAGISHI et al., 2013). A formação de um reservatório

intracelular de moléculas de DOX nas células tratadas com NE C16-DOX, tal como descrito acima, pode impedir a interação da DOX com estas proteínas da bomba de efluxo, mantendo assim as moléculas de fármaco disponíveis para exercerem a sua atividade citotóxica.

Após avaliações *in vitro*, os potenciais efeitos *in vivo* da NE C16-DOX foram avaliadas em modelos de camundongos. O primeiro passo foi estabelecer a máxima dose tolerada (MTD) da formulação em animais saudáveis. Os efeitos adversos da DOX é bem conhecido, particularmente a sua cardiotoxicidade potencialmente grave, o que o torna dose-limitante, diminuindo intensamente o seu índice terapêutico. Para o estudo MTD, camundongos saudáveis foram avaliados durante 14 dias após diferentes tratamentos. A NE branca foi utilizada novamente para testar sua segurança em animais devido a presença do tensoativo. Assim como testes anteriores, a NE branca não apresentou toxicidade aos animais aparentando ser bem tolerada sistemicamente. Nos experimentos de MDT, não observamos perda de peso, morte dos camundongos e nem diferença no peso do coração em nenhum dos tratamentos experimentais. Neste delineamento experimental, comparamos a MTD da NE C16-DOX (20 e 40 mg/kg) com a MTD da DOX livre (5, 10 e 20 mg/kg).

Nos camundongos saudáveis, os dados mostram que a NE C16-DOX é mais tolerada em concentrações de pelo menos duas vezes maior do que o fármaco livre, provavelmente devido à sua menor toxicidade sistêmica em comparação com a DOX livre. A prevenção da toxicidade dos fármacos é um dos objetivos dos sistemas de administração de fármacos nanocarreados (GABIZON & GREINER, 2012; AL-JAMAL et al., 2013) e tem sido alvo de vários estudos. O aumento da tolerabilidade da DOX associado ao NE C16-DOX pode ser devido à alteração na sua farmacocinética ou mesmo a dinâmica intracelular alterada, como discutido anteriormente.

Na avaliação da eficácia terapêutica da NE C16-DOX foi possível observar que apesar da redução do volume tumoral ter sido significativamente maior no grupo tratado com NE C16-DOX (20 mg/kg) comparado ao grupo não-tratado, a concentração escolhida de 20 mg/kg não foi suficiente para reduzir o tamanho do tumor possibilitando a sobrevida dos animais. Os animais deste grupo vieram a óbito ao final do experimento possivelmente devido a presença de metástase no pulmão, consequência já relatada das células 4T1 (LONGO et al., 2016). Já no grupo tratado com DOX livre (20 mg/kg) observou-se redução significativa em relação ao grupo não-tratado porém essa dose foi demasiadamente tóxica, causando mortalidade de todos os camundongos até o 20º dia

após a administração do fármaco.

Em relação aos estudos de biodistribuição, a NE C16-DOX apresentou um perfil farmacocinético significativamente diferente quando comparado com a DOX livre em camundongos portadores de tumor após 12 horas de tratamento. A acumulação de DOX nos tumores foi observada em camundongos portadores de tumor tratados tanto com DOX livre quanto com a NE C16-DOX, mas a intensidade e cinética de acumulação foram bastante diferentes entre estes dois tratamentos. Os animais tratados com a NE C16-DOX apresentaram uma concentração significativamente maior do fármaco no tecido tumoral em comparação com a DOX livre. Após 4 horas de administração, a quantidade de DOX no tumor não foi significativamente diferente entre os grupos, mas observou-se uma tendência de acúmulo mais notável de DOX nos tumores de animais tratados com a NE C16-DOX. Em 12 horas, no entanto, a concentração de DOX nos tumores de animais tratados com a NE C16-DOX aumentou significativamente, enquanto a concentração de DOX diminuiu em tumores dos animais tratados com o fármaco livre. Esse resultado sugere que a NE C16-DOX circulante se acumulou de forma progressiva no tecido tumoral, um efeito que pode ser causado tanto ao efeito EPR quanto a liberação da DOX acionada pelo pH ácido. O diâmetro hidrodinâmico da NE C16-DOX ( $\pm 30$  nm) está bem abaixo do tamanho relatado das fenestras presentes nas microvasculaturas do tumor (200 a 800 nm), o que pode ajudar as nanogotículas a se acumular passivamente no interstício do tumor. Além disso, a pobre drenagem linfática de tumores sólidos também pode ajudar a restringir a depuração das nanogotículas da NE C16-DOX no tecido tumoral. Uma vez no interstício do tumor, as nanopartículas podem atingir uma concentração de equilíbrio e retornar à corrente sanguínea. No entanto, dois outros eventos possíveis provavelmente ocorrem nesta situação: 1) as nanogotículas fechadas são facilmente interiorizadas por células cancerosas por meio de um mecanismo passivo, como observado nas experiências *in vitro* anteriormente descritas; 2) a liberação de DOX desencadeada pelo pH, observado nos experimentos, pode levar a uma acumulação mais intensa deste fármaco nos espaços intersticiais do tumor em comparação com os tecidos normais. A acumulação da NE C16-DOX em tumores também depende do tempo de circulação. Os resultados mostraram uma taxa de depuração mais lenta de NE C16-DOX em comparação com o fármaco livre. De fato, a literatura (SAHOO & LABHASETWAR, 2003; MALAM et al., 2009) mostra que nanocarreadores podem contornar a excreção renal e o metabolismo hepático, aumentando assim a biodisponibilidade de medicamentos. Da mesma forma, todos os outros órgãos avaliados apresentaram maior concentração de DOX quando os

camundongos foram tratados com NE C16-DOX, exceto os rins. Este padrão foi particularmente o caso dos pulmões e baço 12 horas após a administração. Uma vez que o sangue não foi removido dos órgãos, esses resultados podem ser correlacionados com a presença de DOX dentro do compartimento do plasma, aumentando assim a quantidade de quantificação do fármaco. Vale ressaltar que, mesmo com essa quantificação de órgãos, os camundongos tratados com NE C16-DOX, em ambas as concentrações (20 e 40 mg/kg), não apresentaram sinais significativos de toxicidade. Na verdade, dependendo do tamanho do nanocarreador, as drogas podem ser impedidas de atingir alguns órgãos específicos, como o coração, os rins e os tecidos gastrointestinais, diminuindo a toxicidade do fármaco para esses órgãos (BERTRAND & LEROUX, 2012).

## 7. CONCLUSÃO

Em sumário, o presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

1. As nanoemulsões contendo o pró-fármaco pH-sensível C16-DOX são estáveis macroscopicamente, responsivas a pH, monodispersas e apresentaram características físico-químicas ideais para sua aplicação em sistemas biológicos;
2. A atividade da NE C16-DOX diferiu entre os tipos celulares apresentando-se mais citotóxica frente a células 4T1 do que a células NIH 3T3 além de reverter a resistência a DOX de células KB-V1, mesmo nas menores concentrações, já a NE branca não apresentou citotoxicidade relevante *in vitro* e não induziu hemólise. A NE C16-DOX induziu a exposição de fosfatidilserina, apresentando assim atividade pró-apoptótica;
3. Os inibidores de endocitose não afetaram a captação da DOX nas células tratadas com a NE C16-DOX sugerindo difusão simples;
4. A DOX livre se concentrou mais rapidamente no núcleo das células enquanto que a DOX da NE C16-DOX se acumulou de forma progressiva;
5. A NE C16-DOX mostrou-se um nanocarreador seguro em camundongos saudáveis mesmo na maior concentração de 40 mg/kg e no tumor, a DOX da NE C16-DOX se acumulou em maior quantidade após 12 horas em enquanto que o fármaco livre diminuiu a concentração com o passar das horas. Houve significativamente maior concentração de DOX no tumor de camundongos tratados com NE C16-DOX do que nos outros órgãos analisados.

Em resumo, apresentamos e discutimos a combinação de dois conceitos farmacológicos: (1) um pró-fármaco sensível a pH ácido (C16-DOX); e (2) um nanocarreador (NE C16-DOX) para melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade sistêmica da DOX em um modelo experimental de câncer de mama. O complexo NE C16-DOX desenvolvido revelou-se útil: para liberar DOX em condições ácidas específicas; para reverter a multirresistência de quimioterápicos em células; e para aumentar o acúmulo de DOX nos tecidos tumorais. Além disso, a NE C16-DOX não foi tóxica em camundongos saudáveis e permitiu a administração de doses mais elevadas de DOX sem efeitos

colaterais relevantes. Em conjunto, esses resultados indicam que a NE C16-DOX é um nanocarreador promissor para o tratamento do câncer, criando possíveis oportunidades para translacionar futuramente esses conceitos de nanotecnologia para aplicações clínicas.

## REFERÊNCIAS

- ADÃO, R., DE KEULENAER, G., LEITE-MOREIRA, A., BRÁS-SILVA, C. Cardiotoxicity associated with cancer therapy: Pathophysiology and prevention. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 32, n. 5, p. 395-409, 2013.
- ALBANESE, A., TANG, P. S., CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annual review of biomedical engineering**, v.14, p. 1-16, 2012.
- AL-JAMAL, K. T., AL-JAMAL, W. T., WANG, J. T. W., RUBIO, N., BUDDLE, J., GATHERCOLE, D. & KOSTARELOS, K. Cationic poly-L-lysine dendrimer complexes doxorubicin and delays tumor growth in vitro and in vivo. **ACS nano**, v. 7, n. 3, p. 1905-1917, 2013.
- ALKHATIB, M. H., ALKREATHY, H. M., BALAMASH, K. S., ABDU, F. Antitumor activity of doxorubicine-loaded nanoemulsion against Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5, p. 937-943, 2016.
- ANOTHASINTAWEE, T., WIRATKAPUN, C., LERDSITTHICHAJ, P., KASAMESUP, V., WONGWAISAYAWAN, S., SRINAKARIN, J., THAKKINSTIAN, A. Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Asia Pacific Journal of Public Health**, v. 25, n. 5, p. 368-387, 2013.
- ASHIKAWA, K., SHISHODIA, S., FOKT, I., PRIEBE, W., AGGARWAL, B. B. Evidence that activation of nuclear factor- $\kappa$ B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. **Biochemical pharmacology**, v. 67, n. 2, p. 353-364, 2004.
- BAE, Y., NISHIYAMA, N., FUKUSHIMA, S., KOYAMA, H., YASUHIRO, M., KATAOKA, K. Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy. **Bioconjugate chemistry**, v. 16, n. 1, p. 122-130, 2005.
- BARENHOLZ, Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of controlled release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.
- BERTRAND, N., LEROUX, J. C. The journey of a drug-carrier in the body: an anatomophysiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 152-163, 2012.
- BERTUCCI, FRANÇOIS; BIRNBAUM, DANIEL. Reasons for breast cancer heterogeneity. **Journal of Biology**, v. 7, n. 2, p. 6, 2008.
- BOUCEK, R. J., OLSON, R. D., BRENNER, D. E., OGUNBUNMI, E. M., INUI, M., FLEISCHER, S. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 33, p. 15851-15856, 1987.
- BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-mediated programmed necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, n.21, p. 2612-2619, 2007.

CAMARA, A. L., SILVA, J. R., & FIGUERO LONGO, J. P. pH-sensitive nanoparticles for cancer therapy: Is this a real innovation in nanomedicine. **Nano Research Application**, v. 2, n. 2, e. 19, 2017.

CHABNER, BRUCE A.; LONGO, DAN L. **Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice**. Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

CHEN, Y., BATHULA, S. R., LI, J., & HUANG, L. Multifunctional nanoparticles delivering small interfering RNA and doxorubicin overcome drug resistance in cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22639-22650, 2010.

CHIA, S.; BRYCE, C.; GELMON, K. The 2000 EBCTCG overview: a widening gap. **The Lancet**, v. 365, n. 9472, p. 1665-1666, 2005.

CHO, K., WANG, X. U., NIE, S., SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical cancer research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, 2008

CHUNG, M. C., SILVA, A. T. D. A., CASTRO, L. F., GÜIDO, R. V. C., NASSUTE, J. C., FERREIRA, E. I. Latentiation and advanced drug transport forms. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 155-180, 2005.

CULLINANE, C., CUTTS, S. M., VAN ROSMALEN, A., PHILLIPS, D. R. Formation of adriamycin-DNA adducts *in vitro*. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 12, p. 2296-2303, 1994.

DAI, X., YUE, Z., ECCLESTON, M. E., SWARTLING, J., SLATER, N. K., & KAMINSKI, C. F. Fluorescence intensity and lifetime imaging of free and micellar-encapsulated doxorubicin in living cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 49-56, 2008.

DE OLIVEIRA, M. C., FATTAL, E., COUVREUR, P., LESIEUR, P., BOURGAUX, C., OLLIVON, M., DUBERNET, C. pH-sensitive liposomes as a carrier for oligonucleotides: a physico-chemical study of the interaction between DOPE and a 15-mer oligonucleotide in quasi-anhydrous samples. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1372, n. 2, p. 301-310, 1998.

DENT, R., TRUDEAU, M., PRITCHARD, K. I., HANNA, W. M., KAHN, H. K., SAWKA, C. A. NAROD, S. A. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 15, p. 4429-4434, 2007.

DONG, X., MATTINGLY, C. A., TSENG, M. T., CHO, M. J., LIU, Y., ADAMS, V. R., MUMPER, R. J. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. **Cancer research**, v. 69, n. 9, p. 3918-3926, 2009.

DORR, R. T. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. **Annals of Pharmacotherapy**, 28(5\_suppl), S11-S14, 1994.

DUFRESNE, M. H., LE GARREC, D., SANT, V., LEROUX, J. C., RANGER, M. Preparation and characterization of water-soluble pH-sensitive nanocarriers for drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 277, n. 1, p. 81-90, 2004.

EROLE, P., BOSCH, A., PÉREZ-FIDALGO, J. A., LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer treatment reviews**, v. 38, n.6, p. 698-707, 2012.

ETTMAYER, P., AMIDON, G. L., CLEMENT, B., & TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **Journal of medicinal chemistry**, v.47, n. 10, p. 2393-2404, 2004.

FADOK, V. A., SAVILL, J. S., HASLETT, C., BRATTON, D. L., DOHERTY, D. E., CAMPBELL, P. A., HENSON, P. M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 12, p. 4029-4035, 1992.

FERREIRA, L. A. B., RADAIC, A., PUGLIESE, G. O., VALENTINI, M. B., OLIVEIRA, M. R., DE JESUS, M. B. Endocitose e tráfego intracelular de nanomateriais. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 2, p. 149-166, 2014.

FRICHE, E., DANKS, M. K., SCHMIDT, C. A., BECK, W. T. Decreased DNA topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer research*, v. 51, n. 16, p. 4213-4218, 1991.

FRYD, M. M., MASON, T. G. Advanced nanoemulsions. **Annual review of physical chemistry**, v. 63, p. 493-518, 2012.

GABIZON, A., SHMEEDA, H., GREINER, T. Pharmacological basis of pegylated liposomal doxorubicin: impact on cancer therapy. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 45, n. 4, p. 388-398, 2012.

GANTA, S., DEVALAPALLY, H., SHAHIWALA, A., & AMIJI, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of controlled release**, v. 126, n. 3, p. 187-204, 2008.

GATENBY, R. A., & GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-899, 2004.

HAN, H. K., AMIDON, G. L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. **The AAPS Journal**, v. 2, n. 1, p. 48-58, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HOFMANN, G.A.; MATTERN, M.R. Topoisomerase II in multiple drug resistance. **Cytotechnology**, v. 12, n. 1, p. 137-154, 1993.

HOLOHAN, C., VAN SCHAEYBROECK, S., LONGLEY, D. B., JOHNSTON, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n.10, p. 714-726, 2013.

INCA (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). ESTIMATIVA 2016: **Incidência do câncer no Brasil**. 2016. 1-126 p.

IVERSEN, T. G., SKOTLAND, T., SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, v. 6, n.2, p. 176-185, 2011.

JOHNSTON, S.R.D. The role of chemotherapy and targeted agents in patients with metastatic breast cancer. **European journal of cancer**, v. 47, p. S38-S47, 2011.

KARIMI, Z., ABBASI, S., SHOKROLLAHI, H., YOUSEFI, G., FAHHAM, M., KARIMI, L., FIRUZI, O. Pegylated and amphiphilic Chitosan coated manganese ferrite

- nanoparticles for pH-sensitive delivery of methotrexate: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 504-511, 2017.
- KERR, J. F., GOBÉ, G. C., WINTERFORD, C. M., HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods in cell biology**, v. 46, p. 1-27, 1995.
- KIEVIT, F. M., WANG, F. Y., FANG, C., MOK, H., WANG, K., SILBER, J. R. ZHANG, M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. **Journal of controlled release**, v. 152, n. 1, p. 76-83, 2011.
- KOMATSU, M., WAGURI, S., UENO, T., IWATA, J., MURATA, S., TANIDA, I., EZAKI, J., MIZUSHIMA, N., OHSUMI, Y., UCHIYAMA, Y., KOMINAM, EI, TANAKA, K., CHIBA, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v.169, p. 425-434, 2005.
- KOUSHIK, O., RAO, Y., KUMAR, P., & KARTHIKEYAN, R. Nano drug delivery systems to overcome cancer drug resistance-a review. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 7, n. 378, p. 2, 2016.
- KRÜGER, H. R., NAGEL, G., WEDEPOHL, S., CALDERÓN, M. (2015). Dendritic polymer imaging systems for the evaluation of conjugate uptake and cleavage. **Nanoscale**, v. 7, n. 9, p. 3838-3844.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptação, dano e morte celular. In: Bases patológicas das doenças, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 1, p. 3-48, 2005.
- LAI, P. S., LOU, P. J., PENG, C. L., PAI, C. L., YEN, W. N., HUANG, M. Y., SHIEH, M. J. Doxorubicin delivery by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization for cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 122, n. 1, p. 39-46, 2007.
- LEE, T.W.Y, ROBINSON, J.T. Controlled-Release Drug-Delivery Systems. In: **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**, p.933-960, 2004.
- LEHMANN, M., FRANCO, A., VILAR, K. D. S. P., REGULY, M. L., DE ANDRADE, H. H. R. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 539, n. 1, p. 167-175, 2003.
- LI, X. G., HALUSKA, P., HSIANG, Y. H., BHARTI, A., KUFE, D. W., RUBIN, E. H. Identification of topoisomerase I mutations affecting both DNA cleavage and interaction with camptothecin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 803, n. 1, p. 111-127, 1996.
- LI, Y., YANG, H. Y., LEE, D. S. Polymer-based and pH-sensitive nanobiosensors for imaging and therapy of acidic pathological areas. **Pharmaceutical research**, v. 33, n. 10, p. 2358-2372, 2016.
- LIANG, M., FAN, K., ZHOU, M., DUAN, D., ZHENG, J., YANG, D. YAN, X. H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 41, p. 14900-14905, 2014.

