



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Marina Arantes Radicchi

**Avaliação da Prevenção da Perda Óssea com
Doxorrubicina Associada à Nanopartícula Lipídica
Sólida em Câncer de Mama**

Brasília

2024

Marina Arantes Radicchi

**Avaliação da Prevenção da Perda Óssea com
Doxorrubicina Associada à Nanopartícula Lipídica
Sólida em Câncer de Mama**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

Orientadora: Prof. Dra. Sônia Nair Bão

Brasília

2024

Agradecimentos

Agradeço a minha família que eu nasci, onde sempre tive apoio, amo vocês. Agradeço principalmente a minha mami, Lis, que é a responsável por todas as minhas conquistas. Ao meu pai, Murilo, sempre disposto a me ajudar e agradeço também a Julinha que é minha hermanita, sempre fechando o bonde e me defendendo.

Agradeço a minha família que eu criei, vocês são minha rede de apoio, te amo gatinhas. Vics por fazer de tudo pra me ajudar, na alegria, na tristeza e na vida cigana. Day e Ellen, minhas amigas pau-pra-toda obra. Gabi por ser sempre um momento de alegria na minha vida. Renata por ter sido tão importante ao longo da minha juventude.

House of Vics, mesmo que extinta foi uma família que me trouxe pra cima todas as vezes, companheiros de loucura, meus avant-pop cheio de autenticidade, donos das melhores viagens.

Todas as gatas do LMM e Nanoverso, por me aguentarem e oferecerem tantas fofocas boas, fazendo galinhagem na sala de estudos, trazendo alegria nos dias mais uó. Gabs, Isa, Luiza, Bruneca, Karen&Marina, NCG, Ingrid, Karine, Dafne, Luís, Victória, Dani e todas as outras que contribuíram nesse trabalho.

Agradeço também o professor João Paulo, ele que segue abrindo tantas portas, me guiou numa área que sou feliz e gosto tanto sem perder a descontração e tornando a ciência agradável.

Finalizando, gostaria de agradecer a professora Sônia por ser uma mulher excepcional, referência em tudo que faz, por ter me dado a oportunidade de participar de seu laboratório na minha formação acadêmica e principalmente por ter acreditado no meu trabalho.

“She's got herself a little piece of heaven
Waiting for the time when Earth shall be as one”

Madonna – Ray of Light

“I don't wanna be alone forever, but I love gypsy life”

Lady Gaga - Gypsy

Resumo

O Câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes perfis moleculares, apresentando metástases em órgãos como pulmões e ossos. As metástases são responsáveis pela redução da qualidade de vida, maior necessidade de atendimento hospitalar e é a principal causa de morte. A terapia convencional utiliza de estratégias medicamentosas associadas à cirurgia e radioterapia, o principal objetivo é o combate às células cancerosas e a redução da inflamação provocada pelo tratamento. A terapia adjuvante que é utilizada para controle do processo inflamatório promove a perda óssea, impactando na progressão tumoral, uma vez que o tecido ósseo é reservatório de fatores de crescimento e moléculas importantes para o estabelecimento de células cancerosas em sítios metastáticos. A fim de minimizar efeitos adversos em órgãos livres de tumor e assim prevenir o surgimento de metástases ósseas, a nanobiotecnologia é empregada através da utilização de nanopartículas lipídicas sólidas contendo doxorubicina. O tratamento nanoestruturado apresentou prevenção da perda óssea em estudos prévios e está sendo estudado sobre sua capacidade de modular a diferenciação de células do tecido ósseo assim como prevenir a redução da densidade mineral óssea em modelo experimental de câncer de mama em camundongos.

Palavras chave: câncer de mama; perda óssea; quimioterapia; doxorubicina.

Abstract

Breast cancer is a heterogeneous disease with different molecular profiles, with common metastase sites such as lungs and bones. Metastases are responsible for poor life quality, and hospital care and are the leading cause of death by breast cancer. Conventional drug therapy is associated with surgery and radiotherapy, the main goal is to kill cancer cells and reduce inflammation caused by the treatment. Adjuvant therapy is used to control the inflammatory process and, unfortunately, promotes tumor progression since bone tissue is a reservoir of growth factors and important molecules to establish cancer cells in metastatic sites. Nanobiotechnology is important to minimize the adverse effects on tumor-free organs and thus prevent the promotion of bone metastases through solid lipid nanoparticles of doxorubicin. The nanostructured treatment presented bone loss prevention in previous studies and was analyzed for its ability to modulate differentiation of bone cells and bone mineral density conservation in experimental mice models for breast cancer.

Keywords: breast cancer; bone loss; chemotherapy; doxorubicin.

Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice de Ilustrações	3
Índice de Tabelas	11
Anexos	11
Lista de Siglas e Abreviações.....	12
Introdução.....	15
Referencial Teórico.....	18
1. Dados Epidemiológicos de Câncer de Mama.....	18
2. Câncer de mama	19
2.1. Metástase Óssea	21
2.2. Tratamentos	24
3. Nanotecnologia	26
3.1. Nanopartícula lipídica sólida	27
4. Pré clínico.....	28
5. Imageamento <i>in vivo</i>	28
Justificativa	32
Objetivos.....	34
Objetivo Geral.....	34
Objetivos Específicos	34
Metodologia	34
Delineamento experimental	34
Preparo da Doxorubicina Base Livre.....	35
Formulação da Nanopartícula Lipídica Sólida contendo Doxorubicina Base Livre	36

Caracterização NLSDox	37
Quantificação da Doxorubicina.....	38
Avaliação da prevenção da perda óssea <i>in vivo</i>	39
Análise de dados e estatística	54
Resultados e Discussão	54
Formulação de nanopartícula lipídica sólida contendo doxorubicina (NLSDox)	54
Avaliação da biodistribuição da NLSDox em camundongos com tumor	61
Avaliação da prevenção da perda óssea provocada pela quimioterapia em animais sem tumor.....	69
Avaliação da prevenção da perda óssea em animais com tumor após a quimioterapia com SLNDox	79
Conclusões e Perspectivas.....	95
Referências Bibliográficas	98

Índice de Ilustrações

- Figura 1** – Interação de células cancerosas com tecidos ósseos através da sinalização da via RANK. 22
- Figura 2** - Representação da emissão de bioluminescência pelas células 4T1-Luciferase enxertadas no animal e suas subseqüentes metástases pulmonar e óssea. 29
- Figura 3** - Ilustração do funcionamento de um tomógrafo computadorizado, onde é mensurada a atenuação do raio x pelos diferentes tecidos do corpo do animal. 31
- Figura 4** - Escala de Hounsfield, onde a atenuação do raio x pela água equivale a zero e a atenuação do ar dada por -1000, a partir dessa escala é determinado o HU para o tecido. 31
- Figura 5** - A presença de doenças pulmonares aumenta a atenuação do raio x na região pulmonar. 32
- Figura 6** – A atenuação do raio x pelo tecido ósseo é reduzida em regiões de reabsorção óssea. 32
- Figura 7** - Esquematização da hipótese do projeto, onde o câncer de mama promove as metástases pulmonar e óssea, que ao serem tratadas com doxorubicina apresentam perda óssea agravada, esse efeito adverso é prevenido com o tratamento com NLSDox. 35
- Figura 8** - Ilustração da transformação entre DoxHCl para DoxFB e sua alteração de cor. 35
- Figura 9** – Delineamento experimental da avaliação da prevenção da perda óssea em animais com ou sem tumor após tratamento com SLNDox. 40
- Figura 10** - Esquema ilustrativo do delineamento experimental realizado para a avaliação da biodistribuição de doxorubicina em animais com tumor tratados com NLSDox. 45
- Figura 11** - Representação gráfica do planejamento experimental in vivo da avaliação da perda óssea. 47
- Figura 12** - Corte transversal na região da caixa torácica, tendo em destaque a delimitação do volume de interesse do pulmão na projeção 3D obtida por tomografia computadorizada. 51

Figura 13 – Corte longitudinal da imagem por tomografia computadorizada do camundongo com contornos em azul delimitando regiões do esqueleto do animal. 52

Figura 14 - Morfologia da NLSDox. **A)** Desenho esquematizando a doxorrubicina encapsulada no lipídeo cristalizado. **B)** Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão da NLSDox. 55

Figura 15 - Micrografia obtida com microscópio eletrônico de transmissão da NLSDox. 55

Figura 16 - Frequência de distribuição dos tamanhos das NLSDox mensuradas a partir da micrografia de MET, onde a linha vermelha representa a distribuição Gaussiana dos tamanhos. 56

Figura 17 – Estabilidade da NLSDox ao longo do tempo em diferentes condições de armazenamento. **A)** Apresenta o diâmetro hidrodinâmico. Em **(B)**, o índice de polidispersão relativo ao diâmetro hidrodinâmico. **C)** Apresenta o potencial zeta em relação ao tempo. 57

Figura 18 – Varredura do espectro de emissão de fluorescência em diferentes meios de dispersão, onde as amostras foram excitadas em 450nm. **A)** Representa o a intensidade emitida pela NLSDox. Em **(B)** está o espectro do cloridrato de doxorrubicina. **C)** Apresenta o espectro para a doxorrubicina em forma de base livre, já em **(D)** estão os espectros controle dos meios utilizados. 58

Figura 19 – Varredura do espectro de absorção de fluorescência em diferentes meios de dispersão, quando a emissão está fixa em 550nm. **A)** Indica os espectros de absorção para a NLSDox. Em **(B)** está o espectro do cloridrato de doxorrubicina. **(C)** apresenta o espectro para a doxorrubicina em forma de base livre. **D** representa o controle, contendo somente os solventes 59