- LIU, F., LIN, S., ZHANG, Z., HU, J., LIU, G., TU, Y., MIAO, L. pH-responsive nanoemulsions for controlled drug release. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 3, p. 968-977, 2014.
- LIU, L. F. et al. Mechanism of action of camptothecin. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 922, n. 1, p. 1-10, 2000.
- LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005.
- LONGO, J. P. F., MUEHLMANN, L. A., ALMEIDA-SANTOS, M. F. M., AZEVEDO, R. B. Preventing metastasis by targeting lymphatic vessels with photodynamic therapy based on nanostructured photosensitizers. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 6, n.5, p. 1. 2015.
- LONGO, J. P. F., MUEHLMANN, L. A., MIRANDA-VILELA, A. L., PORTILHO, F. A., DE SOUZA, L. R., SILVA, J. R., AZEVEDO, R. B. Prevention of Distant Lung Metastasis After Photodynamic Therapy Application in a Breast Cancer Tumor Model. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 689-699, 2016.
- LORUSSO, D., DI STEFANO, A., CARONE, V., FAGOTTI, A., PISCONTI, S., & SCAMBIA, G. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot'syndrome). **Annals of Oncology**, v. 18, n. 7, p. 1159-1164, 2007.
- MACHADO, V., CABRAL, A., MONTEIRO, P., GONÇALVES, L., & PROVIDÊNCIA, L. A. O Carvedilol como protetor da cardiotoxicidade induzida pelas Antraciclina (Doxorrubicina). **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 27, n. 10, p. 1277-1296, 2008.
- MALAM, Y., LOIZIDOU, M., SEIFALIAN, A. MLiposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. **Trends in pharmacological sciences**, v. 30, n. 11, p. 592-599, 2009.
- MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 41, p. R635, 2006.
- MATSUMURA, Y., MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer research**, v. 46, n. 12 Part 1, p. 6387-6392, 1986.
- MENG, H., LIONG, M., XIA, T., LI, Z., JI, Z., ZINK, J. I., NEL, A. E. Engineered design of mesoporous silica nanoparticles to deliver doxorubicin and P-glycoprotein siRNA to overcome drug resistance in a cancer cell line. **ACS nano**, v. 4, n. 8, p. 4539-4550, 2010.
- MOCHIZUKI, T., KUGE, Y., ZHAO, S., TSUKAMOTO, E., HOSOKAWA, M., STRAUSS, H. W. TAMAKI, N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with 99mTc-annexin V. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 1, p. 92-97, 2003.
- MOHAN, P., RAPOPORT, N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. **Molecular pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1959-1973, 2010.

MOSCICKI, A. B., SCHIFFMAN, M., KJAER, S., VILLA, L. L. Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S42-S51, 2006.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol. Methods**, v. 65, p. 55–63. 1983

MOSS, S. E. MORGAN, R. O. The annexins. **Genome biology**, v. 5, n. 4, p. 219, 2004.

MUEHLMANN, L. A., RODRIGUES, M. C., LONGO, J. P. F., GARCIA, M. P., PY-DANIEL, K. R., VELOSO, A. B., AZEVEDO, R. B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 36, 2015.

NICHOLS, J. W., & BAE, Y. H. Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action. **Nano today**, v. 7, n. 6, p. 606-618, 2012.

NIH (National Institutes of Health. National Cancer Institute). What do you need to know about breast cancer. **NIH Publication**, v. 05, p.1556, 2005.

NORNOO, A. O., OSBORNE, D. W., & CHOW, D. S. L. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel: I: Formulation, cytotoxicity and hemolysis. **International journal of pharmaceutics**, v. 349, n. 1, p. 108-116, 2008.

OKABE, M., UNNO, M., HARIGAE, H., KAKU, M., OKITSU, Y., SASAKI, T. MATSUNO, S. Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 333, n. 3, p. 754-762, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Administração da OMS**. Disponível em: Acesso em: 17. Jan.2014.

PARHI, P., MOHANTY, C., & SAHOO, S. K.). Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 17-18, p. 1044–1052, 2012.

PASZKO, E., EHRHARDT, C., SENGE, M. O., KELLEHER, D. P., REYNOLDS, J. V. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n.1, p. 14–29, 2011.

PATRICK, M. J., JANJIC, J. M., TENG, H., O'HEAR, M. R., BROWN, C. W., STOKUM, J. A., WAGGONER, A. S. Intracellular pH measurements using perfluorocarbon nanoemulsions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 49, p. 18445-18457, 2013.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

POLLOCK, R. E. **Manual de Oncologia Clínica**. 8ªed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p.10, 2006.

PORUMB, HOREA; PETRESCU, IOAN. Interaction with mitochondria of the anthracycline cytostatics adriamycin and daunomycin. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 48, n. 2, p. 103-125, 1986.

QIN, S. Y., ZHANG, A. Q., CHENG, S. X., RONG, L., ZHANG, X. Z. Drug self-delivery systems for cancer therapy. **Biomaterials**, v. 112, p. 234-247, 2017.

ROBBINS, T., COTRAN, R.S., KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.

ROMERO, A., RUIZ, B., SOHNG, J. K., KOIRALA, N., RODRÍGUEZ-SANOJA, R., & SÁNCHEZ, S. Functional Analysis of the GlcP promoter in *Streptomyces peuceitius* var. *caesius*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 6, p. 3207-3217, 2015.

SAHOO, S. K., & LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug discovery today*, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signal using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v.76, p.733-737, 2007.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24, 2010.

SILVA J.O., FERNANDES R.S., LOPES S.C., CARDOSO V.N., LEITE E.A. pH-sensitive, long-circulating liposomes as an alternative tool to deliver doxorubicin into tumors: A feasibility animal study. **Molecular imaging and biology** v. 18, n. 6, p. 898-904, 2016.

ŠIMŮNEK, T., ŠTĚRBA, M., POPELOVÁ, O., ADAMCOVÁ, M., HRDINA, R., & GERŠL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 154-171, 2009.

SOLANS, C., & SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246-254, 2012.

SOLÉ, I., SOLANS, C., MAESTRO, A., GONZÁLEZ, C., GUTIÉRREZ, J. M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of colloid and interface science**, v. 376, n. 1, p. 133-139, 2012.

SORLIE, T., TIBSHIRANI, R., PARKER, J., HASTIE, T., MARRON, J. S., NOBEL, A. DEMETER, J. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, 2003.

STEWART, B. W. K. P.; WILD, C. P. World cancer report 2014. 2014. **Lyon CEDEX, France**, 2014.

SWIFT, L. P., REPHAELI, A., NUDELMAN, A., PHILLIPS, D. R., CUTTS, S. M. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer research**, v. 66, n. 9, p. 4863-4871, 2006.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, v. 108, p. 303-318, 2004.

- TANG, S., MENG, Q., SUN, H., SU, J., YIN, Q., ZHANG, Z., LI, Y. Dual pH-sensitive micelles with charge-switch for controlling cellular uptake and drug release to treat metastatic breast cancer. **Biomaterials**, v. 114, p. 44-53, 2017.
- THIAM, A. R., FARESE JR, R. V., WALTHER, T. C. The biophysics and cell biology of lipid droplets. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 14, n. 12, p. 775-786, 2013.
- TIAN, J., DOI, H., SAAR, M., SANTOS, J., LI, X., PEEHL, D. M., KNOX, S. J. Radioprotection and cell cycle arrest of intestinal epithelial cells by darinaparsin, a tumor radiosensitizer. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 87, n. 5, p. 1179–1185, 2013.
- TREVISAN, M. G.; POPPI, R. J. Determination of doxorubicin in human plasma by excitation–emission matrix fluorescence and multi-way analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 493, p. 69–81, 2003
- TRUMP, B. E., BEREZESKY, I. K., CHANG, S. H., PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic pathology**, v. 25, n. 1, p. 82-88, 1997.
- VERMA, A., STELLACCI, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. **Small**, v. 6, n. 1, p. 12-21, 2010.
- WANG, F., WANG, Y. C., DOU, S., XIONG, M. H., SUN, T. M., & WANG, J. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. **ACS nano**, v. 5, n. 5, p. 3679-3692, 2011.
- WEST, K. R., & OTTO, S. Reversible covalent chemistry in drug delivery. **Current drug discovery technologies**, v. 2, n. 3, p. 123-160, 2005.
- WILHELM, S., TAVARES, A. J., DAI, Q., OHTA, S., AUDET, J., DVORAK, H. F., CHAN, W. C. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature Reviews Materials**, 1, 16014. 2016.
- XIANG, T., ANDERSON, B. D. Liposomal drug transport. A molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers, v. 58, p. 1357–1378, 2006.
- YAMAGISHI, T., SAHNI, S., SHARP, D. M., ARVIND, A., JANSSON, P. J., RICHARDSON, D. R. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 44, p. 31761-31771, 2013.
- YANG, F., TEVES, S. S., KEMP, C. J., & HENIKOFF, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014.
- YUAN, F., DELLIAN, M., FUKUMURA, D., LEUNIG, M., BERK, D. A., TORCHILIN, V. P., JAIN, R. K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size1, v. 55, n. 17, p. 3752-3756, 1995.
- ZAIDI, N., LUPIEN, L., KUEMMERLE, N. B., KINLAW, W. B., SWINNEN, J. V., & SMANS, K. Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 4, p. 585-589, 2013.

ZHENG, A., WANG, W., ZHANG, H., & WANG, B. Two new improved approaches to the synthesis of coumarin-based prodrugs. **Tetrahedron**, 55(14), 4237-4254, 1999.

ZHIVOTOVSKY, B., SAMALI, A., GAHM, A., ORRENIUS, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 7, p. 644-651, 1999.

ZIYAD, S.; IRUELA-ARISPE, M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. **Genes & cancer**, v. 2, n. 12, p. 1085-1096, 2011.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342, 2002.

**ANEXO A – Artigo “Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs tumor lung metastasis in a breast cancer model” publicado na Nanomedicine**

***Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs tumor growth and prevents distant lung metastasis in a breast cancer mice model***

Ana Lygia dos Santos Câmara<sup>1§</sup>, Gregor Nagel<sup>2§</sup>, Harald R. Tschiche<sup>2</sup>, Camila Magalhães Cardador<sup>1</sup>, Luis Alexandre Muehlmann<sup>1,3</sup>, Ricardo Bentes Azevedo<sup>1</sup>, Marcelo Calderón<sup>2</sup>, João Paulo Figueiró Longo<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil;

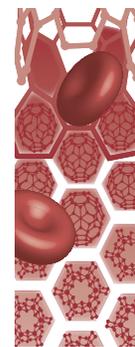
<sup>2</sup>Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Takustrasse 3, Berlin 14195, Germany;

<sup>3</sup>Faculty of Ceilandia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil;

§ These authors contributed equally

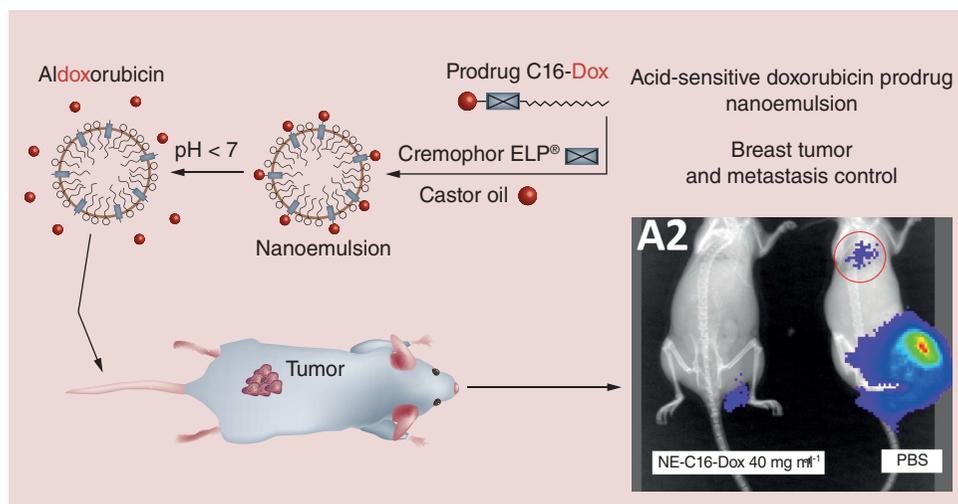
\*Corresponding author: Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil. Tel: +55 61 3107-3087, FAX +55 61 81432755. E-mail address: [jplongo82@gmail.com](mailto:jplongo82@gmail.com)

**Acknowledgments:** Financial support from the Brazilian agencies MCT/CNPq, FAP/DF, CAPES, and INCT-Nanobiotechnology is gratefully acknowledged. Furthermore, the authors would like to thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) through the ThermoNanogele NanoMatFutur award (13N12561), the Alexander von Humboldt foundation program CONNECT and the Freie Universität Focus Area Nanoscale.



# Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model

**Aim:** To develop an acid-sensitive lipidated, doxorubicin (Dox) prodrug (C16-Dox) to be entrapped in lipid nanoemulsion (NE-C16-Dox) as a nanocarrier to treat breast cancer models (*in vitro* and *in vivo*). **Results:** We report the efficacy of NE-C16-Dox in *in vitro* experiments, as well as the improved chemotherapeutic index and tumor-control efficacy compared with treatment with free Dox in an *in vivo* murine 4T1 breast cancer model. In addition, NE-C16-Dox allowed the use of a higher dose of Dox, acceptable biocompatibility and a significant reduction in lung metastasis. **Conclusion:** Taken together, these results indicate that NE-C16-Dox is promising for breast cancer treatment, thus creating possibilities to translate these nanotechnology concepts to clinical applications.



First draft submitted: 20 March 2017; Accepted for publication: 19 June 2017; Published online: 13 July 2017

**Keywords:** breast cancer • doxorubicin • drug delivery • metastasis • nanoemulsion • pH-sensitive

Doxorubicin (Dox) is one of the most frequently used antineoplastic drugs worldwide. Due to its broad spectrum of activity, this molecule has been included in several clinical chemotherapeutic protocols for different cancers such as breast cancer [1,2]. As a small molecule, Dox is widely distributed in

tissues and rapidly cleared from the body by renal and biliary excretion. The pharmacokinetic profile of Dox is strongly related to its physicochemical characteristics, especially its hydrophilicity, which favors renal excretion and significantly reduces its plasma half-life, less than 1 h [3], which impairs the delivery to

Ana Lygia dos Santos Câmara<sup>†1</sup>, Gregor Nagel<sup>†,2</sup>, Harald R Tschiche<sup>2</sup>, Camila Magalhães Cardador<sup>1</sup>, Luis Alexandre Muehlmann<sup>1,3</sup>, Daniela Mara de Oliveira<sup>1</sup>, Paula Queiroz Alvim<sup>1</sup>, Ricardo Bentes Azevedo<sup>1</sup>, Marcelo Calderón<sup>2</sup> & João Paulo Figueiró Longo<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics & Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil

<sup>2</sup>Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Takustrasse 3, Berlin 14195, Germany

<sup>3</sup>Faculty of Ceilandia, University of Brasília, Brasília, Brazil

\*Author for correspondence:

Tel.: +55 61 3107 3087

Fax: +55 61 98143 2755

[jplongo82@gmail.com](mailto:jplongo82@gmail.com)

<sup>†</sup>Authors contributed equally

target tumor tissues. Within this context, Dox presents a narrow therapeutic window, which cause important side effects observed during its clinical use, specially cardiotoxicity and myelosuppression, both dose-limiting effects [4].

To overcome these drawbacks, drug delivery systems were developed to increase the efficacy and reduce side effects of Dox. Special attention has been devoted to nanocarriers since the enhanced permeability and retention (EPR) effect was described in the 1980s [5,6]. The EPR effect is a phenomenon related to the biology of some solid tumor types. Due to the rapid proliferation of tumor tissue, angiogenesis produces aberrant blood vessels, which show a high permeability. Additionally, tumor tissue has a low density of lymphatic vessels, which decreases the clearance of molecules and particles from the interstitial space, leading to the retention of materials reaching the tumor interstitium [6,7].

The key point of EPR-based delivery of macromolecular structures to tumors is the cut-off size of the pore vessels in defective tumor (up to 100–500 nm) and in healthy tissues (1–80 nm). The carrier can passively permeate the tumor vasculature, but not that of most normal tissues, increasing the chemotherapeutic index of the loaded drug [6]. Nowadays, several examples of anticancer drug-loaded nanocarriers may be mentioned, such as liposomes and polymeric systems, which have been in clinical use in recent decades [8,9].

Despite the improved pharmacokinetic profile of drugs loaded into nanocarriers, much of the drug still accumulates in nontarget organs like heart, liver and skin. To solve these problems, several authors, including our research group [10–14], have proposed the development of nanocarriers able not only to entrap or conjugate molecules, but also to control drug release using different types of external triggers, for example, pH, temperature and light. This strategy aims to increase the delivery of drugs to target tumor tissues and control the release of those molecules under specific conditions presented only in tumor tissues.

This evolution can be achieved by the combination of conventional nanocarriers with prodrugs. Prodrugs are defined as inactive drug complexes formed by the chemotherapeutic compound and a molecular trigger system that can be used in their pristine form or associated with different types of nanocarriers to release the active drug under specific environmental conditions [12]. These drug conjugates are designed to release active compounds specifically under certain conditions in tumor microenvironment and within intracellular organelles, thus increasing the drugs therapeutic index. We found the broadly used pH-sensitive linkage

through a hydrazone bond to be best suited to application in cancer therapy, as also shown by the prodrug aldoxorubicin, which is currently in clinical trial Phase III [15].

In this work, we designed a nanocarrier based on a self-assembling lipid nanoemulsion (NE) containing the prodrug C16-Dox. C16-Dox consists of lipidated and pH-sensitive form of Dox, formed by a 1-hexadecanethioether chain conjugated to aldoxorubicin. Due to the high hydrophobicity of the alkyl chain in C16-Dox, it can be loaded in a lipid NE (NE-C16-Dox). Here, we combine NE, as a nanocarrier, and the pH-sensitive prodrug C16-Dox to incorporate the properties of both into a drug delivery system and to increase the efficacy of cancer therapy.

In short, this report presents a pH-sensitive Dox nanoformulation (NE-C16-Dox), traced from the synthesis and formulation steps to its application in an *in vitro* and *in vivo* breast tumor model (4T1 cells) in mice. The formulation of NE-C16-Dox allowed the use of a higher Dox dose with our experimental conditions, acceptable biocompatibility, increased Dox delivery to tumor tissues and a significant reduction of distant lung metastasis. We propose that metastasis prevention was achieved after the disruption of a condition of immune suppression observed in experimental mice. The super production of a specific subset of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) that protect tumor cells against immune surveillance was impaired in tumor-bearing mice treated with NE-C16-Dox [16]. This result is strongly correlated with the recovery of immune surveillance against tumor cells and might involve one of the biological mechanisms involved in the metastasis prevention observed in these experimental mice. These results together led to an improved chemotherapeutic index and to tumor-control efficacy, when comparing the effects of NE-C16-Dox and free Dox treatments.

## Methods

### C16-Dox synthesis

The lipidated version of the prodrug aldoxorubicin (AdooQ Bioscience, CA, USA [INNO-206]) was prepared by adding a solution of 1-hexadecanethiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (49.3 mg, 191 mmol) in DCM (dichloromethane, Fisher Chemical, NC, USA) (3 ml) to aldoxorubicin HCl salt (30 mg, 38 mmol) in methanol (3 ml). The mixture was stirred for 2 h (25°C). The thiol-containing alkyl tail readily reacted with the maleimide group of the aldoxorubicin in a Michael addition reaction. After completion, the reaction mixture was precipitated in ice-cold diethyl ether (VWR Chemicals, Radnor, PA, USA) then dried in vacuum.

### Preparation & colloidal properties of NE C16-Dox

The self-assembling lipid NE containing C16-Dox (NE-C16-Dox) was prepared using the autoemulsification method [17]. The obtained NEs (PEG-35-castor oil and castor oil, Sigma-Aldrich) had final equivalent Dox concentrations of 0.22, 0.44 or 0.66 mg ml<sup>-1</sup>. Colloidal Properties were measured according to Muehlmann *et al.* [17].

### Fluorescence microscopy

Murine mammary tumor cells (ATCC number CRL-2539) were incubated with NE-C16-Dox (equivalent to 100 µg Dox ml<sup>-1</sup>) and free Dox (100 µg ml<sup>-1</sup>). After different time points (15, 60 and 120 min), after exposure time at 37°C, cells were stained with 4S',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma-Aldrich) 1 µg ml<sup>-1</sup>, imaged by fluorescence microscopy and analyzed in ImageJ (NIH). The amount of Dox was quantified by fluorescence measuring the nucleus of ten cells. For each cell, the red fluorescence was measured in at least five different points.

### Mechanism of uptake

Cells were preincubated (30 min) with endocytosis inhibitors: nystatin (10 µg ml<sup>-1</sup>), cytochalasin D (0.5 µM), amiloride (0.1 mM) and azide (100 mM) (Sigma-Aldrich), incubation at 4°C. After this initial period, treatments were added using 100 µg ml<sup>-1</sup> (Dox equivalent) of NE-C16-Dox. After 2 h treatment, positive cells to Dox were measured by flow cytometry.

### Cytotoxicity activity

Cell proliferation was measured using the real time cell analyzer (RTCA-Roche1.2.1). The technique measures cell adherence to culture plates covered with gold sensor electrodes that are placed at the bottom of the plates. The adherence of cells to the plate sensor alters the impedance signal, indicating the attachment of cells to the plate. This impedance alteration is converted in cell attachment measurement and is a strong indicator that cells are covering the plate [18].

### 4T1-bioluminescent-luciferase expressing cells

Luciferase transduction of 4T1 cells (ATCC number CRL-2539) was performed using the Firefly Luciferase Lentivect™ Purified Lentiviral Particles (GeneCopoeia, MD, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 4T1 cells were cultured in a 75-cm<sup>2</sup> flask in medium containing 10% FBS (Gibco), 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (Gibco, São Paulo, SP, Brazil) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. When cells reached a confluence of 60%, transduction was performed in the presence of 8 µg/

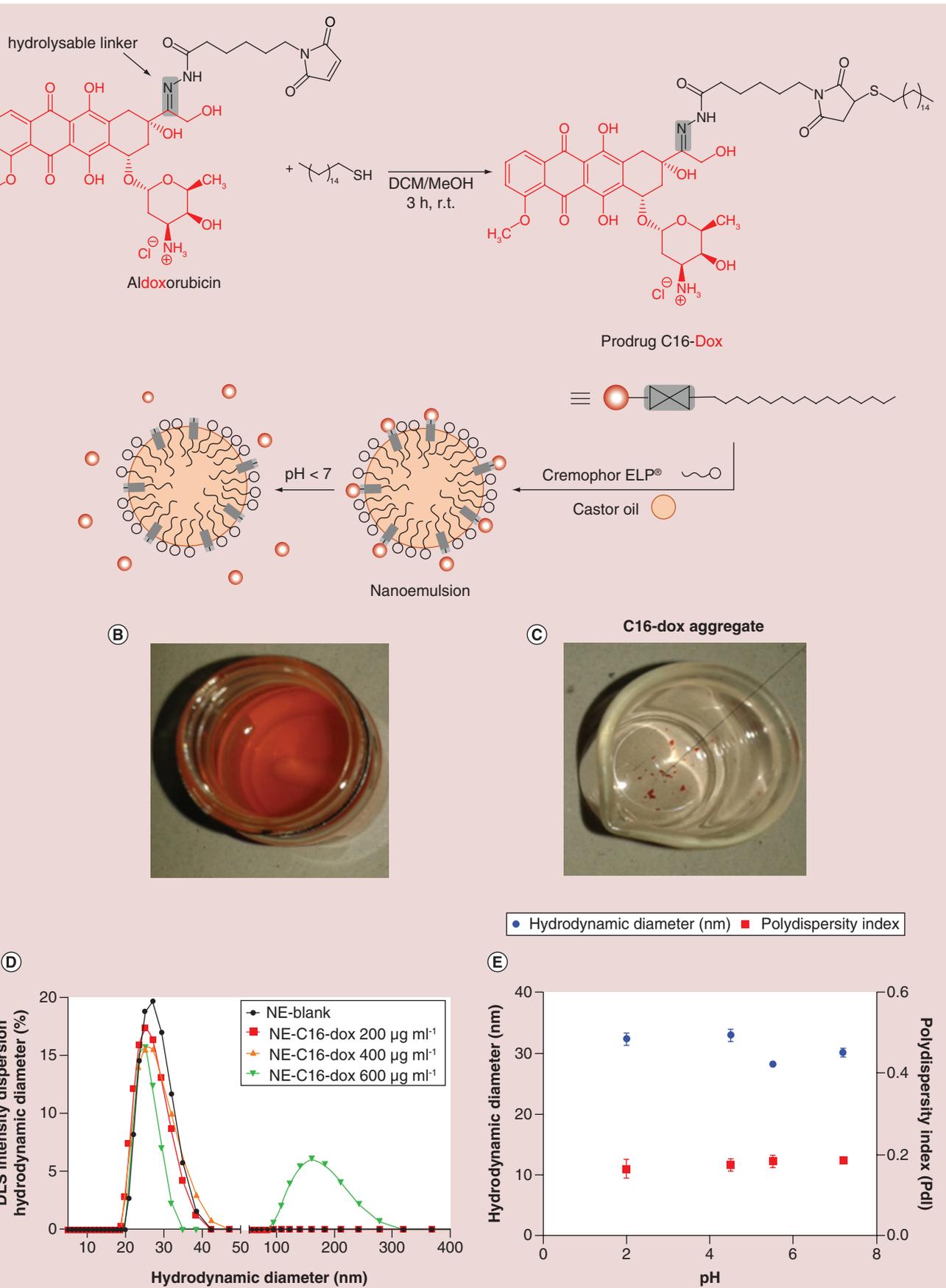
ml Polybrene (Sigma-Aldrich). Lentiviral particles were added to the cells at a multiplicity of infection of 10. The medium was changed after 24 h. Two days after transduction, stable clones of 4T1 cells expressing Firefly Luciferase were selected using 5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) for 10 days. The medium was changed every 48 h. Luciferase activity of the cells was confirmed by bioluminescence imaging of the cells treated with 150 µg/ml D-luciferin using IVIS XR (Perkin Elmer, MA, USA).

### Biodistribution studies

All animal procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Brasilia (142293/2014). Female BALB/C mice (8 weeks of age) were anesthetized, and 2 × 10<sup>4</sup> 4T1-Luciferase cells were slowly injected into the left flank subcutaneous region. After 14 days, each experimental group (free Dox [4 mg kg<sup>-1</sup>] and NE C16-Dox [4 mg kg<sup>-1</sup>]) received a single dose for each treatment. Then 4 or 12 h after injection, animals were euthanized and blood and organs were collected. Plasma was separated and centrifuged (187.824 × g) with acid isopropanol, 200 µl transferred to a 96-well black plate and Dox fluorescence (excitation: 488 nm/emission: 588 nm) measured. Organ fluorescence (excitation: 488 nm/emission: 588 nm) was observed through an *in vivo* imaging system (IVIS Spectrum, Caliper, MA, USA). All animals used in this study were purchased from CEMIB (Campinas, Brazil). This animal supplier has the certification of a pathogen-free animal facility. In our laboratory, all animals are kept under filtered air conditioner, with individual cage isolation.

### Therapeutic efficacy

After 2 weeks of tumor induction (4T1-luciferase tumor bearing mice), animals were divided into four experimental groups (n = 5 per group): phosphate-buffered saline (PBS), NE C16-Dox (40 mg kg<sup>-1</sup>), NE C16-Dox (20 mg kg<sup>-1</sup>) and free Dox (10 mg kg<sup>-1</sup>). The Dox concentration used in this experimental phase was established in a previous maximum tolerated dose study. The results of this previous study are presented as supplementary information (Supplementary Figures 5 & 6). A group without tumor was used as control. The experimental groups were treated intraperitoneally once a day for 5 days. Tumor volume, bioluminescence and body weight were measured during all the experimental period (36 days) at least once a week. Tumor volume was established as previously reported by Jiang *et al.* [19]. The analyses were conducted in two sections: quantification of bioluminescent (IVIS Spectrum, Caliper, USA) [20] of the primary tumor area and the thoracic are to estimate distant lung metastasis.



**Figure 1. C16-Dox and NE-C16-Dox characterization.** (A) Synthesis and chemical structure of C16-Dox and the schematic model of NE-C16-Dox and Dox release; (B) macroscopic appearance of NE-C16-Dox (400  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); (C) macroscopic appearance of the C16-D (400  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) dispersed in PBS (pH 7.2); (D) hydrodynamic diameter distributions of the NEs with different Dox loadings (200, 400, 600  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ); (E) NE-C16-Dox sizes and PDIs under different pH conditions. Error bars indicate the SEM for three independent DLS measurements.

DLS: Dynamic light scattering; NE: Nanoemulsion; PBS: Phosphate-buffered saline; PDI: Polydispersity index; SEM: Standard error of the mean.

### Lung microtomography & liver histology

Microtomography was conducted in dissected lungs after euthanasia. For analyses, lungs were scanned in a Skyscan 1076 MicroCT (Skyscan, Kontich, Belgium) at 50 kV, 100 mA and 35- $\mu\text{m}$  pixel size with an Al 0.5-mm filter. Liver morphometric histology was conducted according with Longo *et al.*

### Results

The first step for NE-C16-Dox preparation was the modification of Dox to a lipidated, acid-sensitive version (C16-Dox). For this purpose, the prodrug aldooxorubicin was employed as it bears a maleimide group that could readily react with 1-hexadecanethiol in a Michael addition. The chemical structure of C16-Dox, as well as complex mass was confirmed (Supplementary Figure 1), and the schematic representation of NE-C16-Dox is represented in Figure 1A. Furthermore, the hydrazone bond of the resulting prodrug can be cleaved under acidic conditions, releasing the protonated Dox, which is water-soluble and therapeutically active (Supplementary Figure 2).

### NE-C16-Dox characterization

After synthesis and characterization of the C16-Dox prodrug, NEs were prepared using C16-Dox in castor oil as dispersed phase and PEG-35-castor oil as surfactant. NEs with different final concentrations of C16-Dox (0.22, 0.44 or 0.66  $\text{mg ml}^{-1}$ ) were tested. The macroscopic appearance of both the NE-C16-Dox and the free C16-Dox dispersed in PBS (pH 7.2) are presented in Figure 1B & C. C16-Dox forms red aggregates at the bottom of the flask (Figure 1C), representing its strong hydrophobicity, whereas the NE-C16-Dox formulation has a clear and translucent dispersion without aggregation. This indicates that C16-Dox was completely dissolved in the oily core of the nanodroplets (Figure 1B). Figure 1D shows the hydrodynamic diameter distribution of the prepared NEs. The first two concentrations (0.22 and 0.44  $\text{mg Dox ml}^{-1}$ ) presented single populations of nanodroplets with hydrodynamic diameters close to 25–30 nm (intensity distribution). In contrast, NEs with 0.66  $\text{mg Dox ml}^{-1}$  showed the formation of at least two important populations, with peaks at 25 and 160 nm, indicating the occurrence of coalescence of lipid droplets. After 48 h, a macroscopic phase separation of the 0.66  $\text{mg Dox ml}^{-1}$  NEs

was observed. For that reason, we decided to use the highest concentrated stable NE (0.44  $\text{mg Dox ml}^{-1}$ ) for the subsequent studies. Moreover, NE-C16-Dox size and dispersity stability were studied under different pH conditions (Figure 1E), as the NE was designed to release Dox in acidic conditions. The measurements ensured that the NE is stable over the tested pH range from 2 to 7.4.

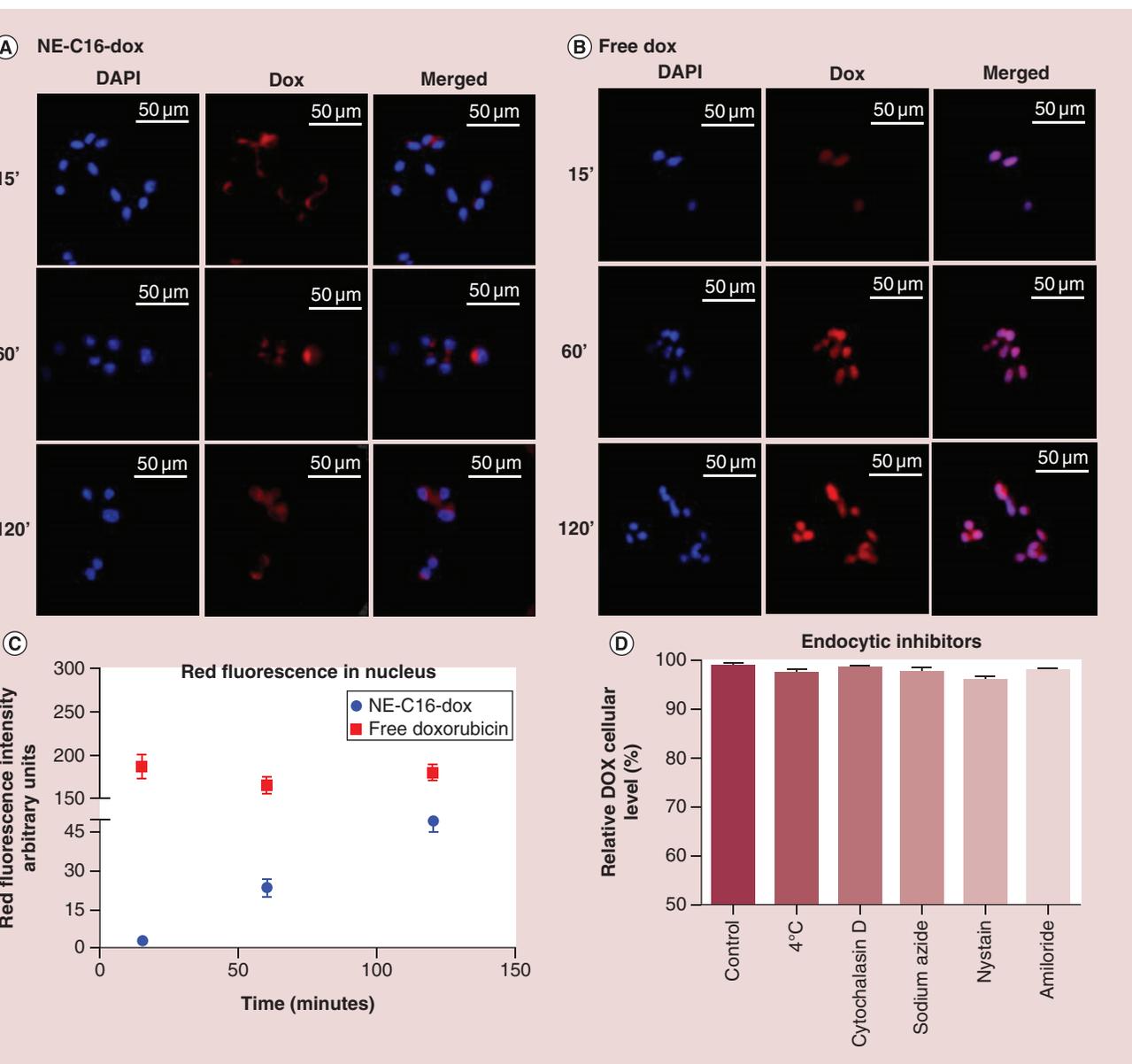
It is important to highlight that the total amount of C16-Dox used for encapsulation was incorporated within the dispersed NE phase, confirming that this system is suitable to carry hydrophobic prodrugs such as C16-Dox. The concentration of the NE was confirmed spectrophotometrically (Supplementary Figure 3A). Furthermore, the produced NEs presented long-term stability, for at least 90 days (Supplementary Figure 3B).