Figura 20 – Espectro de absorção **(A)** em relação ao emitido em 580 nm e espectro de emissão **(B)** com excitação em 480 nm para o cloridrato de doxorrubicina, a doxorrubicina base livre e NLSDox em etanol PA, tendo somente o etanol como controle. 60

Figura 21 - Curva padrão em espectrofluorimetria para DoxHCl e DoxFB e seus respectivos R^2 . 60

Figura 22 – Ensaio de liberação da doxorubicina. A apresenta a liberação cumulativa em concentração da doxorubicina em diferentes formas de apresentação. B indica a porcentagem de liberação do fármaco por diálise. 61

Figura 23 - Variação do peso corporal (A) e peso dos órgãos coletados dos animais para a avaliação da biodistribuição de doxorubicina: baço (B), coração (C), fígado (D), linfonodo axilar (E), pulmão (F), rins (G) e tumor (H), quando presente. Valores de p observados em B são equivalentes a 0,0017 para NLSDox, 0,0005, em DoxHCl e 0,0053 para PBS quando comparados com os animais saudáveis. 62

Figura 24 - Perfil da progressão tumoral nos camundongos antes do tratamento para avaliação da biodistribuição. A área sob a curva da bioluminescência na região do tumor primário (A) e na região da metástase pulmonar (B). A diferença estatística representada por * em B corresponde a $p=0,0271$. C apresenta a área sob a curva da radiância emitida ao longo de 3 semanas para o tumor primário. A área sob a curva da região da metástase pulmonar está em D, com $p=0,0271$. 63

Figura 25 - Curvas de quantificação da doxorubicina em diferentes meios de tecidos coletados na avaliação da biodistribuição do fármaco. 64

Figura 26 - Quantificação da doxorubicina extraída dos órgãos coletados 4 horas após o tratamento da biodistribuição. A) Baço com * indicando $p=0,0187$, B) Coração com * indicando $p=0,0364$, C) Fêmur, D) Fígado E) Linfonodo, F) Pulmão com ** indicando $p=0,0015$, G) Rins, H) Sangue e I) Tumor. 66

Figura 27 - Análise hematológica da parte branca do sangue dos camundongos após 4 horas de tratamento. A) Concentração de leucócitos totais com ** para $p=0,0041$ e *** para $p=0,001$, B) Porcentagem de células pequenas, onde os valores de p encontrados para NLSDox, DoxHCl e PBS em relação ao controle são de $<0,0001$, $<0,0001$, e 0,0034 respectivamente. C) Concentração de células brancas de tamanho pequeno. D) Porcentagem de células medianas onde os valores de p obtidos foram de 0,0019 para NLSDox e de 0,0069 para DoxHCl. E) Concentração de células de tamanho médio com ** representando $p=0,0010$. F) Porcentagem de células grandes e G) com a concentração de células de tamanho grande, onde * equivale ao $p=0,0407$. 67

Figura 28 - Análise hematológica da parte vermelha do sangue dos camundongos após 4 horas de tratamento. A) Concentração de eritrócitos, B)

Porcentagem de hematócritos, **C)** Concentração de hemoglobina, **D)** Concentração de hemoglobina corpuscular média, **E)** Concentração de hemoglobina corpuscular média, **F)** Concentração de plaquetas, **G)** Volume corpuscular médio com ** representando $p=0,0020$ e *** com $p=0,0006$, **H)** Desvio padrão da distribuição de eritrócitos e **I)** Coeficiente de variação da distribuição de eritrócitos. 68

Figura 29 - Avaliação da variação do peso corporal (**A**) e do peso dos órgãos coletados dos animais sem tumor 6 semanas após o tratamento. **B)** Baço com valores de $p=0,0007$ para DoxHCl, $p=0,0009$ para os Sádios e $p=0,0022$ para Dexametasona quando comparados aos animais tratados com NLSDox. Os outros órgãos coletados foram coração (**C**), fígado (**D**, $p=0,0164$), linfonodo (**E**), pulmão (**F**) e rins (**G**). 70

Figura 30 - Análise hematológica da parte branca do sangue de animais tratados sem tumor. **A)** leucócitos totais. **B)** concentração de células pequenas. **C)** porcentagem de células pequenas, com alterações significativas nos animais tratados com NLSDox ($p=0,0005$) em comparação com DoxHCl, também há redução nos animais tratados com DoxHCl ($p=0,0001$) e dexametasona ($p=0,0215$) em relação aos sádios. **D)** concentração de células de tamanho médio. **E)** porcentagem de células medianas onde NLSDox apresenta diferença com DoxHCl ($p=0,0006$) e dexametasona, esses mesmos grupos apresentaram diferenças em relação aos animais saudáveis ($p=0,0001$ e $0,0072$ respectivamente). **F)** concentração das células grandes. **G)** porcentagem de células de maior tamanho ($p=0,0138$). 71

Figura 31 - Hematologia da porção vermelha do sangue de animais tratados sem tumor. **A)** concentração de eritrócitos. **B)** concentração de hemoglobina. **C)** porcentagem de hematócritos com diferenças significativas de NLSDox ($p=0,0038$), sadio ($p=0,0014$) e dexametasona ($p=0,0010$) em relação aos animais tratados com DoxHCl. **D)** hemoglobina corpuscular média ($p=0,0147$). **E)** concentração da hemoglobina corpuscular média. **F)** concentração de plaquetas. **G)** volume corpuscular médio, onde dexametasona apresentou aumento em relação a NLSDox, DoxHCl e sadio ($p < 0,0001$, $0,0026$ e $0,0003$ respectivamente). **H)** desvio padrão da distribuição dos eritrócitos com dexametasona apresentando diferença significativa em relação a NLSDox ($p=0,0135$), DoxHCl ($p=0,0019$) e sádios ($p=0,0094$), os animais tratados com

DoxHCl também apresentaram aumento em relação a NLSDox ($p < 0,0001$) e os sadios ($p < 0,0001$). **I**) coeficiente de variação da distribuição dos eritrócitos, onde DoxHCl apresentou aumento em relação a NLSDox, sadios e dexametasona (valores de $p = 0,0032$, $0,0071$ e $0,0086$ respectivamente). 72

Figura 32 - Porcentagem de sobrevivência dos animais ao longo de seis semanas de experimentação. 73

Figura 33 – Imageamento de quimioluminescência em inflamação crônica nos animais sem tumor. **A**) fotografias obtidas da distribuição dos fótons emitidos. **B**) a quantificação da radiância na região do tumor primário (flanco esquerdo) ($p = 0,472$). 74

Figura 34 - Parâmetros obtidos em animais saudáveis em relação ao volume dos tecidos (**A**), maior valor de HU encontrado na região pulmonar (**B**) e menor valor de HU encontrado no tecido ósseo (**C**). 75

Figura 35 - Mensuração do volume obtido após a segmentação do tecido ósseo (**A**) e do pulmão (**B**) em tomografia computadorizada. 75

Figura 36 - Quantificação do HU nos voxels presentes de menor valor no tecido ósseo (**A**) e de maior valor no pulmão (**B**). 76

Figura 37 - Pranchas de raio x da região torácica obtidas por tomografia computadorizada. **A**) NLSDox. **B**) DoxHCl. **C**) Sadio. **D**) Dexametasona. 77

Figura 38 - Imageamento por tomografia computadorizada do tecido ósseo observado em diferentes resoluções e processamentos da imagem. Setas azuis indicam o osso esponjoso, setas verdes indicam a placa de crescimento e a seta branca aponta a perda óssea no osso compacto. 78

Figura 39 - Micrografias de fêmur dos animais tratados sem tumor em diferentes magnificações no corte longitudinal. As setas verdes indicam a organização do osso esponjoso na região da medula óssea e as setas azuis apontam pontos de reabsorção óssea. 79

Figura 40 – Avaliação do peso ao longo do tempo (**A**) e do peso dos órgãos coletados após o tratamento. Em **B** o baço teve alterações no peso em animais com tumor tratados com NLSDox ($p = 0,0009$) e sem tratamento, com PBS ($p = 0,0125$) quando comparados com os sadios, já os animais tratados com DoxHCl apresentaram menor peso no baço em relação aos tratados com NLSDox ($p = 0,0125$). Os pesos do coração (**C**), fígado (**D**), linfonodo axilar (**E**), rins (**G**) e tumor (**H**) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

O peso do pulmão (**F**) apresentou diferenças significativas entre os grupos, onde dexametasona aumentou o peso em relação a DoxHCl ($p=0,0025$), PBS ($p=0,0105$) e sadios ($p=0,0015$), NLSDox também apresentou um aumento em relação a DoxHCl ($p=0,0307$) e sadios ($p=0,0165$). 80

Figura 41 – Análise hematológica da fase branca do sangue dos animais com tumor 6 semanas após o tratamento. **A**) leucócitos totais ($p=0,0273$). **B**) concentração de células pequenas. **C**) porcentagem de células pequenas, onde **** apresenta $p<0,0001$. **D**) concentração de células medianas ($p=0,0193$). **E**) porcentagem de células de médio tamanho, com aumentos em relação ao controle nos grupos NLSDox, DoxHCl, PBS e dexametasona, onde os valores de **** equivalem ao $p<0,0001$. **F**) concentração de células grandes ($p=0,0445$). **G**) porcentagem de células de tamanho grande. 82