The release of free Dox from the NE-C16-Dox nanocarrier, a key feature of this system, was confirmed by dialysis and centrifugation experiments (Supplementary Figure 3C & D), which followed the dynamic flow of released Dox molecules from the inside of a dialysis bag (molecular weight-cutoff: 10 kDa) to the external collector compartments under different pH conditions (pH 4 and 7). The result shows a significantly higher Dox release from NE-C16-Dox in an acidic condition and only a marginal release at pH 7 (Supplementary Figure 3D).

### Internalization of NE-C16-Dox by 4T1 cells

The exposure of breast cancer (4T1) cells to NE-C16-Dox or free Dox solution produced different Dox cellular internalization kinetics (details in supplementary information). While free Dox was taken up (90%) in the first 120 min of exposure, NE-C16-Dox was internalized (98%) in the first 15 min of exposure (Supplementary Figure 4).

Besides the difference in the internalization rate of NE-C16-Dox and free Dox (Supplementary Figure 4), it is clear that cells treated with free Dox concentrated this drug mainly in the nucleus, even at the first experimental time point (15 min) (Figure 2A & B). In contrast, Dox from the NE-C16-Dox treatment was first observed in the cytoplasm and then moved into the nucleus, in a time-dependent manner (Figure 2C), which is in agreement with the hypothesis of passive permeation of entire nanodroplets of NE-C16-Dox across the membrane. For the mechanism of uptake,



**2. Doxorubicin internalization analysis by 4T1 cells: blue and red fluorescence indicates cell nucleus (DAPI stained) and Dox, respectively. (A & B)** Fluorescent images of 4T1 cells exposed to NE-C16-Dox and Dox at different time points. **(C)** Morphometric red fluorescence quantification of the photomicrographs. **(D)** NE-C16-Dox internalization study with different endocytic inhibitors. Error bars indicate the SEM for nucleus fluorescent measurements from ten independent cells for each experimental group. 4S,6-diamidino-2-phenylindole; SEM: Standard error of the mean.

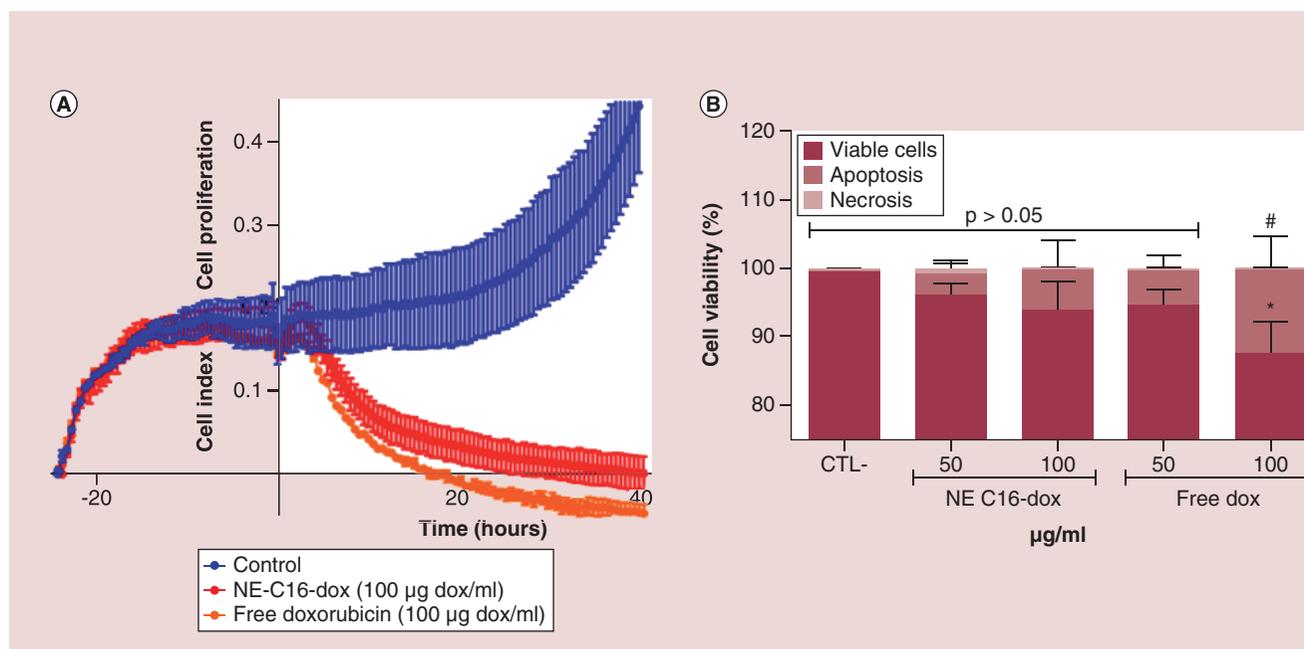
none of the endocytic blocker used were able to reduce the NE-C16-Dox uptake (Figure 2D).

### *In vitro* cell cytotoxicity

The proliferation assay of 4T1 cells (Figure 3A) shows that both treatments were effective to impair cell growth; however, the NE-C16-Dox promoted a delay in the cell proliferation impairment. In addition, the free Dox treatment (100 µg ml<sup>-1</sup>) was the only one that significantly induced apoptosis in 4T1 cells after 2 h of exposure (Figure 3B).

### DOX biodistribution in tumor-bearing mice

NE-C16-Dox presented a significantly different pharmacokinetic profile in comparison to Dox. NE-C16-Dox presented higher concentrations in blood plasma and tumor tissues in comparison to free Dox at both 4 and 12 h after its administration (Figure 4A). At 4 h after administration, the amount of Dox in the tumor was not significantly different between the groups, but a trend of a more pronounced accumulation of the drug in the tumors of animals treated with NE-C16-Dox was observed (Figure 4B).



**Figure 3. Proliferation and cytotoxicity assay.** (A) Proliferation curves of 4T1 cells submitted to different treatments; (B) mechanism of cell death analysis of 4T1 cells after treatment with NE-C16-Dox and free Dox.

\*# Denotes a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with control group. Error bars indicate the SEM in three independent experiments. SEM: Standard error of the mean.

At 12 h, however, the concentration of Dox in the tumors of animals treated with NE-C16-Dox significantly increased, while the concentration of Dox decreased in tumors of animals treated with free Dox (Figure 4B & Supplementary Figure 7).

The accumulation of NE-C16-Dox in tumors is also dependent on the circulation time. Figure 4A shows that NE-C16-Dox promoted a significant increase in plasmatic Dox concentration at both 4 and 12 h after administration compared with the free Dox treatment. Similarly, all other evaluated organs (Figure 4C & D) present a higher concentration of Dox when mice were treated with NE-C16-Dox. It is worth noting that even with this organ quantification, mice treated with NE-C16-Dox, at both concentrations (20 and 40 mg kg<sup>-1</sup>), did not show significant signs of toxicity or clinical alteration (Figure 5A); rather, they presented increased body weight during the experimental period (Figure 5B).

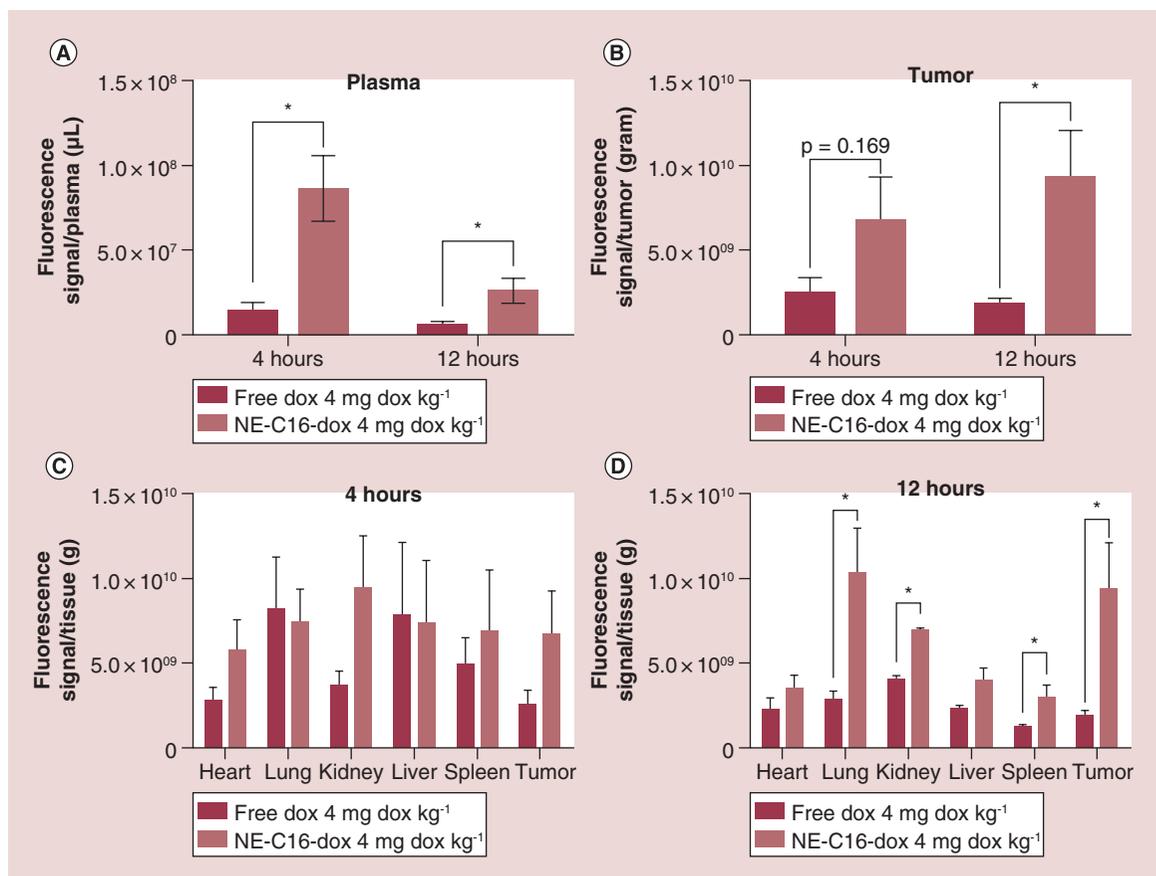
### NE-C16-Dox efficacy: primary tumor treatment & distant lung metastasis prevention

The efficacy and the possible toxic effects of NE-C16-Dox (20 and 40 mg Dox kg<sup>-1</sup>) were evaluated in an experimental breast cancer tumor model (4T1 cells) in mice. Tumor-bearing mice treated with free Dox (20 mg kg<sup>-1</sup>), PBS (tumor without treatment) or blank NE was used as controls. Additionally, a group of mice

without tumors (naive mice) was used as a healthy control group.

In both volume and bioluminescence evaluations (Figure 6A & B), tumor-bearing mice treated with PBS or blank NE presented a significant exponential tumor growth. For tumor-bearing mice treated with free Dox, a slight reduction in tumor volume was first observed, but the tumors continued to grow, reaching sizes comparable to those in nontreated animals. In all three tumor growth measurements performed (tumor volume, tumor bioluminescence and *ex vivo* final tumor weight), a statistically significant tumor reduction was seen only in mice treated with NE-C16-Dox (40 mg Dox kg<sup>-1</sup>) (Figure 6A–C). Despite the trend toward tumor reduction in mice treated with NE-C16-Dox (20 mg Dox kg<sup>-1</sup>) or free Dox formulation (20 mg Dox kg<sup>-1</sup>), these results were not statistically significant when compared with the PBS-treated mice.

In addition to the primary tumor control, it was noted that NE-C16-Dox (40 mg Dox kg<sup>-1</sup>) treatment impaired the development of distant lung metastasis. In Figure 7, the bioluminescent aspects of experimental mice in the fifth week of observation are presented. In this figure, the reduction of the primary tumor (left dorsal region) bioluminescence signal (for NE-C16-Dox) and the presence of bioluminescent tumor cell signals in the thoracic regions of animals (PBS and free Dox-treated mice) are clearly observed (Figure 7A).



**Figure 4. Biodistribution study.** (A) Dox concentrations in blood plasma at 4 and 12 h after treatment with free Dox (black) and NE C16-Dox (grey); (B) Dox concentrations in tumor at 4 and 12 h after treatment with free Dox and NE C16-Dox; (C) Dox concentrations in different organs at 4 h after treatment with free Dox and NE C16-Dox; (D) Dox concentrations in organs at 12 h after treatment with free Dox and NE C16-Dox.

\*Denotes a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between NE-C16-Dox and free Dox treatments. Error bars indicate the SEM in four independent animal measurements. SEM: Standard error of the mean.

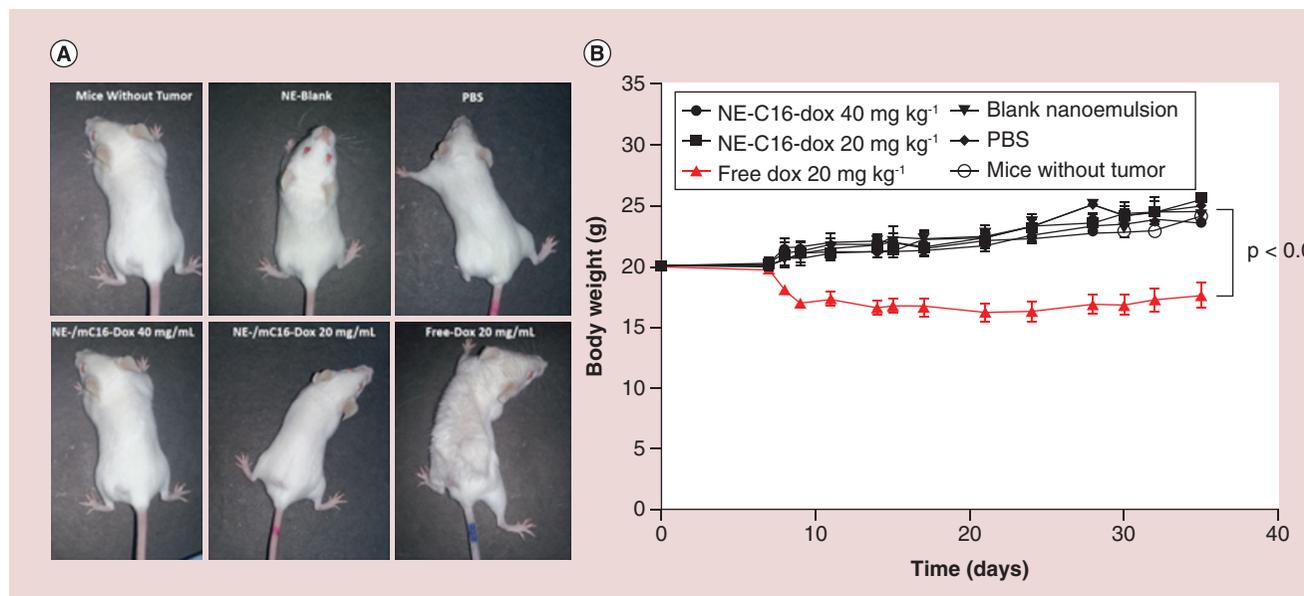
A detailed image of these metastatic bioluminescent cells, probably placed in lung tissue, is shown in Figure 7A. Figure 7B represents the quantification of thoracic bioluminescence. The only significant ( $p < 0.05$ ) bioluminescence reduction was observed in the group treated with NE-C16-Dox ( $40 \text{ mg Dox kg}^{-1}$ ) on day 29. No statistically significant difference was observed among the other experimental groups at days 26 and 29. A qualitative representation of this result is presented in Figure 7C.

To go further in this investigation, mouse lung densities were accessed by x-ray in a micro-CT analysis. The presence of 4T1 tumor tissue in lungs increases the organ density, as previously reported [21]. The results show that mice treated with NE-C16-Dox ( $40 \text{ mg Dox kg}^{-1}$ ) presented a density similar to the naive mice while all other groups showed denser lungs (Figure 7D). A bidimensional cross-section and a tridimensional picture from the mice lungs after the experimental protocol are represented in

Supplementary Figure 8A & B. The presence of metastatic tumor cells among lung tissue cells was confirmed by histopathological analysis where metastatic cells can be noted (Supplementary Figure 9E & F – arrow).

Some important hematological alterations were also noted in all tumor-bearing mice. The total white blood cell (WBC) count rose significantly in all experimental groups compared with the naive mice (Supplementary Figure 10). The differential WBC count showed an inversion of blood cell populations in all mice with a tumor, compared with naive mice (Supplementary Figure 10A). The most frequent WBC in naive mice are the lymphocytes (SCC >75%), which were significantly reduced in all other experimental groups. The decrease in lymphocytes was followed by a significant increase in monocyte count (Supplementary Figure 10B).

These hematological alterations were followed by significant liver alterations. In the livers of all tumor-bearing mice, WBC were detected among



**Figure 5. Clinical mouse alterations.** (A) Clinical alterations in mice during treatment with NE-blank, PBS, NE-C16-Dox (40 mg Dox ml<sup>-1</sup>), NE-C16-Dox (20 mg Dox ml<sup>-1</sup>) and free Dox (20 mg Dox ml<sup>-1</sup>); (B) changes in mice body weight (g) during different treatments. PBS: Phosphate-buffered saline.

hepatocytes, especially surrounding blood vessels (Figure 8A & C – arrows). In comparison to normal liver histology, the detection of WBC accumulation is clear (Figure 8B). In an immunohistochemical analysis (Supplementary Figure 11), these cells were identified as a hematopoietic precursor (CD34<sup>+</sup>), and the regions of cell concentration were defined as hematopoietic niches. These cells were also double marked with CD11b and GR1 (Supplementary Figure 12), which characterize the MDSC line. In a morphometric evaluation (Figure 8D), a significant reduction in these hematopoietic niches was noted in tumor-bearing mice treated with both NE-C16-Dox (20 and 40 mg Dox kg<sup>-1</sup>) formulations, indicating that those treatments were able to reduce this extramedullary hematopoiesis detected in liver tissues.

## Discussion

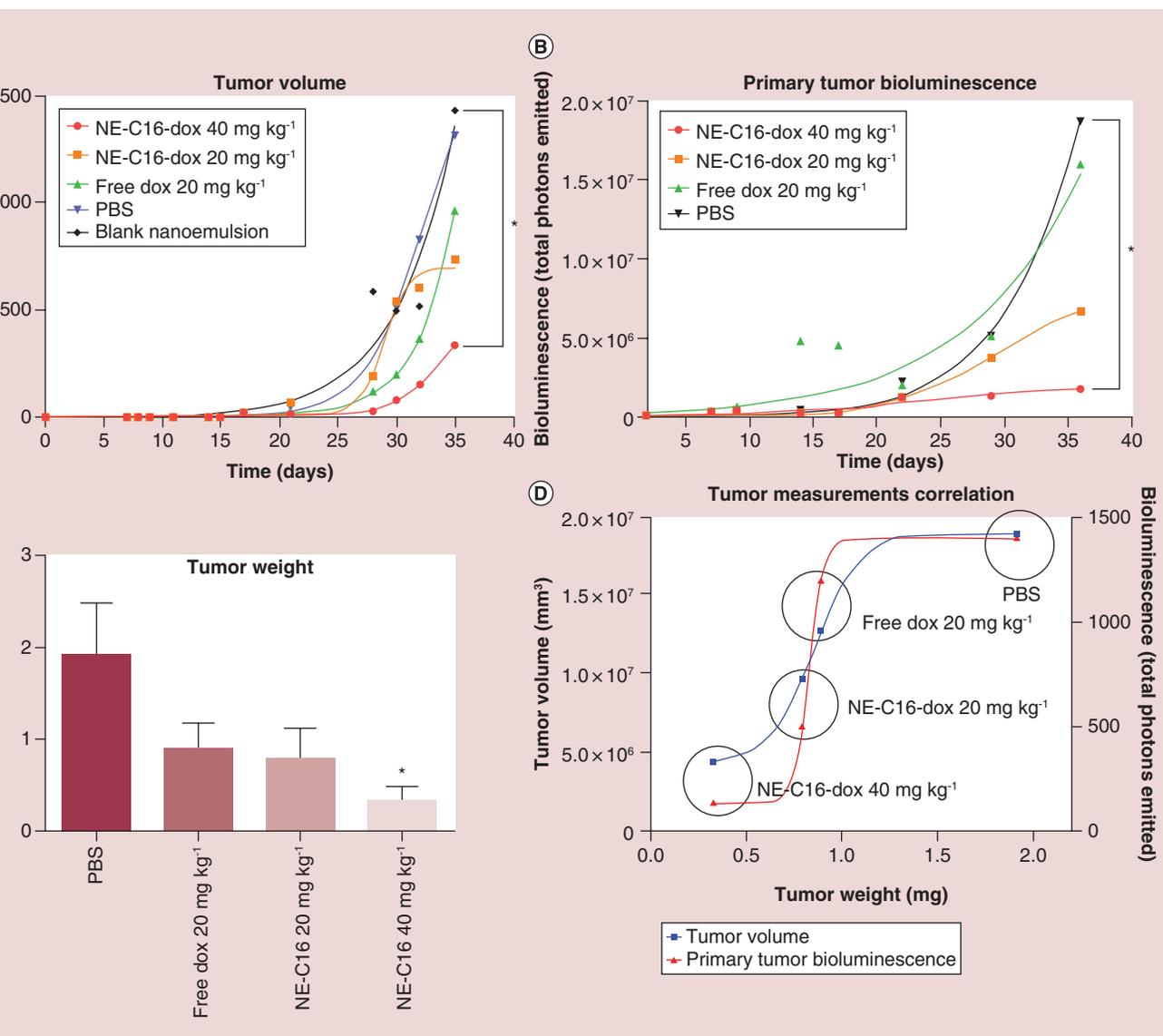
The short half-life and the wide distribution of Dox in healthy tissues is one of the most important drawbacks related to Dox. To modify this pharmacokinetic profile, we produced a lipidated, pH-sensitive, version of Dox (C16-Dox) to be incorporated in a lipid NE. With this approach, we hypothesized that the Dox could be preferentially delivered to tumor tissues by passive (EPR effect), and active (low pH) conditions, improving drug efficacy. This acid sensitiveness property is favorable for tumor targeting due to a decrease in blood vessels density compared with normal tissue [22]. This tumor feature produces low oxygen and high carbon dioxide tension, which leads to an acidic environment that can trigger Dox release from the NE-C16-Dox

complex. Hence, NE-C16-Dox works as a circulating Dox reservoir that transport Dox to tumor tissues upon active and passive mechanisms.

A similar concept of Dox reservoir was also observed by us after the *in vitro* exposition of breast cancer cells to NE-C16-Dox and was related to modification of the endocytic pathway of the nanocarrier. The literature describes that most of the nanocarriers containing Dox are taken up by cells using an endocytic pathway. This was also our first insight; however, after testing the internalization process with different types of endocytic inhibitors, including an ATPase inhibitor like sodium azide, and incubation at 4°C, we noted that none of the endocytic pathways tested inhibit NE-C16-Dox uptake, indicating that this nanocarrier has been internalized by an energy-independent diffusion pathway, instead of by endocytosis.

Internalization by diffusion may occur by the fusion of nanodroplets with cell membrane. This mechanism, mediated by surfactants, is reported in the literature [23] and was probably responsible for enhancing NE-C16-Dox internalization in comparison to free Dox. On the other hand, free Dox molecules are taken up by different mechanisms that include the energy-dependent drug transporters and simple diffusion of the nonionic form [24]. The passive internalization of nanodroplets, each one loaded with several C16-Dox molecules, may be responsible for the more intense internalization observed for this formulation in comparison to free Dox.

Once inside the cell NE-C16-Dox is kept in the cytoplasm and can serve as a controlled drug release



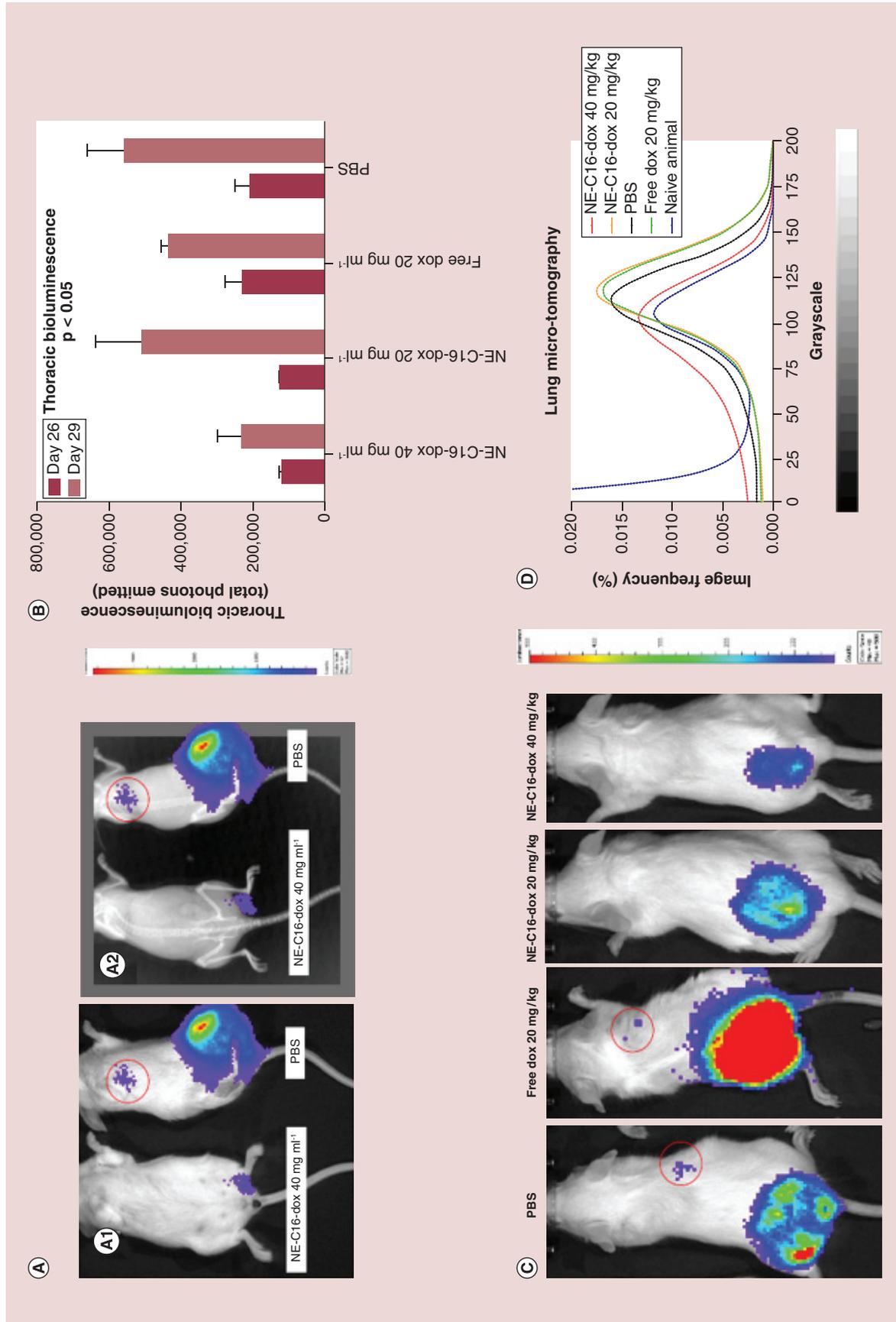
**6. Efficacy studies.** (A) Change in tumor volume during experiment with different treatments; (B) quantitative bioluminescence analysis of tumors with different treatments over days; (C) tumor weight after experiment with different treatments; (D) bioluminescence versus tumor volume correlation after experiment with different treatments. \* indicates a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with NE-C16-Dox treatment mice.

compartment, slowly releasing Dox, which goes to the nucleus in a time-dependent fashion. Since the most discussed action mechanism of Dox is the intercalation of the molecule with DNA, impairing the cellular transcriptional activity, these results suggest that this mechanism of cytotoxicity of Dox is maintained with NE-C16-Dox. This event was also observed [25], and may be used to overcome some drug resistance mechanisms.

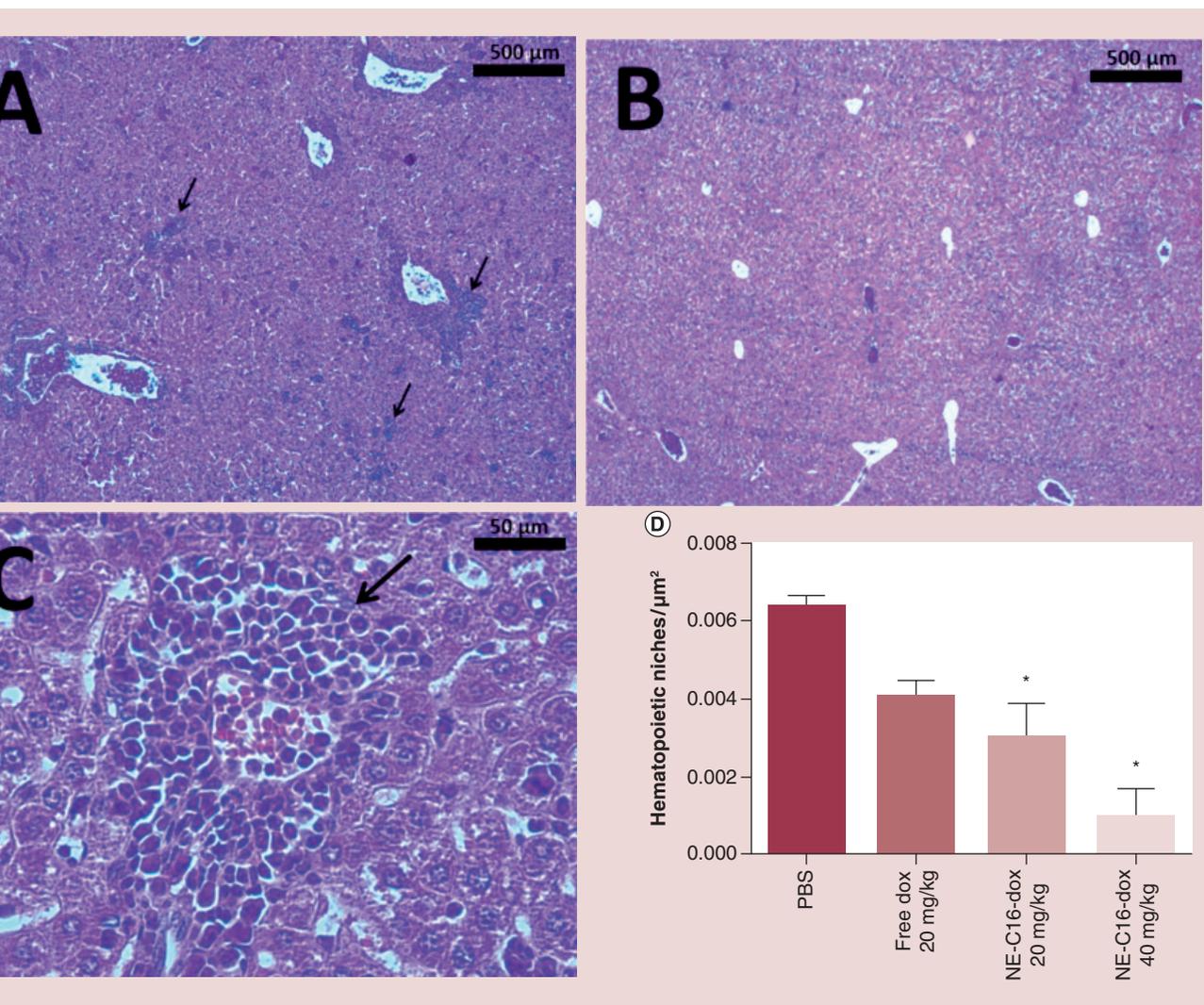
In general, the drug efflux mechanisms in multi-drug-resistant tumor cells involve the capture of the isolated drug molecules in the cytoplasm by protein complexes, for example, P-glycoprotein, which actively pumps out the anticancer agents [26,27]. The formation

of an intracellular reservoir of Dox molecules in the NE-C16-Dox-treated cells, as described above, may prevent the interaction of Dox with these efflux pump proteins, thus keeping the drug molecules available to exert their cytotoxic activity.

This concept of intracellular Dox reservoir can also be supported by the cell proliferation and cell death pathway results. This observation may also be related to the increased presence of Dox in the cell nucleus immediately after treatment with free Dox, whereas in the treatment with NE-C16-Dox a part of Dox was located in the cytoplasm in the first 2 h of exposure (Figure 2A & B). Dox induces apoptotic cell death due to the interaction with the nucleus, producing DNA



**Figure 7. Distant lung metastasis.** (A) Bioluminescence tumor cell signal in tumor and in the thoracic regions of animal 1 (A1) and animal 2 (A2) treated with NE C16-Dox (left) and PBS (right); (B) quantification of thoracic bioluminescence after different treatments. Error bars indicate the SEM in five independent animal measurements; (C) representative bioluminescent image from the different experimental groups; (D) lung micro-CT analysis. PBS: Phosphate-buffered saline; SEM: Standard error of the mean.



**8. Extramedullary liver hematopoiesis.** (A) Histological aspects of liver presenting extramedullary hematopoietic niches (arrows); (B) normal histology; (C) liver histology with the presence of hematopoietic cells (arrow); (D) morphometric quantification of hematopoietic niches in the different experimental groups. \* Denotes a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with phosphate-buffered saline.

adducts or impairment of transcriptional activity, which culminate in the activation of apoptotic [28] cell death.

The next steps of the investigation were to evaluate the NE-C16-Dox in tumor mice models. After the establishment of the *in vivo* maximum tolerate doses (Supplementary Figure 5), biodistribution studies showed that NE-C16-Dox had a higher circulating half-life. This finding may be due to a slower clearance rate of NE-C16-Dox in comparison to free Dox. Indeed, the literature [29,30] shows that nanocarriers can circumvent renal excretion and liver metabolism, thus increasing the bioavailability of drugs in bloodstream.

Besides that, the reduction of cardiac toxicity (Supplementary Figure 6) observed in the NE-C16-Dox treated mice may also be related to the encapsulation

of Dox inside the nanocarrier. There is evidence supporting the hypothesis that some specific membrane transporter present in the cardiac endothelium uptake Dox to cardiac tissue, thus promoting the cardiotoxicity. Recently, Schwebe *et al.* [31] demonstrated that blocking some specific Dox transporters in the endothelium, in an *in vivo* application, reduces Dox-related cardiotoxicity. Therefore, we suspect that the presence of Dox inside the NE-C16-Dox complex may reduce the contact with these cardiac endothelium receptors, thus reducing the tissue uptake, promoting a decrease in tissue injury.