Figura 42 -Análise hematológica das células vermelhas presentes no sangue dos animais com tumor após seis semanas de tratamento. **A**) concentração de eritrócitos. **B**) concentração de hemoglobina. **C**) porcentagem de hematócitos. **D**) hemoglobina corpuscular média. **E**) concentração de hemoglobina corpuscular média. **F**) concentração de plaquetas. **G**) volume corpuscular médio com aumento do grupo dexametasona em relação ao DoxHCl ($p=0,0232$) e sadios ($p=0,0152$). **H**) desvio padrão da distribuição de eritrócitos com aumento do DoxHCl em relação a NLSDox ($p=0,0038$), PBS ($p=0,0289$) e sadios ($p=0,0001$), com alteração também nos animais tratados com dexametasona ($p=0,0263$) em relação aos sadios. **I**) coeficiente de variação da distribuição dos eritrócitos com aumento em DoxHCl em relação a NLSDox ($p=0,0071$), PBS ($p=0,0409$), dexametasona ($p=0,0266$) e animais sadios ($p=0,0024$). 83

Figura 43 – Avaliação hematológica para os animais tratados com DoxHCl com e sem tumor. Os valores de p para **** são $<0,0001$. Em **A**, o aumento nos leucócitos totais nos animais sem tratamento em relação aos tratados com tumor ($p=0,0287$), sem tumor ($p=0,0353$) e sadios ($p=0,0213$). **B**) porcentagem de células pequenas, e os animais sem tumor apresentam diferenças entre os com tumor ($p=0,0004$), PBS ($p=0,0013$) e os sadios ($p=0,0057$). **C**) porcentagem de células medianas com alteração dos animais sem tumor em relação aos com tumor ($p=0,0010$), sem tratamento ($p=0,0025$) e sadios ($p=0,0014$). **D**) porcentagem de células grandes. **E**) porcentagem de

hematócritos ($p=0,0099$). **F**) volume corpuscular médio. **G**) coeficiente da variação da distribuição de eritrócitos com aumentos nos animais tratados com tumor ($p=0,0133$) e sem tumor ($p=0,0347$) em relação ao controle. **H**) desvio padrão na distribuição dos eritrócitos com alterações em relação aos sadios nos grupos de animais sem tumor ($p<0,0001$) e PBS ($p=0,0217$), os animais tratados com tumor também apresentaram aumento em relação aos sem tratamento ($p=0,0093$). 84

Figura 44 – Análise hematológica dos animais tratados com NLSDox. **A**) leucócitos totais com aumentos nos animais com tumor em relação aos sem tumor ($p=0,0070$) e sadios ($p=0,0085$). **B**) porcentagem de células pequenas ($p<0,0001$). **C**) porcentagem de células medianas ($p<0,0001$). **D**) porcentagem de células grandes ($p=0,0124$). **E**) porcentagem de hematócritos ($p=0,0455$). **F**) volume corpuscular médio ($p=0,0078$). **G**) coeficiente de variação da distribuição de eritrócitos. **H**) desvio padrão da distribuição dos eritrócitos com aumentos nos animais com tumor em relação ao sem tumor ($p=0,0019$) e sadios ($p=0,0015$), também observado nos animais sem tratamento em relação aos sem tumor ($p=0,0014$) e sadios ($p=0,0011$). 85

Figura 45 – Fotografias da emissão de bioluminescência pelas células cancerosas em animais ao longo da experimentação, a escala de cores indica a radiância dos fótons emitidos. 87

Figura 46 – Quantificação dos fótons emitidos pelas células cancerosas presentes na região do tumor primário (**A** e **B**) e da metástase pulmonar (**C** e **D**). O perfil da progressão do tumor primário ao longo do tempo é apresentado pela área sob a curva dos grupos, com aumento nos animais tratados com dexametasona em relação ao NLSDox ($p=0,0070$), DoxHCl ($p=0,0086$) e PBS ($p=0,0126$) (**B**). Em **D**, a sexta semana na região da metástase pulmonar apresentou redução nos animais tratados com NLSDox em relação aos tratados com DoxHCl ($p=0,0003$), sem tratamento ($p<0,0001$) e dexametasona ($p=0,0088$). 88

Figura 47 – Avaliação de parâmetros clínicos durante a experimentação. **A**) mensuração do volume tumoral por paquímetro. **B**) porcentagem de sobrevivência ao longo de seis semanas de experimentação. 89

Figura 48 – Ensaio de inflamação crônica por quimioluminescência na sexta semana de experimentação. **A**) fotografias dos fótons emitidos pela

lucigenina em regiões inflamadas nos animais. **B)** quantificação da emissão de fótons na região do tumor primário, os animais com NLSDox apresentaram valores maiores que os DoxHCl ($p=0,0049$), PBS apresentou maior inflamação em relação aos tratados com DoxHCl ($p=0,0440$) e os grupos NLSDox ($p=0,0072$), DoxHCl ($p<0,0001$), PBS ($p=0,0041$) e dexametasona ($p=0,0034$) apresentaram menor atividade de células do sistema imunitários em relação aos animais saudáveis. 90

Figura 49 – Mensuração de volumes segmentados por tomografia computadorizada. **A)** tecido ósseo. **B)** pulmão. 91

Figura 50 – Avaliação dos valores de HU presentes no voxels dos volumes de interesse avaliados na tomografia computadorizada. **A)** menores valores de HU no tecido ósseo. **B)** maiores valores de HU no pulmão. 92

Figura 51 – Pranchas de raio x da região pulmonar obtidas por tomografia computadorizada na sexta semana de experimentação. **A)** NLSDox. **B)** DoxHCl. **C)** PBS. **D)** Saudáveis. **E)** Dexametasona. 93

Figura 52 – Projeções de tomografia computadorizada do tecido ósseo em diferentes tamanhos de voxel, onde as setas azuis indicam o osso esponjoso, as setas verdes apontam a placa de crescimento e a seta branca indica a perda óssea na porção compacta do osso. 94

Figura 53 – Micrografias do corte transversal de fêmures dos animais após seis semanas de tratamento obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As setas verdes indicam a organização do osso esponjoso, as setas rosas apontam a placa de crescimento e as setas azuis indicam o osso esponjoso com maior magnificação. 95

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Subtipos do câncer de mama em relação a presença e ausência de receptores HR e HER2.	19
Tabela 2 - Relação da Composição e concentração das formulações NLSDox e NLSBranca.....	37
Tabela 4 - Parâmetros utilizados para a avaliação da bioluminescência emitida pelas células cancerosas após administração de luciferina nos camundongos.....	44
Tabela 5 - Distribuição do número de animais por grupo experimental para a avaliação da biodistribuição de doxorubicina.	45
Tabela 6 - Listagem de grupos experimentais e número de animais para a avaliação da prevenção da perda óssea.	48
Tabela 7 - Parâmetros técnicos utilizados para aquisição de imagens tridimensionais por tomografia computadorizada em camundongos sem administração de contraste.	49
Tabela 8 - Correlação linear para as curvas obtidas na quantificação de doxorubicina em diferentes meios, representadas pela equação e coeficiente de determinação (R^2).	65

Anexos

Anexo 1 - Declaração de aprovação da utilização de camundongos pela CEUA - UnB.	106
---	-----

Lista de Siglas e Abreviações

% - Porcentagem

%EE – Taxa de eficiência de encapsulação

µg - Micrograma

µg/mL - Microgramas por mililitro

BMD – Densidade mineral óssea

Ca₅(PO₄)₃(OH) - Hidroxiapatita

CEUA – Comitê de ética no uso animal

cm² – Centímetro quadrado

CT – Tomografia computadorizada

CTGF – Fator de crescimento do tecido conjuntivo

CXCR4 – Receptor tipo 4 da quimiocinas CXC

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DoxHCl – Cloridrato de Doxorrubicina

DoxFB – Doxorrubicina Base Livre

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPR – Efeito de permeação e retenção aumentada

FBP – Filtered Back Projection

h - Hora

HCl – Ácido clorídrico

HU – Unidade de Hounsfield

IC₅₀ – Concentração inibitória média

IFE – Inner Filter Effect

IL-11 – Interleucina 11

kV - Quilovolts

M - Molar

mA – Miliamperes

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônico de varredura

mg - Miligrama

mg/kg – Miligramas por quilo

min - Minutos

mL - Mililitro

MSC – Células-tronco mesenquimais

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

mV - Milivolts

NaOH – Hidróxido de sódio

ng - Nanograma

ng/mL – Nanograma por mililitro

NLS – Nanopartícula lipídica sólida

NLSDox – Nanopartícula lipídica sólida contendo doxorubicina

nm – Nanômetros

nM - Nanomolar

° - Grau

°C – Grau Celsius

OPN - Osteopontina

P1NP - Peptídeo pró-colágeno do tipo 1

PA – Grau de pureza para análise

PBS – Phosphate-buffered saline – Tampão fosfato-salino

PDI – Índice de polidispersão

pH – Potencial hidrogeniônico

PMT - Fotomultiplicador

R² – Coeficiente de determinação

RANK - Receptor do fator nuclear kappa-B

RANKL- Ligante do receptor do fator nuclear kappa-B

rpm – Rotações por minuto

s - Segundos

TGF-β - Fator de Transformação do Crescimento Beta

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato 5b

v/v – Volume por volume

VCAM-1 – Proteína de adesão vascular 1

Introdução

O câncer de mama é uma doença heterogênea com diferentes perfis moleculares, essa heterogeneidade é responsável pela dificuldade na determinação do prognóstico, sobrevida, probabilidade de reincidência e disseminação de metástases ^{1;2}. A metástase do câncer de mama pode ocorrer nos pulmões, ossos, fígado e cérebro, onde o osso é o mais frequente ^{2;3} e o cérebro em último lugar, o tempo de vida médio do paciente com metástase óssea é de 36 meses, já para a metástase cerebral, o tempo cai para 8 meses ¹. A metástase óssea é frequente em 70% dos pacientes com câncer de mama em estágios avançados, sendo assim um alvo terapêutico e de pesquisa ^{2;4}.