In addition, long time circulating NE-C16-Dox progressively accumulated in the tumor tissue, an event that may be due to both EPR effect and acidic pH-triggered release of Dox. It is noteworthy that

similar to the MDT study (Supplementary Figure 5), when healthy mice were used, the application of NE-C16-Dox, even in a doubled concentration of Dox (NE-C16-Dox 40 mg Dox kg<sup>-1</sup>), did not promote toxicity in tumor-bearing mice. It is an important finding since in clinical situations the chemotherapeutic protocols [32,33] have a dose-limiting toxicity that, according to our results in both healthy and tumor-bearing mice, can be significantly decreased when Dox is administered as NE-C16-Dox.

For the efficacy evaluations, tumor growth was assessed with two different methodologies: clinical tumor size and bioluminescence emission of luciferase-transformed 4T1 cells. These two methods had a good linear correlation (bioluminescence vs volume,  $r^2 = 0.9$ ) with the final *ex vivo* tumor weight (weight vs volume,  $r^2 = 0.94$ ; weight vs bioluminescence,  $r^2 = 0.733$ ; Figure 6D). In this efficacy evaluation, the NE-C16-Dox (40 mg Dox kg<sup>-1</sup>) proved to be useful to control both primary breast tumor and distant lung metastasis. As mentioned before, the presence of distant metastasis is a determinant factor that impairs the patient's survival. In this type of cancer, the primary tumor is not the main cause of the patient's death, but instead the distant metastatic lesions are [34]. Thus, the reduction in metastasis points observed in this study is one further advantage of the NE-C16-Dox system.

We and others [21,35] have already published results obtained in 4T1 breast tumor-bearing mice connecting the development of lung metastasis with hematopoietic disorders that produce a significant immune tolerance against tumor cells that allows for tumor and metastasis progression. The breast cancer 4T1 cells used in our *in vivo* investigation are capable of altering the normal hematopoietic process, inducing significant leukocytosis, with a high production of immature myeloid cells. Interestingly, a specific subset of those myeloid cells, the MDSC, detected in livers from 4T1 tumor-bearing mice (Supplementary Figure 12), are capable of suppressing the lymphocytic response against tumor tissue, creating a kind of immunological shield that protects tumors against immune surveillance [16].

One of the pathological markers of that condition is the establishment of extramedullary hematopoiesis in liver tissue [16,36], as observed in our results (Figure 8). However, in animals treated with NE-C16-Dox (40 mg Dox kg<sup>-1</sup>), the amount of hematopoietic infiltration was significantly lower comparing all livers from experimental mice (Figure 8D). Thus, malignant cell evasion due to a decrease in immune surveillance is prevented in those animals, impairing the establishment of distant lung metastatic niches.

Based on our observations, we believe that this

metastasis prevention might be related to two main factors: direct cytotoxicity to the primary tumor, which decreases the number of tumor cells for metastasis; and preventing the establishment of a systemic tolerogenic environment that allows tumor growth. Both factors may contribute and act together to prevent disease progression.

We understand that tumor progression is a very complex process, and a series of alternative mechanisms for metastasis progression presented in the literature might be involved and should be studied to stop the disease progression. However, based on our findings, we believe that these immunological and liver hematopoiesis disorders can be a central point of metastasis progression in our murine tumor model. This hypothesis, based on the decrease in immune surveillance, was also associated with the effects of Dox in preclinical and clinical investigations [36,37], proving that this hypothesis is supportable and can be considered to explain the results observed in the present work.

## Conclusion

In summary, combination of an acid-sensitive prodrug (C16-Dox) and a nanocarrier (NE-C16-Dox) are useful to improve the efficacy and reduce the systemic toxicity of Dox in an experimental breast cancer. The developed NE-C16-Dox complex proved to be useful to release Dox under specific acidic conditions; to increase Dox delivery to tumor tissues; and to decrease both primary tumor and distant lung metastasis growth in experimental tumor-bearing mice. Additionally, NE-C16-Dox was nontoxic to experimental mice and allowed the administration of higher doses of Dox without important collateral effects. Taken together, these results indicate that NE-C16-Dox is promising for breast cancer treatment, thus creating possible opportunities to translate these nanotechnology concepts to clinical applications.

## Future perspective

We believe that in a near future we could translate these nanotechnology strategies to clinical applications to improve breast cancer treatment outcome. As comment in our introduction section, we have some examples of nanocarriers used for clinical applications; however, the translation of new developments is not linearly transferred to patients. Researchers do not agree with the reasons of this gap; however, it is possible that the industrial production of the nanocarriers may impair this. For us, the development of pharmaceutical solutions that could be easily scaled up, such as the lipid NE production, could reduce the time of translation of new technologies to clinical practices.

### Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: [www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm-2017-0091](http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm-2017-0091)

### Acknowledgements

The authors would like to thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) through the ThermoNanogele NanoMatFutur award (13N12561), the Alexander von Humboldt foundation program CONNECT and the Freie Universität Focus Area Nanoscale.

### Financial & competing interests disclosure

Financial support from the Brazilian agencies MCT/CNPq, FAP/DF (0193.000935/2015), CAPES and INCT-Nanobiotechnology, and the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) through the ThermoNanogele NanoMatFutur

award (13N12561), the Alexander von Humboldt foundation program CONNECT and the Freie Universität Focus Area Nanoscale are gratefully acknowledged. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

### Summary points

- The pH-sensitive lipitated version of doxorubicin (C16-Dox) presented acid-sensitive proprieties and was successfully entrapped in lipid nanoemulsions.
- The nanocarrier was internalized by breast cancer cells *in vitro* by an alternative pathway.
- The NE-C16-Dox improve the delivery of Dox to tumor tissues, and the drug had a longer plasma half-life.
- The developed nanocarrier reduced the Dox side effects and improve Dox efficacy in a breast cancer mice model.
- The NE-C16-Dox reduced distant lung metastasis and the mechanism may be related to the presence of myeloid-derived suppressor cells.

### References

- 1 Horváth Z, Torday L, Hitre E *et al.* Inflammatory breast cancer—comparing the effectivity of preoperative docetaxel-epirubicine protocol to conventional anthracycline-containing chemotherapy to achieve clinical benefit and complete pathological response. *Pathol. Oncol. Res.* 17(3), 541–550 (2011).
- 2 Mackey JR, Martin M, Pienkowski T *et al.* Adjuvant docetaxel, doxorubicin, and cyclophosphamide in node-positive breast cancer: 10-year follow-up of the Phase III randomised BCIRG 001 trial. *Lancet Oncol.* 14(1), 72–80 (2013).
- 3 Gustafson DL, Rastatter JC, Colombo T, Long ME. Doxorubicin pharmacokinetics: macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model. *J. Pharm. Sci.* 91(6), 1488–1501 (2002).
- 4 Lipshultz SE, Miller TL, Scully RE *et al.* Changes in cardiac biomarkers during doxorubicin treatment of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: associations with long-term echocardiographic outcomes. *J. Clin. Oncol.* 30(10), 1042–1049 (2012).
- 5 Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 46(12 Part 1), 6387–6392 (1986).
- 6 Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv. Drug Del. Rev.* 63(3), 131–135 (2011).
- 7 Longo J, Muehlmann L, Almeida-Santos M, Azevedo R. Preventing metastasis by targeting lymphatic vessels with photodynamic therapy based on nanostructured photosensitizers. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 6(5), 1 (2015).
- 8 O'Brien M, Wigler N, Inbar M *et al.* Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a Phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 15(3), 440–449 (2004).
- 9 Barenholz YC. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J. Control. Release* 160(2), 117–134 (2012).
- 10 Krüger HR, Schütz I, Justies A *et al.* Imaging of doxorubicin release from theranostic macromolecular prodrugs via fluorescence resonance energy transfer. *J. Control. Release* 194, 189–196 (2014).
- 11 Krüger HR, Nagel G, Wedepohl S, Calderón M. Dendritic polymer imaging systems for the evaluation of conjugate uptake and cleavage. *Nanoscale* 7(9), 3838–3844 (2015).
- 12 Mura S, Bui DT, Couvreur P, Nicolas J. Lipid prodrug nanocarriers in cancer therapy. *J. Control. Release* 208, 25–41 (2015).
- 13 Calderón M, Warnecke A, Gräser R, Haag R, Kratz F. Development of enzymatically cleavable doxorubicin

- conjugates with polyglycerol. *J. Control. Release* 132(3), e54–e55 (2008).
- 14 Calderón M, Welker P, Licha K, Graeser R, Kratz F, Haag R. Development of efficient macromolecular prodrugs derived from dendritic polyglycerol. *J. Control. Release* 148(1), e24–e25 (2010).
- 15 Chawla SP, Papai Z, Mukhametshina G *et al.* First-line aldodoxorubicin vs doxorubicin in metastatic or locally advanced unresectable soft-tissue sarcoma: a Phase IIb randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 1(9), 1272–1280 (2015).
- 16 Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9(3), 162–174 (2009).
- 17 Muehlmann LA, Rodrigues MC, Longo JPF *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: development and *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. *J. Nanobiotechnol.* 13(1), 36 (2015).
- 18 Moniri MR, Young A, Reinheimer K, Rayat J, Dai L-J, Warnock GL. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology* 67(2), 379–386 (2015).
- 19 Jiang S-P, He S-N, Li Y-L *et al.* Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *Int. J. Nanomedicine* 8, 3141–3150 (2013).
- 20 Alshetaiwi HS, Balivada S, Shrestha TB *et al.* Luminol-based bioluminescence imaging of mouse mammary tumors. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 127, 223–228 (2013).
- 21 Longo JPF, Muehlmann LA, Miranda-Vilela AL *et al.* Prevention of distant lung metastasis after photodynamic therapy application in a breast cancer tumor model. *J. Biomed. Nanotechnol.* 12(4), 689–699 (2016).
- 22 Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4(11), 891–899 (2004).
- 23 Thiam AR, Farese RV Jr, Walther TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(12), 775–786 (2013).
- 24 Okabe M, Unno M, Harigae H *et al.* Characterization of the organic cation transporter SLC22A16: a doxorubicin importer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333(3), 754–762 (2005).
- 25 Liang M, Fan K, Zhou M *et al.* H-ferritin–nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111(41), 14900–14905 (2014).
- 26 Riganti C, Voena C, Kopecka J *et al.* Liposome-encapsulated doxorubicin reverses drug resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells. *Mol. Pharm.* 8(3), 683–700 (2011).
- 27 Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J. Biol. Chem.* 288(44), 31761–31771 (2013).
- 28 Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res.* 66(9), 4863–4871 (2006).
- 29 Sahoo SK, Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov. Today* 8(24), 1112–1120 (2003).
- 30 Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 30(11), 592–599 (2009).
- 31 Schwebe M, Ameling S, Hammer E *et al.* Protective effects of endothelin receptor A and B inhibitors against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Biochem. Pharmacol.* 94(2), 109–129 (2015).
- 32 Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin. *Clin. Pharmacokinet.* 42(5), 419–436 (2003).
- 33 Danson S, Ferry D, Alakhov V *et al.* Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer* 90(11), 2085–2091 (2004).
- 34 Weigelt B, Peterse JL, Van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5(8), 591–602 (2005).
- 35 Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 67(20), 10019–10026 (2007).
- 36 Alizadeh D, Trad M, Hanke NT *et al.* Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res.* 74(1), 104–118 (2014).
- 37 Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58(1), 49–59 (2009).



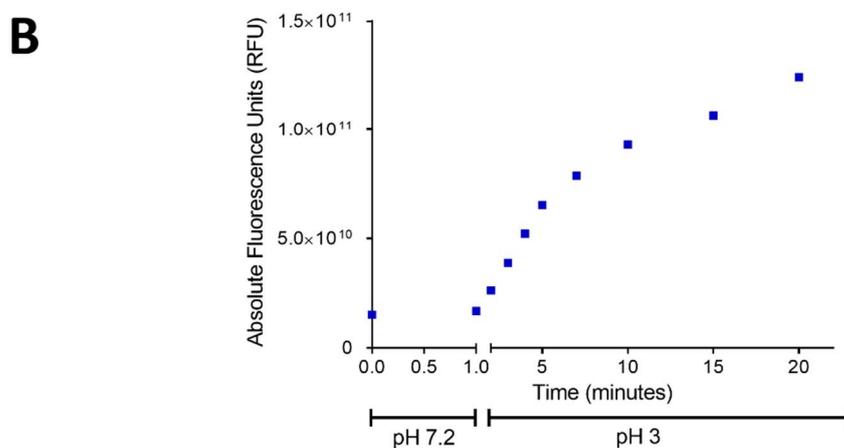
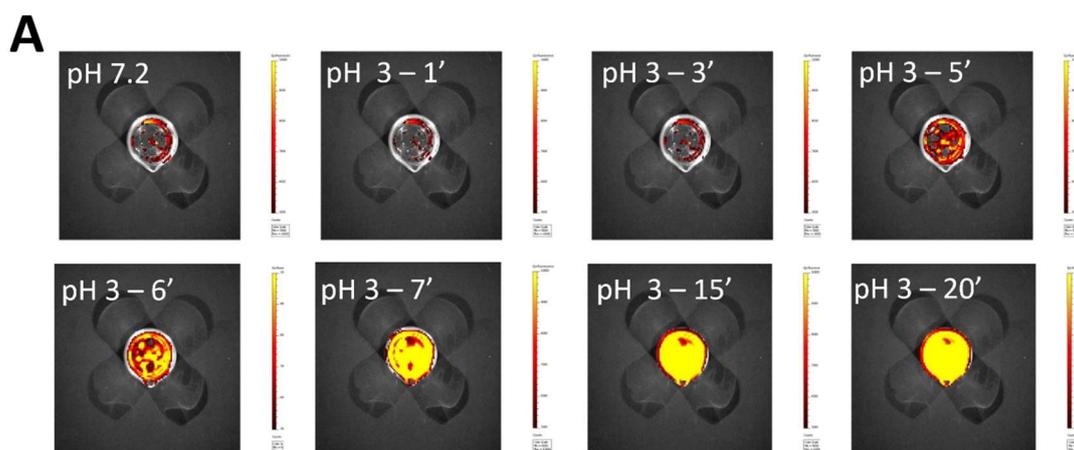


Figure S2. pH-responsiveness of C-16. Images shows Dox displacement from C16 after reducing pH: a) Qualitative representation of fluorescence intensity over time in pH 7.2 and 3; b) Quantitative image analysis in Absolute Fluorescence Intensity (RFU) over time.

### *NE-C16-Dox Characterization*

In order to measure the amount of Dox concentration in the NE, a spectrophotometric correlation between C16-Dox ( $\text{mg mL}^{-1}$  in NE dispersion) and free Dox ( $\text{mg mL}^{-1}$  in PBS) was traced (Figure S3A). Both solutions presented a positive linear correlation, and the correlation tests confirmed ( $\sim 55\%$  w/w) the theoretical content of Dox in C16-Dox ( $54\%$  w/w) experimentally. The tested NE-C16-Dox had the following final Dox concentrations: 0.22, 0.44, and  $0.66 \text{ mg Dox mL}^{-1}$  respectively.

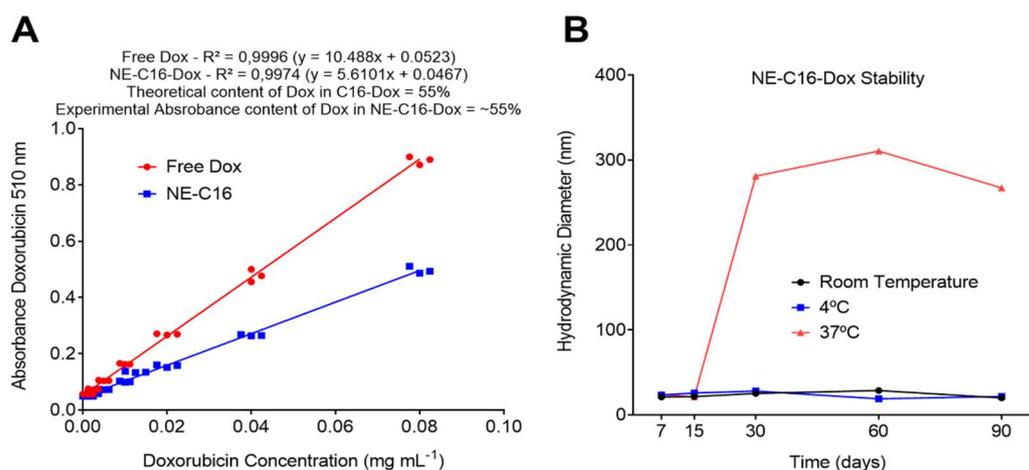


Figure S3. NE C16-DOX characterization: a) Theoretical DOX amount confirmation and calculation in NE C16-DOX by UV/Vis; b) NE C16-DOX Hydrodynamic Diameter stability in different environment over time.

### *Long-term stability of NE-C16-Dox*

The long-term NE-C16-Dox stability was evaluated measuring the hydrodynamic diameter, as well as the polydispersity index. As presented in Figure S3B, it is possible to note that the NE was stable in 4 °C and room temperature. At 37 °C, the formulation was stable for two weeks.

### *Dox Internalization*

The absolute fluorescence intensity analysis, obtained in the cytometry experiments, shows that cells treated with NE-C16-Dox presented a more intense signal compared to the cells treated with free Dox. Furthermore, Dox fluorescence was detected in almost all cells (98%) in the first 15 minutes of exposure (Figure S4A) when associated to the NE, while for the free Dox treatment its fluorescence was detected in 65% of the cells in the same period, achieving more than 90% of positive cells only after 120 minutes of exposure to free Dox solution (Figure S4D).