Na teoria do *Seed and Soil* apresentada por Paget em 1889 ^{5;6}, uma célula cancerosa (semente) é dependente de um microambiente tumoral (solo) favorável, a presença de RANKL no tecido ósseo age como o solo necessário para o estabelecimento da metástase do câncer de mama e a sua ausência prejudica a progressão tumoral ^{5;7}. A interação de células tumorais para a região óssea, com a consequente modulação do sistema imunitário e promoção de metástases proporciona um microambiente favorável para a reabsorção óssea a fim da exploração de fatores de crescimento e outros nutrientes ^{7;8}.

A terapia convencional do câncer de mama consiste em diferentes estratégias comumente associadas, os tratamentos mais comuns são a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e hormonioterapia ⁹. Devido à heterogeneidade da doença, muitas vezes o paciente passa por inúmeros tratamentos a fim de evitar o surgimento de metástases, essas responsáveis por 90% das mortes de câncer de mama ^{4;9}.

Para o tratamento da perda óssea relacionada ao câncer de mama bisfosfonatos são utilizados na clínica, mas apresentam diversos efeitos adversos raros, como osteonecrose, fraturas e disfunções renais ^{3; 10; 11; 12; 13}. Além do uso de bisfosfonatos, há suplementação com cálcio e vitamina D e a utilização de anticorpos monoclonais para prevenção da perda óssea, tendo como principal alvo o RANKL ^{3; 12; 14}.

Um dos principais objetivos do tratamento da metástase óssea, além da eliminação do tumor, é o aumento do tempo de sobrevivência do paciente, prevenindo complicações a longo prazo. No caso da quimioterapia, o paciente pode enfrentar cardiopatias, menopausa prematura, osteoporose, enfraquecimento esquelético entre outros efeitos ^{15; 16; 17}.

A doxorubicina é uma antraciclina amplamente utilizada na clínica como quimioterápico para o combate de câncer sólido e alguns tipos de leucemia ^{18; 19; 20; 21}. Possui alguns mecanismos de ação elucidados, onde o fármaco desestabiliza a membrana, interage com a topoisomerase II, intercala DNA e também leva ao estresse oxidativo ^{20; 21}, sendo assim, a doxorubicina é eficiente para o combate de células cancerosas, já que essas possuem alta taxa de replicação e a ação do fármaco provoca danos irreparáveis que levam as células à morte ^{18; 19; 22; 23}.

O tratamento com doxorubicina apresenta muitos efeitos adversos, agudos, a longo prazo e severos, como por exemplo: náuseas, arritmia, mielossupressão, danos ao coração, fígado, esqueleto e cérebro ^{18; 22; 24; 25}. Os danos da doxorubicina no tecido ósseo são responsáveis pela modulação do metabolismo para a reabsorção óssea, promovendo a perda óssea e reduzindo a densidade mineral óssea (BMD) ^{15; 24}. Ainda, corticosteroides usados para aliviar efeitos da doxorubicina também, levam a perda óssea ²⁶.

A fim de sobrepor as falhas do tratamento convencional da quimioterapia, a nanobiotecnologia é utilizada como ferramenta para a modulação da farmacocinética e farmacodinâmica de fármacos ²⁷. As nanoestruturas para o tratamento de câncer têm sua eficácia baseada principalmente no Efeito de Retenção Aumentada (EPR) ^{27; 28}, onde a nanoestrutura contendo o fármaco permeia do sistema circulatório para o microambiente tumoral e consequentemente para o interior das células cancerosas, essa permeação é permitida pela maior fenestração nos capilares defeituosos da angiogênese tumoral, onde há a entrada facilitada para o interstício tumoral e o aprisionamento da nanoestrutura ²⁷.

Ao se encontrar aprisionada no microambiente tumoral e também no interior das células, o fármaco é liberado das nanoestruturas com menor

distribuição para órgãos e tecidos sem a presença de tumor ^{28; 29}. Por ser baseado em um processo de angiogênese disfuncional durante a progressão tumoral, o efeito EPR apresenta heterogeneidade, permeações diferentes entre tipos tumorais e seus metabolismos ^{29; 30}. O efeito EPR vem sendo questionado em relação à quantificação da entrega de fármacos na região tumoral, apresentando apenas 7% em uma metanálise realizada em 2016 ³⁰.

A associação da doxorrubicina com uma nanopartícula lipídica sólida promove as vantagens do direcionamento do tratamento, reduzindo os efeitos adversos, garantindo a eficácia do tratamento e promovendo melhor sobrevida nos pacientes tratados. Para a avaliação da prevenção da perda óssea com o tratamento do câncer de mama com uma nanopartícula lipídica sólida contendo doxorrubicina, a experimentação pode ser realizada em estudos pré clínicos.

Em estudos prévios do grupo de pesquisa no qual este trabalho foi executado, foi observada, através de tomografia, a diferença entre densidade óssea em camundongos Balb/c tratados com doxorrubicina livre quando comparada com o tratamento nanoestruturado. Além da prevenção da perda óssea, também foi observado o potencial da prevenção da metástase pulmonar com Nanopartícula lipídica sólida (NLS) contendo docetaxel e nanoemulsão contendo doxorrubicina ^{31; 32; 33; 34}.

Para a realização de estudos sobre densidade óssea e disseminação de metástases ³⁵, o imageamento *in vivo* é uma ferramenta essencial que garante a maior visualização de fenômenos dentro de um só indivíduo, a análise é realizada com o animal vivo em anestesia, descartando a necessidade de eutanásia dos grupos de animais para avaliação *ex vivo* ³⁶.

A união de experimentações *in vitro*, ensaios pré-clínicos com camundongos e a avaliação de estruturas com microscopias de alta resolução garantem um delineamento experimental potente e capaz de oferecer resultados satisfatórios para a elucidação dos efeitos da doxorrubicina nas metástases ósseas do câncer de mama e como a nanobiotecnologia pode interferir nesses efeitos adversos, promovendo a prevenção da perda óssea.

Referencial Teórico

1. Dados Epidemiológicos de Câncer de Mama

O câncer é definido pelo crescimento anormal de células, é um grupo de doenças do acaso, onde a combinação de mutações, alterações metabólicas e imunológicas, células se tornam capazes de proliferar, invadir, migrar e colonizar tecidos saudáveis promovendo crescimento tumoral, metástases e subsequentemente levando o paciente ao óbito.

No ponto de vista global, o câncer de mama é atualmente a neoplasia mais diagnosticada, com a taxa de 1 em 8 diagnósticos. Foram registrados 2.3 milhões de novos casos em 2020, sendo 25% dos cânceres diagnosticados em mulheres³⁷. O número de casos é crescente ao longo dos anos, em comparação com as estatísticas do ano 2000 onde foram registrados 1,05 milhões de casos quando o câncer de mama era o segundo mais comum no mundo, após o câncer de pulmão, atualmente essa neoplasia ocupa o primeiro lugar^{37; 38; 39}.

Analisando em perspectiva para o ano de 2040, é esperado um aumento de 40% na incidência de novos casos de câncer de mama no contexto global seguido de 50% mais mortes pela doença, atingindo principalmente países em desenvolvimento e com menor Índice de Desenvolvimento Humano³⁷.

A *Global Breast Cancer Initiative* da Organização Mundial de Saúde fomenta iniciativas com o foco na redução da mortalidade pelo câncer de mama no mundo, tendo como pilares o diagnóstico precoce, o manejo adequados dos pacientes e melhores tratamentos³⁷.

O Instituto Nacional de Câncer, INCA apresentou em seu relatório anual os Dados e Números Sobre o Câncer de Mama de 2022⁴⁰, onde a estimativa para o ano 2023 é o registro de 73.610 novos casos de câncer de mama no Brasil, com a incidência de 41,89 casos a cada 100.000 mulheres no país⁴⁰.

A estimativa de mortalidade para 2023 é de 11,84 em 100.000 mulheres, tornando a neoplasia de mama a maior causa de morte por câncer em mulheres⁴⁰. O Brasil apresenta menor mortalidade em comparação com a Argentina e Uruguai, assim como menor incidência³⁷, iniciativas do governo federal incluem

políticas públicas e programas como o Sistema Único de Saúde (SUS), onde foram realizadas 3.497.439 mamografias em 2021, promovendo o melhor acesso à diagnósticos e tratamentos, assim como acompanhamento para mulheres com mais de 50 anos ⁴⁰.

A realização de mamografias é indicada a cada 2 anos em mulheres com 50 a 69 anos, sendo a forma de rastreamento, prevenção e diagnóstico precoce mais importante no SUS, para essa faixa etária estima-se que 58,3% das mulheres realizam o exame na frequência recomendada. A distribuição é desigual quando comparada com diferentes níveis de instrução que para mulheres com nível superior completo a taxa é de 77,8%, já para as mulheres sem instrução, a porcentagem que realiza os exames regularmente é de 49%, indicando que o acesso a saúde precisa melhorar em populações com menor renda e instrução ⁴⁰.

2. Câncer de mama

O câncer de mama é altamente heterogêneo e apresenta diferentes morfologias, prognósticos, alvos terapêuticos e impactos no paciente. A sua classificação pode ser de acordo com marcadores imuno-histoquímicos, baseados em expressão de receptores de hormônio ou perfil molecular com grupos de genótipos ^{39; 41; 42; 43; 44}.

A classificação imuno-histoquímica de cânceres de mama é dividida na expressão dos receptores de hormônio (HR) progesterona e estrogênio e na expressão de HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), um receptor para fator de crescimento que promove proliferação, inibindo apoptose, competências essenciais para o crescimento tumoral ^{39; 42; 43; 44}. Os quatro subtipos, determinados por esses receptores estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Subtipos do câncer de mama em relação a presença e ausência de receptores HR e HER2.

HR	HER2
+	+
+	-
-	+
-	-

O subtipo HR- e HER2- é também denominado câncer de mama triplo negativo (TNBC) ^{39; 42}, responsável por 15-20% dos casos, apresentando o pior prognóstico e ausência de resposta para hormonioterapias ³⁹.

Considerando o perfil molecular, o câncer de mama pode ser classificado nos subtipos Luminal A ou B, rico em HER2+ e tipo basal. O subtipo luminal A corresponde a 40% dos diagnósticos, apresentando o melhor prognóstico por sua alta expressão de receptores de estrogênio, promovendo uma boa resposta dos pacientes ao tratamento com hormônios. Para o subtipo luminal B, estão 20% dos casos, caracterizado pelos baixos níveis de expressão de receptores hormonais e alto níveis de expressão de genes proliferativos, os pacientes são frequentemente tratados com quimioterapia ³⁹.

Tumores com alta expressão de HER2 também apresentam expressão exacerbada de genes relacionados com proliferação, este subtipo corresponde a 15% dos casos. O restante dos casos é classificado como tipo basal, onde 77% destes são do tipo triplo negativo ³⁹.

As classificações de tumores no tipo basal e triplo negativo não são sinônimas, 71% dos casos de câncer triplo negativo se enquadram no subtipo molecular tipo basal. Tumores triplo negativos apresentam vasta heterogeneidade e são divididos em seis subtipos: tipos basais (BL1 e BL2), mesenquimal (M), mesenquimal com células-tronco (MSL), imunomodulatório (IM), luminal com receptor de andrógeno (LAR) e inespecífico (UNS) ^{39; 42}.

O subtipo triplo negativo apresenta alta mortalidade por seu potencial de formação de metástases, onde 20 a 30% dos pacientes apresentam recorrência da doença em metástases ⁴³. Os tecidos com maior incidência de estabelecimento de metástases para o câncer de mama triplo negativo são os ossos, fígado, pulmão e cérebro, onde o osso é o alvo mais comum e o cérebro o menos comum ³⁹.

O perfil molecular de cada subtipo proporciona um perfil de migração e adesão diferente, para câncer de mama com altos níveis de HER2 e os triplo negativo, a chance de metástase é maior. O tecido ósseo é alvo com maior

incidência de metástase por tumores que expressão receptores de hormônio (HR+). No caso da metástase óssea, a sobrevivência em 5 anos cai de 80% para 25% em relação ao paciente somente com tumor primário ³⁹.

2.1. Metástase Óssea

A metástase é o processo onde as células cancerosas colonizam órgãos distintos de sua origem e formam novos tumores através das etapas de invasão, migração, adesão e sobrevivência ³⁹. Esse processo é alvo de pesquisas há mais de um século, tendo como destaque o trabalho de Paget em 1889 ⁵, onde o autor descreveu a formação de metástases com o termo “*seed and soil*”, com as micrometástases agindo como uma semente e o órgão colonizado sendo preparado como um solo ^{5; 39}.

O processo de formação de metástase inicia com o crescimento desordenado do tumor primário, privando as células de acesso à vascularização, sendo necessária a indução de angiogênese para que as células cancerosas tenham acesso a nutrientes. A angiogênese tumoral é irregular, criando novos vasos com fenestras e poros maiores que os normais, dessa forma as células do tumor possuem canais para extravasamento e acesso ao sistema circulatório ³⁹.

Para invadir o sistema circulatório, as células cancerosas passam pela transição de fenótipo epitelial para o mesenquimal, secretando metaloproteinases, digerindo a membrana basal para invadir a matriz extracelular e os tecidos adjacentes ³⁹.

Uma vez com acesso ao sistema circulatório, os pequenos grupos de células cancerosas circulam pelos vasos sanguíneos e linfáticos, onde estão sujeitas a adversidades e atividade imunológica antitumoral sendo eliminadas imediatamente. A sobrevivência das células tumorais circulantes é crucial para a formação de metástases, esses grupos circulam e são retidos em capilares, penetrando a membrana dos vasos e acessando os microambientes dos órgãos alvo ³⁹.

O microambiente ósseo age como “solo” para as micrometástases por expressar quimiocinas e citocinas que recrutam e proporcionam a sobrevivência de células cancerosas do tumor primário. O sistema RANK/RANKL/OPG é

determinado com osteoblastos excretando RANKL para induzir a diferenciação de osteoblastos RANK+, aumentando a reabsorção óssea e liberando moléculas presentes na matriz mineral do osso, a formação óssea é regulada com a expressão de OPG por osteoblastos, fator de inibição da osteoclastogênese. Células cancerosas que expressam RANK são recrutadas para o microambiente ósseo, modulando o metabolismo ósseo para a reabsorção, sendo então beneficiadas com a maior proporção de RANKL para OPG e tendo acesso aos nutrientes extraídos pela reabsorção da matriz óssea ³⁹ (**Figura 1**).

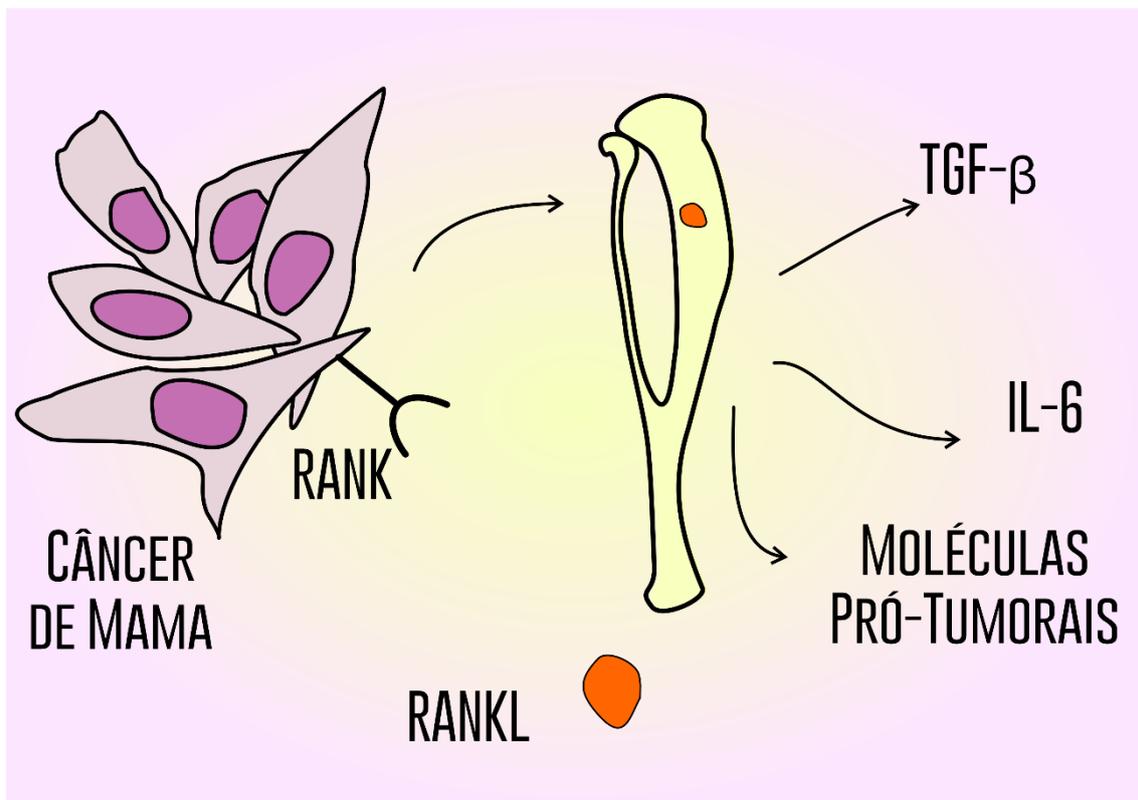


Figura 1 – Interação de células cancerosas com tecidos ósseos através da sinalização da via RANK.

Ao encontrar o microambiente ósseo, as células cancerosas alteram seu fenótipo a fim de adaptar e colonizar o tecido rico em fatores de crescimento, sendo necessária a capacidade de adesão, com células cancerosas expressando integrina e caderina. A integrina $\alpha V\beta_3$ regula a adesão de células do tumor para o osso trabecular ao se ligar em peptídeos presentes em proteínas do microambiente ósseo como a osteopontina, osteosialina e nectina. A expressão de e-caderina é marcada pela transição do fenótipo mesenquimal

de volta para epitelial, onde as células cancerosas retornam à aderência no osso³⁹.

Após aderidas ao tecido ósseo, a metástase precisa proliferar a fim de garantir a sobrevivência destas células, para isso expressam paratormônio (PTH) com o objetivo de estimular a expressão de RANKL, reduzir os níveis de OPG e modular o metabolismo ósseo com a promoção da atividade de osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea e a liberação de fatores de crescimento, entre eles o TGF- β , VEGF, IGFs, BMPs e cálcio, este responsável por interferir na função do estrogênio, garantindo a maior sobrevivência^{39; 45; 46}.

O câncer de mama possui metástases osteolíticas³, onde o metabolismo das células cancerosas promove a reabsorção óssea, liberando TGF- β ^{7; 47}, um fator de crescimento pró inflamatório importante para o estabelecimento da metástase e também para o crescimento do tumor primário^{11; 47; 48}. A perda óssea provocada pela menopausa é de 1-2% ao ano, já com quimioterapia, esse índice chega a 7% ao ano⁴⁹.