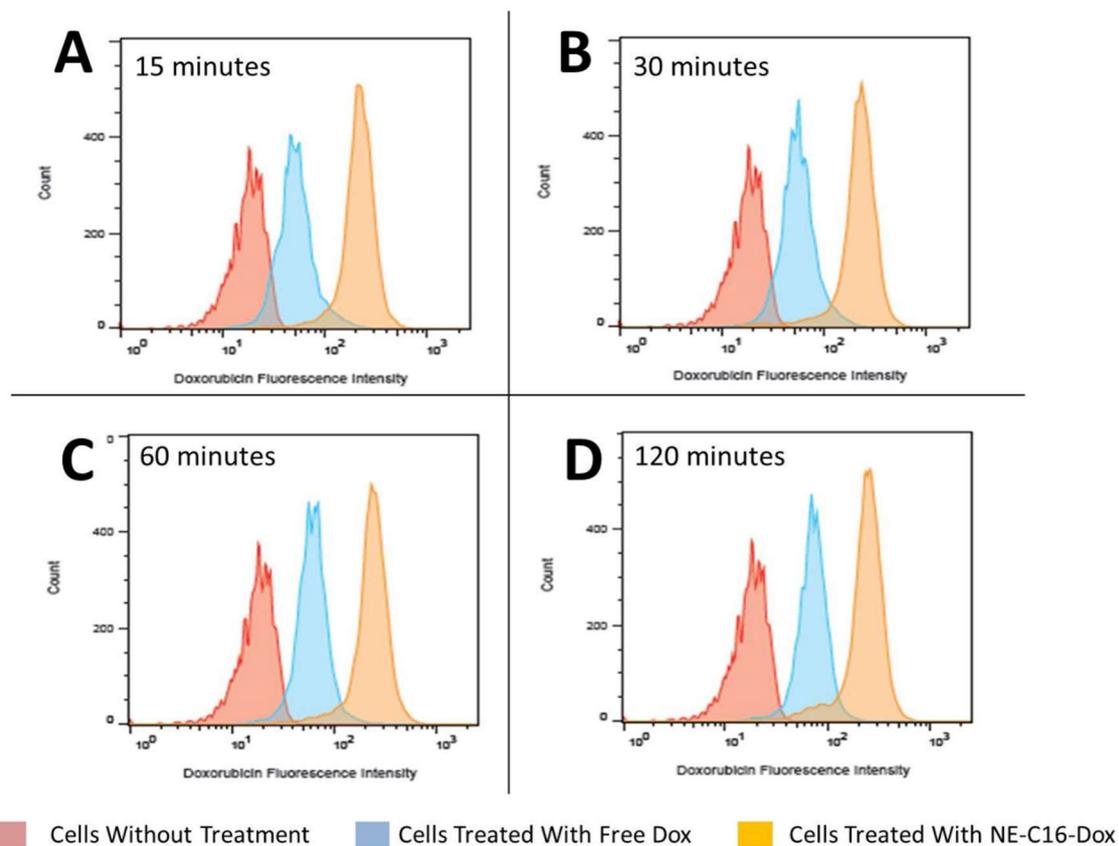


Figure S4. Dox internalization in 4T1 cells quantified by Flow Cytometry after Free Dox and NE C16-DOX exposure over time.

### ***MTD Heart Histology***

It is interesting to note that in the heart histological evaluation, some kinds of tissue degeneration in all animals treated with Dox were observed, with both free and nanostructured formulations. However, the animals treated with the NE-C16-Dox formulation presented a decrease in the intensity of microscopic morphological alterations compared to the animals treated with free Dox. In Figure S5, it is possible to observe the normal pattern of the cardiac muscle fiber, presenting normal muscle striations and central nucleus with heterochromatin and evident nucleolus. In the groups treated with NE-C16-Dox (Figure S5B and C), the presence of wave like muscle fiber was observed, which indicates the first step of tissue degeneration. On the other hand, in both groups treated with free Dox, we could observe more intense tissue degeneration, with some spots of fibrosis, muscle fiber degeneration, and degradation of nucleus structures. These findings confirm that Dox promotes an important damage to cardiac

tissue, and the association of Dox with our nanocarrier (NE-C16-Dox) reduced these effects in this MTD study against healthy mice.

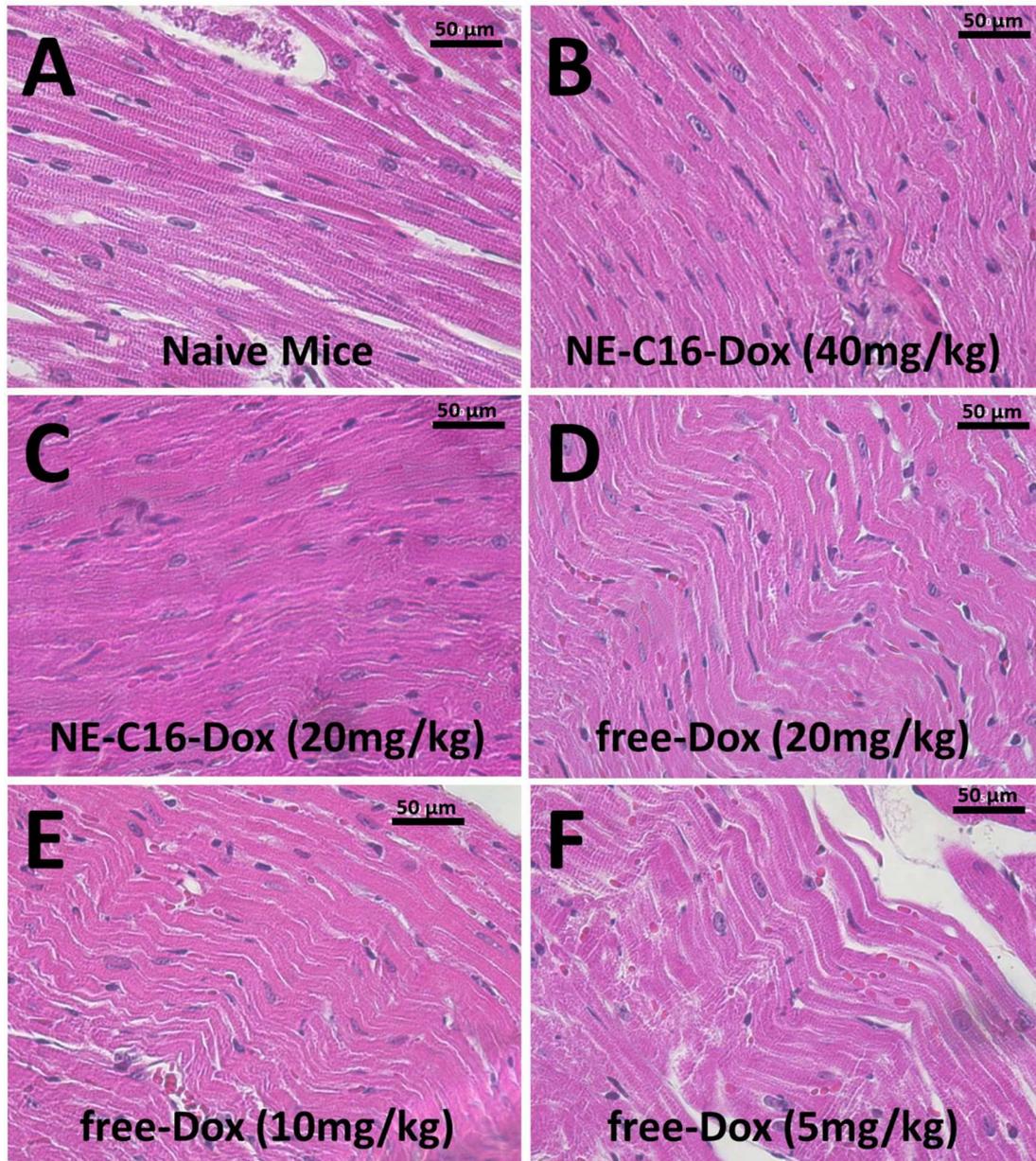


Figure S5. Heart histopathological analysis in mice after different treatments.

### *Lung Microtomography*

Figure S6A and B represents the morphological aspects of bidimensional and tree dimensional lungs micro-CT images. Following the color scale, it is possible to note the significant density differences in the bidimensional images among the experimental groups.

Noteworthy, the X-ray densities from lungs of animals treated with NE-C16-Dox are similar to those of the naïve control lungs.

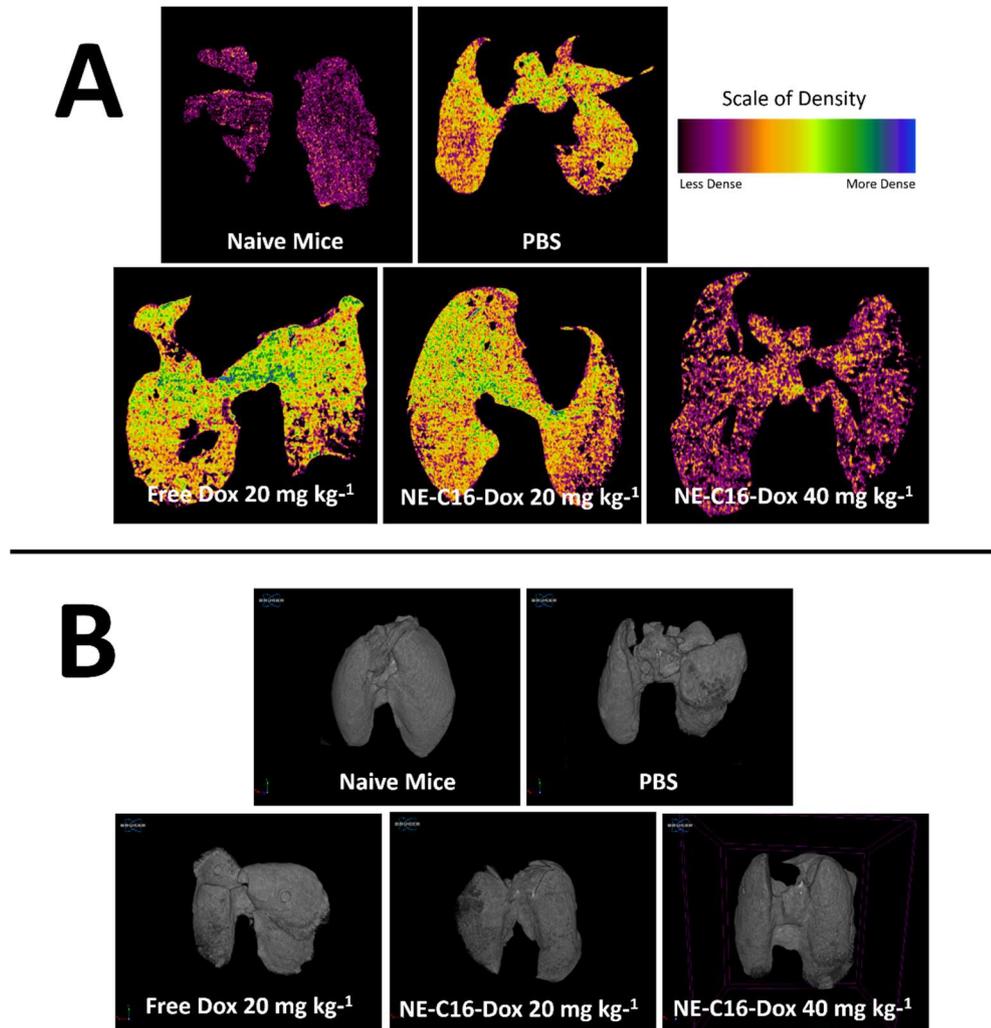


Figure S6. Mouse lung densities by X-ray in a micro computed tomography (micro-CT): a) Bidimensional cross section from mice lungs after treatments; b) a 3 dimensional aspect of mice lungs after different treatments are represented.

### ***Lung Histopathology***

Figure S7A represents the normal histological aspect of naïve control mice lungs, without metastatic proliferating cells. In Figure S7D, it is possible to note the presence of a dense tissue with metastatic tumor cells. In a higher magnification view (Figure S7F-arrow), it is possible to confirm the typical morphology of colonies of 4T1 cells in the lung tissue.

Noteworthy, the lungs from mice treated with NE-C16-Dox ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) presented a histological pattern similar (Figure S7B) to that of untreated control mice.

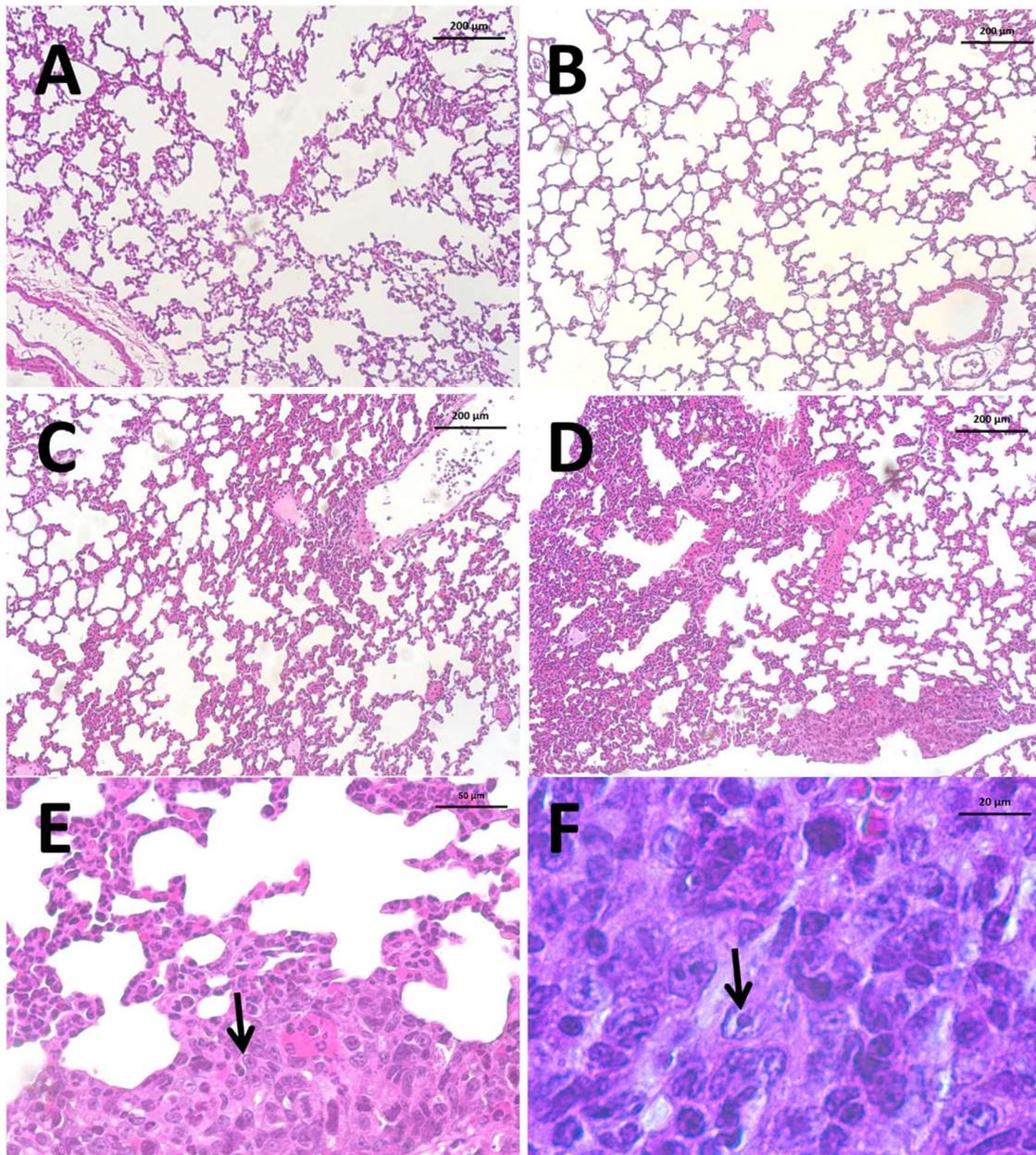


Figure S7. Lung histopathological photomicrographs. Photomicrographs represent normal naïve mice lungs histology (a); NE-C16-Dox ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (b); NE-C16-Dox ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (c); Free Dox ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (d); and PBS treated (e) mice respectively. In section (f) a higher magnification highlight the 4T1 metastatic cells proliferating among lung tissue.

## Hemogram

Figure S8 shows the blood cell counting for the different experimental groups. The absolute red blood cells (RBC) counting was statistically equal for the treated groups. On the other hand, the total white blood cell (WBC) counting presented significant increases in all experimental groups compared to the naive group (Figure S8A). The differential WBC counting showed an inversion of blood cell populations in all tumor-bearing mice, compared to naive mice (Figure S8B). The most frequently WBC in naive mice were the lymphocytes (SCC, >75%), which presented reduced percentages in all others experimental groups. The decrease in lymphocyte cell percentages is followed by a significant increase in monocyte (MCC) proportion. The percentage of neutrophils (LCC) did not vary among experimental groups.