A reabsorção óssea promovida pelo câncer de mama pode ser realizada pelas células cancerosas, mas é frequentemente atribuída à modulação da diferenciação e atividade de osteoclastos e osteoblastos^{8; 24; 47; 48; 50}. A liberação de TGF- β inicia um ciclo de retroalimentação positiva⁷, o tecido ósseo é o maior reservatório de TGF- β ^{48; 50; 51; 52}, que ao ser reabsorvido torna disponível a proteína que leva à reabsorção.

O TGF- β é o fator de crescimento que controla a proliferação, apoptose diferenciação e inflamação, sendo uma citocina multifuncional, garantindo a homeostase^{48; 51}. No tecido ósseo, o TGF- β é responsável pela regulação de fatores pré-osteolíticos, como a proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), expressada também pelas células cancerosas, induzindo a osteoclastogênese, proliferação e angiogênese, processo fundamental para a sobrevivência e o que é chamado de “preparo do solo” para a formação de metástases ósseas³⁹.

A sinalização entre osteoblastos e osteoclastos é dada pela interação de RANK com seu ligante RANKL, a proteína de membrana RANK está presente em osteoclastos e também em células cancerosas, provocando uma atração química de células do tumor para os ossos, um microambiente rico em proteínas,

fatores de crescimento e citocinas pró-tumorais ^{3;7}. Células do epitélio mamário produzem RANK sob modulação hormonal e são capazes de invadir a matriz óssea a partir da atividade de colagenases ³.

Além do sistema RANK/RANKL, outras moléculas influenciam na progressão da metástase óssea do câncer de mama como a IL-11, que age como fator osteolítico, a CTGF agindo como fator angiogênico, a CXCR4 que promove a adesão das células e VCAM-1 promove o crescimento do tumor, quebra a dormência de micrometátases e promove osteólise ⁷.

A interação do câncer de mama com o tecido ósseo tem presença marcante do sistema imunitário de outros grupos de células, como no caso das células-tronco mesenquimais (MSCs), progenitoras multipotentes. As MSCs, apesar de estarem em pequenas quantidades na medula, são mobilizadas pelo tumor, onde liberam quimiocinas e citocinas para a proliferação, angiogênese, supressão da ação antitumoral do sistema imunitário e mobilidade ⁷.

2.2. Tratamentos

Além do diagnóstico precoce, é importante a escolha do tratamento a ser utilizado para o câncer de mama e suas metástases, com a presença de receptores para estrogênios, a terapia hormonal é comumente utilizada, além disso há a remoção cirúrgica do tumor, imunoterapia, radioterapia e a quimioterapia com antibióticos antineoplásicos.

Após estabelecimento das células cancerosas, a metástase óssea se torna um tumor responsável por piora no prognóstico e crescente mortalidade entre os pacientes, e com isso o tratamento visa prolongar a vida e aliviar os sintomas além de eliminar as células cancerosas.

Os fármacos antineoplásicos são citotóxicos, implicando em reações adversas, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, dessa forma, a entrega e especificidade do tratamento são desejáveis para melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes.

Diferentes fármacos são utilizados na quimioterapia para câncer de mama, a doxorrubicina tem papel de destaque por seu amplo uso e alta eficiência. A doxorrubicina é uma antraciclina, antibiótico antineoplásico isolado

do fungo *Streptomyces peucetius caesius* (ATCC 27952), teve a sua patente depositada em 1971 pelo grupo farmacêutico italiano *Farmitalia Research Laboratories*.

É um fármaco amplamente investigado, contando com 2.399 testes clínicos, com 95 novos testes anuais desde 2005 de acordo com a plataforma *Clinical Trials*^{53; 54}. É indicado para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como o de ovário, pulmão, leucemias e câncer de mama.

A Doxorrubicina é caracterizada como um pó vermelho, quando na composição de cloridrato, sua fórmula $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$ corresponde ao peso molecular de 580 g/mol. Possui alta solubilidade em água na forma de cloridrato e muda de cor do vermelho para violeta com pH acima de 9, além disso o fármaco é fluorescente, emitindo fótons no comprimento de onda de 550 a 580 quando excitada em 480nm^{55; 56; 57; 58}.

A toxicidade da doxorrubicina é elevada, provocando danos cardíacos irreversíveis e com isso a quimioterapia é limitada, provoca também supressão gonadal, implicando em infertilidade, outros efeitos adversos incluem a mielossupressão, leucopenia, náusea e vômitos, úlceras no trato digestivo e mucosas, perda de audição, broncoespasmos, fibrose e edema pulmonar e alopecia^{18; 21; 22; 59; 60; 61}.

A quimioterapia com doxorrubicina leva ao estresse oxidativo^{21; 23; 62; 63}, gerando quimiocinas responsáveis pelo aumento da inflamação, maior indução de TGF- β , levando ao desbalanço entre as atividades de osteoclastos e osteoblastos^{20; 63}. O TGF- β por sua vez promove o crescimento tumoral, interferindo na eficácia do tratamento⁴⁸.

A fim de sobrepor a resistência ao fármaco, reduzir efeitos adversos, aumentar eficiência do tratamento e melhorar a qualidade de vida do paciente tratado, a associação da doxorrubicina com nanoestruturas é investigada há mais de 80 anos, com isso foi aprovado pelo FDA em 1995 o uso do Doxil (Janssen, Bélgica), uma formulação de doxorrubicina internalizada em lipossoma, o Doxil reduziu efeitos adversos, sobrepôs resistência e é usado atualmente^{19; 64; 65}.

Por ser um sistema baseado em lipossomas, o Doxil apresenta desvantagens relacionadas à estabilidade da nanoestrutura, reprodutibilidade, escalonamento e capacidade de encapsulação. Como alternativa, foram desenvolvidos nos anos 1980 as nanopartículas lipídicas sólidas, nanoestruturas que contemplam as vantagens dos lipossomas e sobrepõem suas desvantagens ^{66; 67}.

A associação da doxorrubicina a nanoestruturas promove a maior eficiência com redução dos efeitos adversos, promovendo uma melhor quimioterapia, reduzindo a mortalidade dos pacientes.

3. Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma área com diversos domínios da ciência e tecnologia a fim de desenvolver, estudar e aplicar nanomateriais, nanoestruturas e nanosistemas. O nanômetro, termo cunhado na década de 1960s, determinado por 1 bilionésimo de metro, ou seja 10^{-9} , se tornou a escala de estudo para nanotecnologia e outras áreas como por exemplo biologia molecular, virologia e biologia celular ⁶⁸.

A escala nanométrica contempla diferentes estruturas conhecidas como o DNA que possui raio de 1nm, hemácias com aproximadamente 7000nm de diâmetro e nanopartículas lipídicas com tamanho frequente de 50 a 200nm ⁶⁸.

Barhoum *et al*, 2022 ⁶⁸ descrevem em sua revisão os diferentes tipos de nanomateriais, classificação, sua história e como podem ser utilizados. A nanotecnologia pode ser classificada em natural, incidental, bioinspirada e projetada, onde o material natural é o que foi formado por fenômenos geográficos naturais, como por exemplo nanotubos de carbonos vindos da erupção vulcânica ⁶⁸.

Os materiais incidentais são resultantes da atividade humana sem propósito para sua formação, o copo de Licurgo (Roma Antiga) é um exemplo com o desenvolvimento de um vidro dicróico que apresentava diferente coloração com a incidência de luz, este artefato apresentava nanopartículas de ouro em sua composição, estas nanopartículas não eram compreendidas pela tecnologia da época e sua formulação é considerada incidental ⁶⁸.

As nanoestruturas projetadas foram descritas e desenvolvidas na era moderna, com as primeiras publicações por pesquisadores no final do século 1800, Michael Faraday descreveu uma solução de nanopartículas de ouro com capacidade de alterar sua cor em 1857. Contemporaneamente diversas nanoestruturas são utilizadas como por exemplo as nanopartículas de TiO₂, utilizada em protetores solar. A partir das nanoestruturas projetadas, há o desenvolvimento de materiais bioinspirados, onde sua formulação visa mimetizar propriedades naturais, aumentando sua eficácia ⁶⁸.

As nanopartículas são investigadas para o desenvolvimento de novas terapias com características físico-químicas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas favoráveis para a solução de problemas comuns em tratamento e cura de doenças modernas ⁶⁸.

3.1. Nanopartícula lipídica sólida

Um tipo de nanoestrutura é a nanopartícula lipídica sólida (NLS), tendo como característica a presença de um lipídeo sólido em sua composição. A formulação das NLS compreende no aquecimento dos reagentes para atingir o ponto de fusão do lipídeo sólido e conseqüentemente provocar o resfriamento do material para formar uma nanopartícula cristalizada contendo o fármaco de interesse ^{69; 70; 71}.

Dentro das vantagens da NLS sobre outros tipos de nanoestruturas está a possibilidade de escalonamento, dispensa o uso de solventes tóxicos, composição biocompatível e maior estabilidade ^{27; 69}. Dessa forma, a associação da doxorubicina à NLS proporciona a combinação das vantagens do sistema nanoestruturado e redução dos efeitos adversos na terapia do câncer de mama ⁶⁹.

Partindo do princípio que a NLS, assim como outras nanoestruturas, promove um direcionamento da doxorubicina para a região tumoral ⁷², esta não estará concentrada em regiões inespecíficas como o coração e o tecido ósseo, assim prevenindo a perda óssea causada pela quimioterapia no câncer de mama ⁷³.