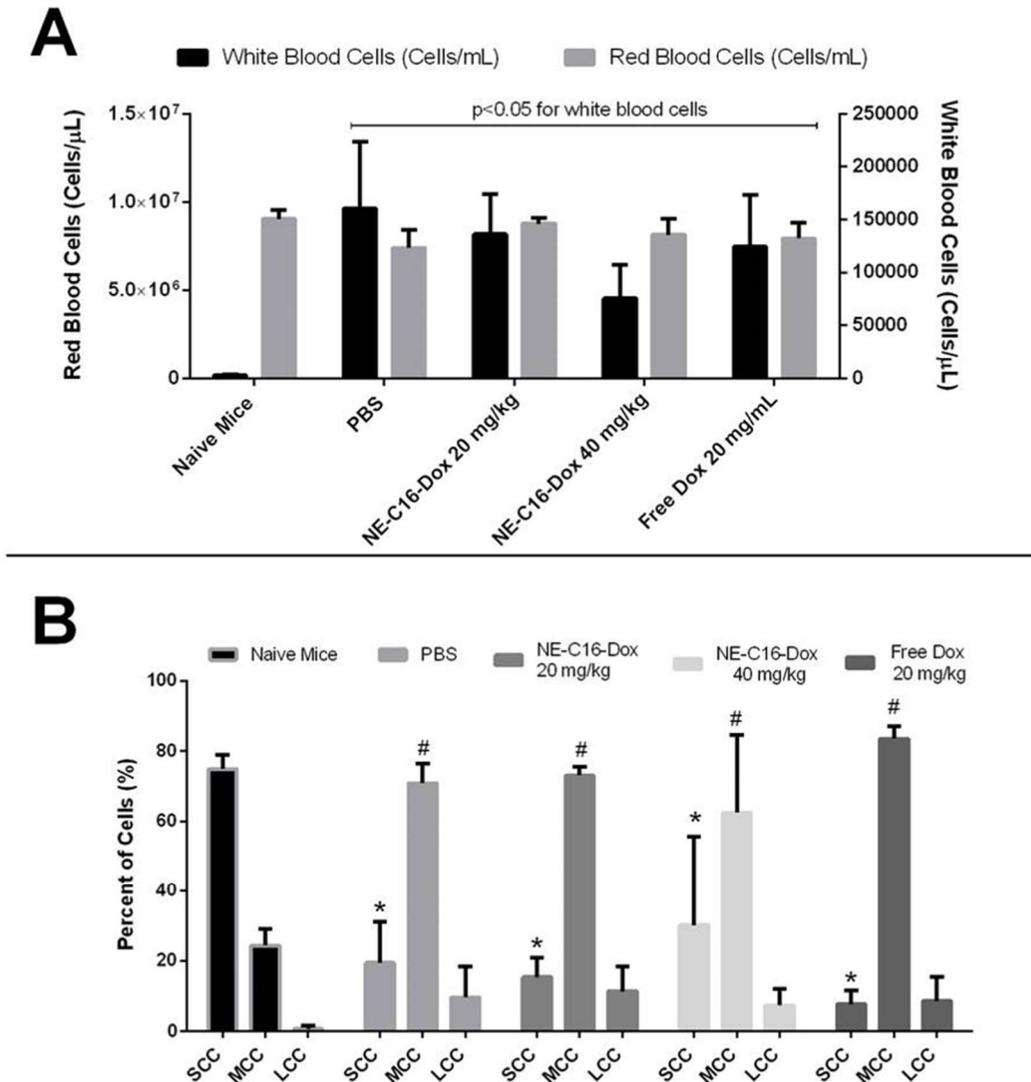


Figure S8. Hematological analysis: a) Counting of Red and White blood cells in different experimental groups; b) Counting of white blood cells types after different treatments.

### ***Immunofluorescence and immunohistochemical analyses***

Figure S9 shows the CD34 expression in liver histological sections. This procedure was used to confirm the presence of extramedullary hematopoiesis in the liver. The brown spots represent the immunohistochemical stain. CD34 is also expressed in endothelial cells that were used as internal control of the reaction (Figure S9A). In Figure S8B, the positive CD34 cells are clearly identified among the negative CD34 hepatocytes. These cells are atypical in adult mice, and confirm the presence of hematopoietic cells proliferating among normal liver tissue. Figure 10 represent the immunofluorescent confirmation of MDSC in liver tissue. Thus, specific myeloid cell line is characterized by the double expression of GR1 and CD11b.

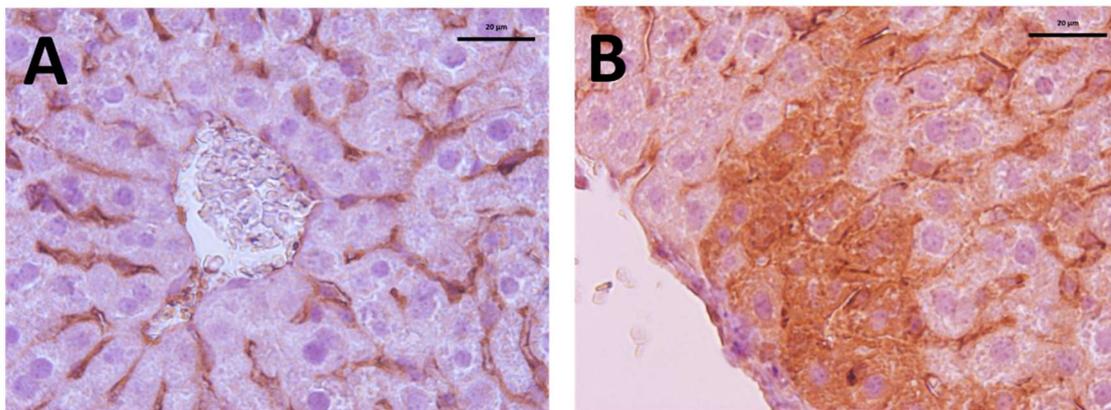


Figure S9. Liver immunohistochemical images staining in brown the CD34 expression. In section (a) the normal liver histology showing the normal CD34 expression in endothelial cells. In (b) CD34 is expressed specifically in hematopoietic cells.

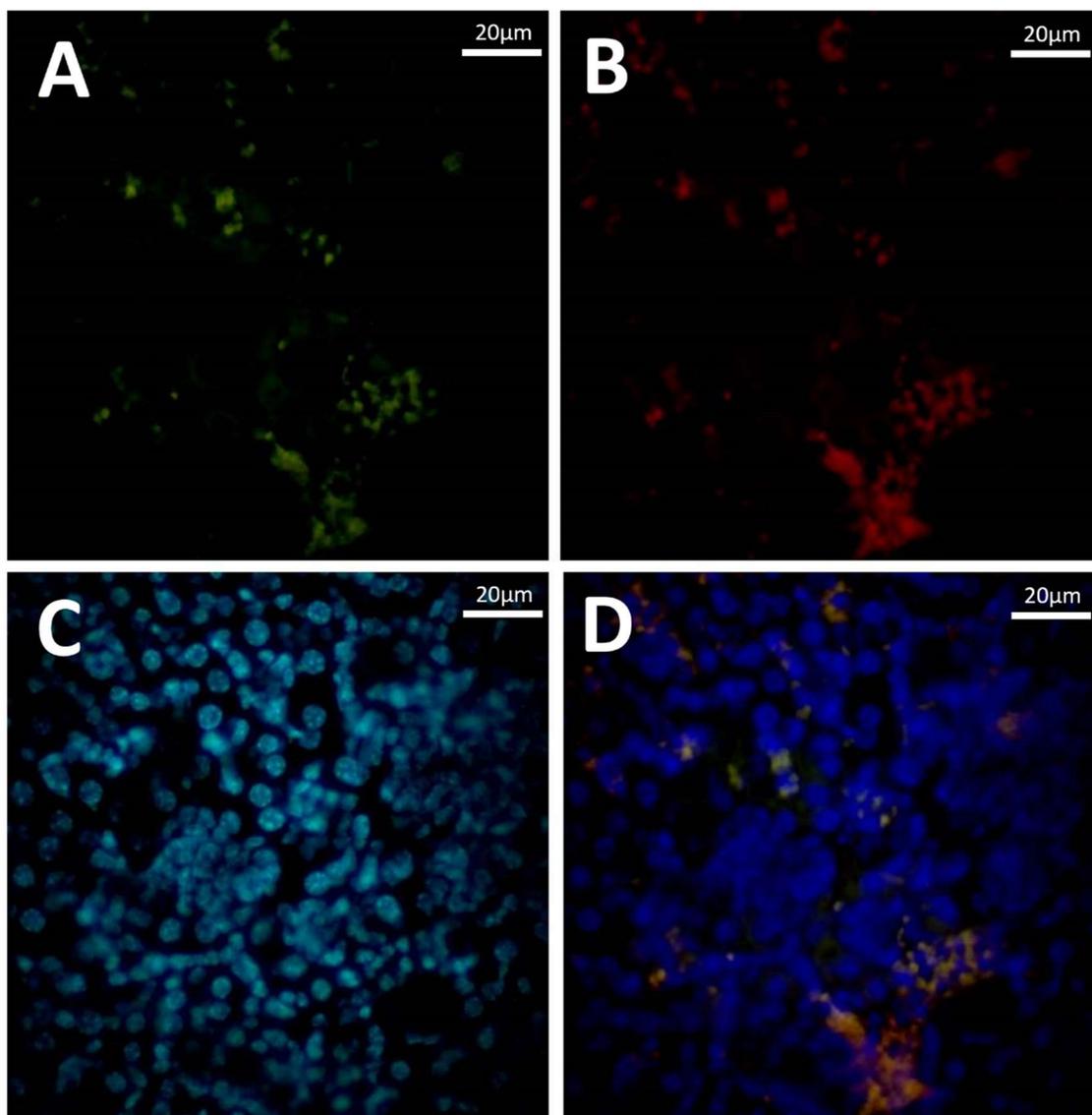


Figure S10. Represents immunofluorescent of MDSC (myeloid derived suppressor cells) in liver tissue. This specific myeloid cell line is characterized by the double expression of GR1 (red) in section (b) and CD11b (green) in section (a). Section (c) represents nuclei staining (DAPI) and section (d) represents the images superposition, confirming the double expression of MDSC.

#### **REFERENCES**

1. Longo, J.P.F., et al., *Prevention of Distant Lung Metastasis After Photodynamic Therapy Application in a Breast Cancer Tumor Model*. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2016. **12**(4): p. 689-699.

**ANEXO B** – Editorial “pH-Sensitive Nanoparticles for Cancer Therapy: Is this a Real Innovation in Nanomedicine?” publicado na Nano Research & Applications

DOI: 10.21767/2471-9838.100e19

## pH-Sensitive Nanoparticles for Cancer Therapy: Is this a Real Innovation in Nanomedicine?

Ana Lygia Câmara, and JRSJP Figueró Longo

Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

**Corresponding author:** JRSJP Figueró Longo, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil, Tel: +55 61 3107-3087; Fax: +556181432755; E-mail: jplongo82@gmail.com

**Received:** Mar 14, 2017 **Accepted:** Mar 15, 2017 **Published:** Mar 17, 2016.

**Citation:** Camara AL, Figueró Longo JRSJP. pH-Sensitive Nanoparticles for Cancer Therapy: Is this a Real Innovation in Nanomedicine? Nano Res Appl 2017; 2:2.

### Editorial

In past decades, nanomedicine made impressive progress from basic science to clinical application. The goal of nanoparticles in nanomedicine is to develop systems capable of carrying, releasing and delivering their payload drugs in an efficient manner to target tissues. Despite the important advances in nanotechnology and nanomedicine, these technological translations for new pharmaceutical products did not meet the expectations of the scientific community. The gap between the promising *in vivo* pre-clinical results and the outcome of clinical trials was not closed, and this continues to challenge researchers worldwide.

As described previously in 2012 [1,2] nanoparticles with sizes ranging from 30 nm to 200 nm can be specifically taken up by tumor tissues. This is a classical phenomenon, well known as the enhanced permeability and retention (EPR) effect. The EPR effect is based on aberrant permeable tumor blood vessels, which have large pore vessels and selectively and passively absorb plasmatic particles in that nanosize (30-200) range. After that, nanoparticles accumulate inside tumor interstices and are retained in tumors for long periods due to the low density of lymphatic drainage, typical of these malignant tissues [3].

Nowadays, there are some examples of passive-target nanomedicines approved for clinical cancer treatment. Among them are: Oncaspar, approved in 1994, which is PEGasparaginase indicated for leukemia; Doxil (Caelyx), approved in 1995, which is a pegylated doxorubicin indicated for ovarian/breast cancer; DaunoXome, approved in 1996, which is a liposome-encapsulated Daunorubicin indicated for sarcoma; Myocet, approved in 2000 in Europe and Canada, which is a liposome-encapsulated doxorubicin indicated for breast cancer; and Abraxane, approved in 2013, which are albumin-bound paclitaxel nano spheres indicated for various types of cancer [4].

These nanomedicines are used for clinical applications; however, some recent reports have claimed that these nano-carriers are able to deliver just 0.7% of the injected dose to target tumor tissues. Thus, researchers are trying to develop nano-carriers that are able not only to deliver chemotherapeutical drugs in a passively way, but also in an

active form [5]. One of the strategies used is the development of nanoparticles capable of releasing the payload after receiving external stimuli. Stimuli-responsive nanoparticles have been widely used in different diseases; they can release the drug by different stimuli, such as pH, temperature, hypoxia, light, ultrasonic and enzymatic activation. Effective delivery systems have been synthesized and developed using physical stimuli over the years. Berndt et al. [5] used a trigger temperature; Ercole et al. [6] light; Yan et al. [7] ultrasonic; Felber et al. [8] pH and Kang and Bae [9] used enzyme. Nanomaterials with responsiveness triggers have a greater potential than traditional delivery systems [10].

For nanomedicine, pH-responsive nanoparticles are promising particles for specific drug delivery to acid tissues, such as cancer or infected tissue sites. In general, these pH-sensitive nanocarriers are stable at physiological pH, but under acidic conditions, they release drug content specifically at target tissues [10].

For cancer therapy, as an example, it is possible to use pH-sensitiveness due to the pathophysiological characteristics of this malignant tissue. Almost all tumor types have lower pH in comparison to normal healthy tissues [11]. As the tumor grows faster, the angiogenesis is not able to supply all the new cells formed. The physiological consequence is that tumor tissues have a lower density of blood vessels, a fact that creates regions with lower oxygen supply. This condition modifies tumor phenotype, switching tumor metabolism from aerobic to anaerobic respiration. This situation produces CO<sub>2</sub> and carbonic acid in excess, which breaks tissue buffers and reduces tissue pH. Depending upon the grade of tumor vascular density, these reactions can be more or less intense. This is way in which tumor type may influence pH sensitive triggers.

Several innovative approaches related to pH-sensitive nanoparticles used for antitumor evaluation may be highlighted. Silva et al. [12] reported the biodistribution profile evaluation of pH-sensitive long-circulating liposomes (SpHL) containing (99mTc) DOX in 4T1 tumor-bearing BALB/c mice, showing higher accumulation of the nanoparticle in the tumor area, suggesting selective delivery of doxorubicin into tumor. Karimi et al. [13] described magnetic nanoparticles as a novel pH-sensitive system for methotrexate targeting of tumor

tissues in cancer chemotherapy, and compared to the conventional treatment it shows a better result. In this regard, Tang et al. [14] provide results from a dual-pH-sensitive micelle loaded with the chemotherapeutic agent paclitaxel, showing 77.7% inhibition rates in tumor growth and 88.3% in lung metastasis without significant toxicity, which makes it a promising nanocarrier for effective metastatic tumor therapy. Based on these results, we may be able to introduce this specific system as an innovation for cancer therapy, avoiding one of the major problems, namely side effects.

The idea is to combine conventional nano-carriers with pH-responsive systems that release drug content only under specific conditions, such as acid pH. In this concept, the nanocarrier can be made up of lipids (liposomes, nanoemulsions and solid-lipid nanoparticles), polymers, dendrimers, metal and inorganic semiconductor nanocrystals (quantum dots), among others. The pH-responsive system can be prodrugs or complexes linked to the matrix nanoparticle. This strategy combines two different approaches to deliver drugs specifically to tumor tissues: (1) passive accumulation provided by the conventional nano-carriers; and (2) active drug release provided by the delivery upon external stimuli. Considering that the main purpose in nanomedicine and nanotherapies is to avoid damage to healthy organs, this innovative approach can improve the effectiveness of nanomedicine to treat clinical tumors.

## References:

- Albanese A, Tang PS, Chan WC (2012) The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Ann Rev Biomed Eng* 14: 1-16.
- Longo J, Muehlmann L, Almeida-Santos M, Azevedo R (2015) Preventing metastasis by targeting lymphatic vessels with photodynamic therapy based on nanostructured photosensitizers. *J Nanomed Nanotechnol* 5: 1.
- Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer res* 46: 6387-6392.
- Pillai G (2014) Nanomedicines for cancer therapy: An update of FDA approved and those under various stages of development. *SOJ Pharm Pharm Sci* 1: 13.
- Berndt I, Popescu C, Wortmann FJ, Richtering W (2006) Mechanics versus thermodynamics: Swelling in multiple temperature-Sensitive core-shell microgels. *Angew Chem Int Ed* 45: 1081-1085.
- Ercole F, Davis TP, Evans RA (2010) Photo-responsive systems and biomaterials: Photochromic polymers, light-triggered self-assembly, surface modification, fluorescence modulation and beyond. *Polym Chem* 1: 37-54.
- Yan F, Li L, Deng Z, Jin Q, Chen J, et al. (2013) Paclitaxel-liposome-microbubble complexes as ultrasound-triggered therapeutic drug delivery carriers. *J Control Rel* 166: 246-255.
- Felber AE, Dufresne MH, Leroux JC (2012) pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Adv drug deliv rev* 64: 979-992.
- Kang HC, Bae YH (2011) Co-delivery of small interfering RNA and plasmid DNA using a polymeric vector incorporating endosomolytic oligomeric sulphonamide. *Biomaterials* 32: 4914-4924.
- Liu J, Huang Y, Kumar A, Tan A, Jin S, et al. (2014) pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol adv* 32: 693-710.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-899.
- Silva JO, Fernandes RS, Lopes SC, Cardoso VN, Leite EA, et al. (2016) pH-sensitive, long-circulating liposomes as an alternative tool to deliver doxorubicin into tumors: A feasibility animal study. *Mol Imag Biol* 18: 898-904.
- Karimi Z, Abbasi S, Shokrollahi H, Yousefi G, Fahham M, et al. (2017) Pegylated and amphiphilic Chitosan coated manganese ferrite nanoparticles for pH-sensitive delivery of methotrexate: Synthesis and characterization. *Mater Sci Eng* 71: 504-511.
- Tang S, Meng Q, Sun H, Su J, Yin Q, et al. (2017) Dual pH-sensitive micelles with charge-switch for controlling cellular uptake and drug release to treat metastatic breast cancer. *Biomaterials* 114: 44-53.

ANEXO C – Aprovação do comitê de ética para uso animal

Brasília, 12 de novembro de 2014.



**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO ANTITUMORAL E BIODISTRIBUIÇÃO IN VIVO E EX VIVO DE NANOEMULSÕES CONTENDO DOXORUBICINA", UNEDOC n.º 142293/2014, sob responsabilidade do Professor João Paulo Figueiredo Lendo, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Mus musculus: B1. A presente aprovação é válida pelo período de 05/12/2014 a 05/05/2015.





Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior  
Coordenador da CEUA

\*Este documento de registro é avaliação ética do projeto submetido e não substitui outras licenças e permissões que possam ser necessárias.