O dano causado pela doxorubicina em tecidos inespecíficos, como o coração, é dado pelo estresse oxidativo, afetando mitocôndria e seu DNA, levando à autofagia, oxidação de ácidos graxos e apoptose de cardiomiócitos ⁶⁰. O uso de nanoestruturas leva ao diferente perfil de biodistribuição do fármaco, reduzindo o acúmulo de doxorubicina no coração ⁷⁴.

Em publicações prévias do grupo de pesquisa, foi desenvolvida uma nanopartícula lipídica sólida com boa capacidade de encapsulação, estabilidade e metodologia de formulação simplificada, onde foi associado o Docetaxel na formulação NLSDTX, esse tratamento reduziu o volume tumoral, não apresentou toxicidade na nanoestrutura sem o fármaco e agregou as vantagens dos nanosistemas ao tratamento do câncer de mama em camundongos e também em experimentação *in vitro* ³¹.

4. Pré-clínico

A experimentação pré-clínica é fundamental para selecionar candidatos viáveis para a experimentação clínica e aplicação na indústria e sistemas de saúde com humanos. Após o desenvolvimento da nanopartícula, testes *in vitro* e ensaios de toxicidade são realizados antes da experimentação *in vivo*, com isso há a escolha de concentrações e metodologias viáveis para a obtenção de resultados positivos em experimentos com animais cobaia.

Para a realização dos experimentos pré-clínico, modelos animais foram desenvolvidos como padrões para avaliação de condições específicas com baixa variabilidade. O modelo de tumor murino com a utilização de camundongos fêmea Balb/c e o enxerto de células 4T1 é eficaz, promove a possibilidade de investigar a ação de tratamentos e a biologia de um tumor adenocarcinoma mamário murino triplo negativo, com formação de metástases ⁷⁵.

5. Imageamento *in vivo*

O imageamento *in vivo* consiste de técnicas capazes de produzir dados qualitativos e quantitativos de um animal sem a necessidade de eutanásia, suas principais ferramentas são a tomografia computadorizada (CT), a ressonância magnética e aparelhos que utilizam fluorescência, bioluminescência e quimiluminescência ³⁶.

A excelência da pesquisa pré-clínica com imageamento *in vivo* se dá pela avaliação de fenômenos ao longo do tempo, em um só indivíduo, reduzindo a quantidade de animais utilizados na pesquisa e mesmo assim agregando com dados quantitativos ³⁶. Para avaliar a progressão tumoral, um modelo experimental ^{35; 76} utiliza de células cancerosas transfectadas com genes de luciferase, tornando o tumor bioluminescente após a administração do substrato luciferina no animal, e dessa forma as células cancerosas são rastreadas e quantificadas em camundongos, como representado na **Figura 2**.

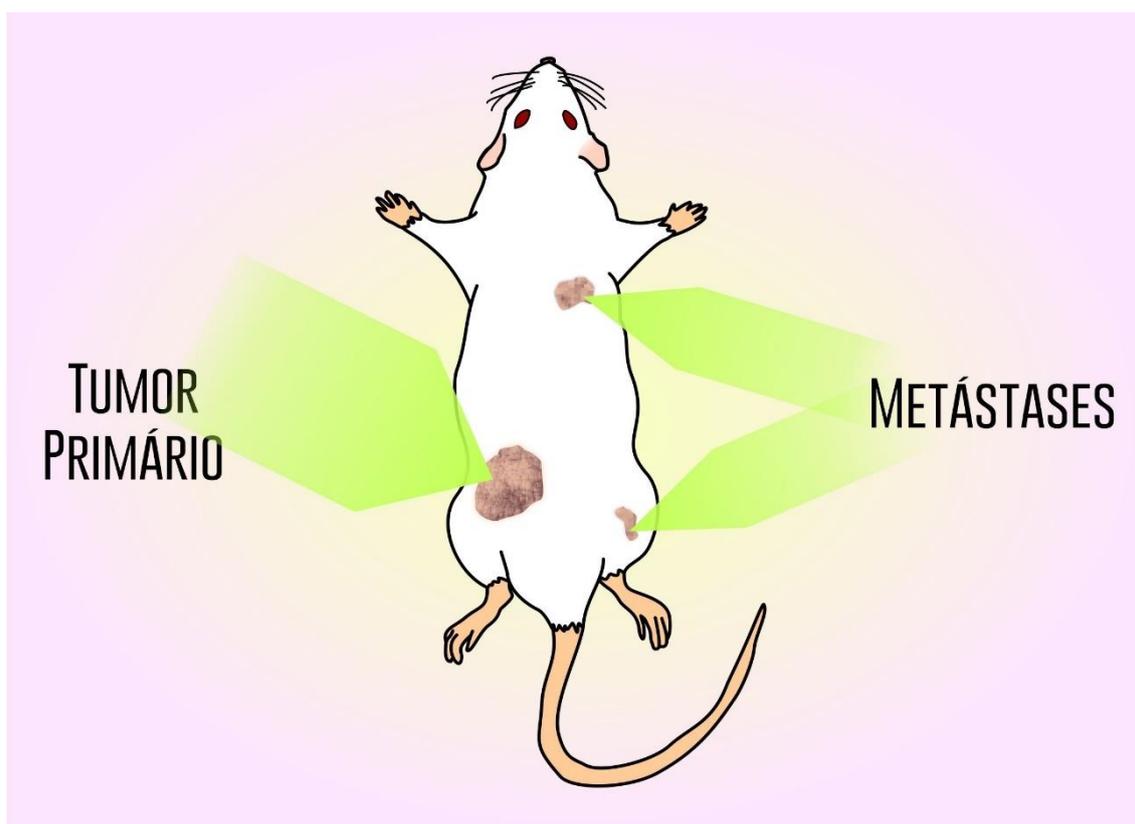


Figura 2 - Representação da emissão de bioluminescência pelas células 4T1-Luciferase enxertadas no animal e suas subsequentes metástases pulmonar e óssea.

Outros marcadores luminescentes podem ser utilizados, como por exemplo o luminol e a lucigenina, ambos sinalizam processos inflamatórios por terem reações químicas que emitem fótons ao serem catalisadas por metais e espécies reativas de oxigênio, respectivamente ^{76; 77; 78}. A combinação de luminol e lucigenina administrada em um camundongo proporciona a avaliação do perfil inflamatório em relação a uma resposta aguda ou crônica e sua localização bidimensional no corpo do animal ^{77; 79}.

Outra técnica que proporciona uma visualização da progressão tumoral e seus efeitos nos órgãos dos animais é a tomografia computadorizada, onde é possível visualizar os efeitos da metástase do câncer de mama mesmo sem a utilização de contrastes, já que os órgãos afetados pela progressão tumoral da metástase são o pulmão e os ossos ³⁶.

O pulmão é de fácil visualização em técnicas baseadas em raio x pela ausência de atenuação por parte do ar presente nos pulmões, dessa forma é quantificada a quantidade de ar na porção interna, indicando a condição do órgão. Para o tecido ósseo, há a contrastação natural proporcionada pela alta concentração de cálcio, que promove uma alta atenuação do raio x ³⁶ e então há maior contraste em relação ao tecido mole, dessa forma é possível avaliar a progressão da metástase óssea através da avaliação da densidade óssea mineral ^{80; 81}.

Apesar de proporcionar avanços na pesquisa pré-clínica, o imageamento *in vivo* muitas vezes se limita em resolução ⁸². Para observar alterações em escalas de menor tamanho, é preciso a utilização de ferramentas como a microscopia de alta resolução, e processos baseados na coleta de amostras ou materiais *ex vivo*, como a quantificação de biomarcadores bioquímicos ^{82; 83}.

Além de técnicas baseadas em emissão de fótons, a tomografia computadorizada utiliza a quantificação de ondas de raio x para avaliar diferenças em tecidos nos modelos animais. A quantificação de raio x é amplamente utilizada para o imageamento e avaliação da densidade óssea em humanos e na pesquisa pré-clínica, a atenuação do raio x é dependente da radiodensidade do material que se encontra entre a fonte de emissão e o detector. A **Figura 3** representa a estrutura e funcionamento do imageamento de camundongos por tomografia computadorizada.

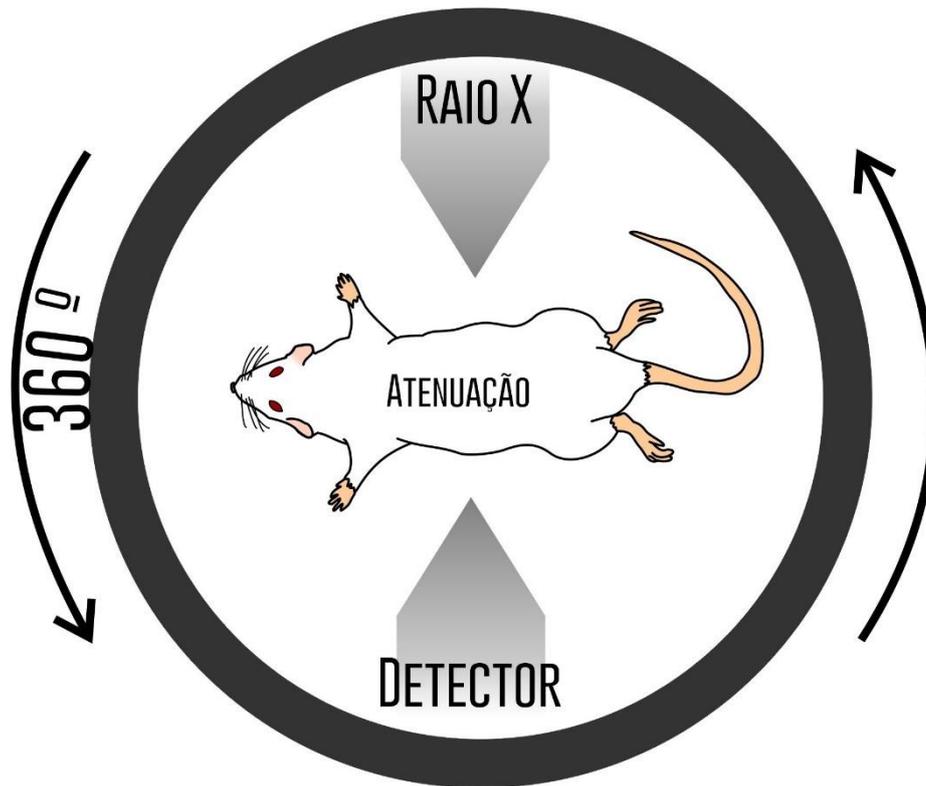


Figura 3 - Ilustração do funcionamento de um tomógrafo computadorizado, onde é mensurada a atenuação do raio x pelos diferentes tecidos do corpo do animal.

A quantificação da atenuação do raio x se dá pela distribuição de *voxels* na escala de Hounsfield (HU), onde é selecionado um volume de interesse (VOI) na imagem e então obtida um gráfico de distribuição de *voxels* por HU, os valores são segmentados em faixas correspondentes ao volume pulmonar ou ao tecido ósseo a fim de gerar imagens contendo as regiões de interesse para o experimento, como exemplificado na **Figura 4**.

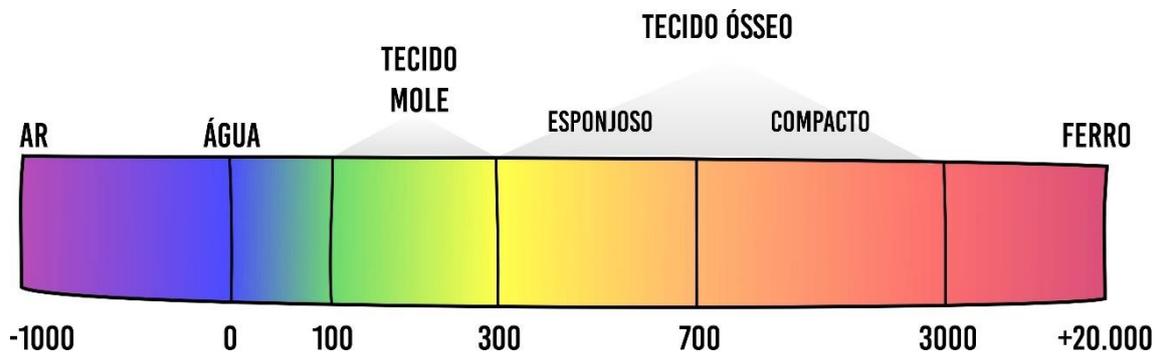


Figura 4 - Escala de Hounsfield, onde a atenuação do raio x pela água equivale a zero e a atenuação do ar dada por -1000, a partir dessa escala é determinado o HU para o tecido.

A distribuição de HU em animais é desafiadora para a quantificação por necessitar da administração de contrastes, já que os tecidos moles não possuem

radiodensidade que promova a distinção na escala de cinza da imagem, impedindo a delimitação de dimensões dos órgãos. Duas estruturas apresentam forte contraste natural no corpo do animal, um deles é o pulmão, que possui baixa atenuação do raio x pelo ar armazenado (**Figura 5**), outro é o tecido ósseo, com radiodensidade alta devido à alta concentração de cálcio na sua estrutura mineral (**Figura 6**), a quantificação desses dois órgãos dispensa o uso de contrastes.

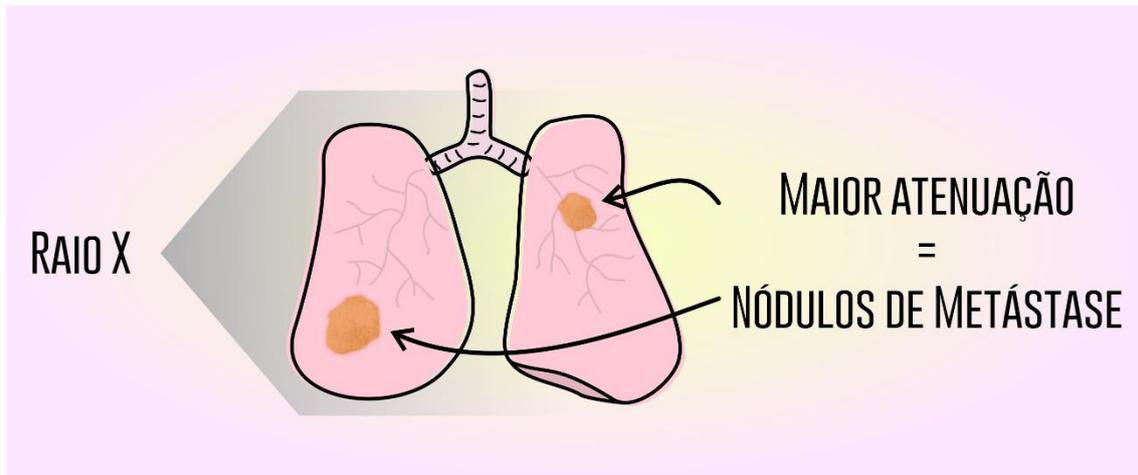


Figura 5 - A presença de doenças pulmonares aumenta a atenuação do raio x na região pulmonar.

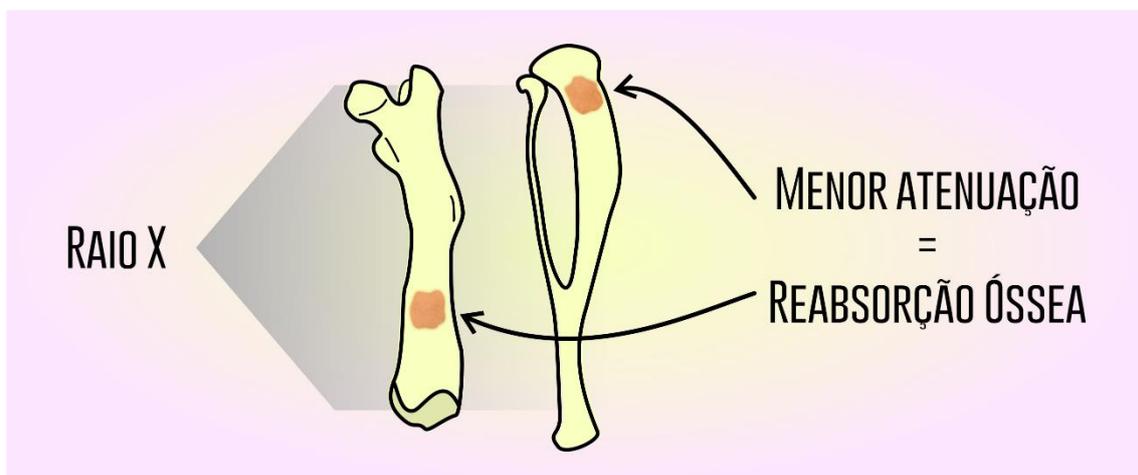


Figura 6 – A atenuação do raio x pelo tecido ósseo é reduzida em regiões de reabsorção óssea.

Justificativa

Observando o problema provocado pelo câncer de mama na população mundial e nos pacientes, é de grande importância o desenvolvimento de pesquisas a fim de elucidar a biologia básica da doença e também a criação de

tecnologias para aumentar a eficiência no tratamento, aumentando a qualidade de vida, o tempo de sobrevivência e reduzindo a reincidência e progressão dos tumores primários e principalmente das metástases.

A principal estratégia para o combate de câncer de mama na clínica é a combinação de diferentes quimioterápicos, com tratamentos adjuvantes com prednisona, dexametasona e outros corticosteroides a fim de minimizar os efeitos da inflamação gerada pela terapia. Além da intervenção medicamentosa, é realizada a cirurgia e sessões de radioterapia. De forma geral, o tratamento disponível na clínica para o câncer de mama desencadeia processos inflamatórios responsáveis por promover a perda óssea e impactar negativamente no quadro de saúde do paciente.

A busca por um tratamento eficaz contra as células cancerosas e com danos reduzidos no processo inflamatório é essencial para o sucesso no combate ao câncer de mama. A nanobiotecnologia proporciona modulação da terapia a fim de prevenir efeitos adversos e reduzir os danos em órgãos sem tumor.

Com o objetivo de agregar as vantagens da utilização de nanopartícula lipídica sólida com os efeitos terapêuticos da doxorubicina, é formulada a NLSDox. A formulação contém lipídeos biocompatíveis, biodegradáveis, capacidade de encapsulação do fármaco em concentração ideal para a experimentação *in vivo* e apresenta estabilidade.

O desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas contendo doxorubicina visa proporcionar um tratamento com maior entrega do fármaco na região tumoral, reduzindo efeitos em órgãos livres de tumor, como por exemplo o tecido ósseo, prevenindo o estresse oxidativo que leva à perda óssea, essa que é pró-tumoral e principal causa na redução da qualidade de vida e morte nos pacientes.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a prevenção da perda óssea provocada pela quimioterapia em camundongos tratados com nanopartícula lipídica sólida contendo doxorrubicina.

Objetivos Específicos

- I. Obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas contendo doxorrubicina;
- II. Investigar o perfil de biodistribuição da nanopartícula lipídica sólida contendo doxorrubicina em modelo murino de câncer de mama;
- III. Investigar a prevenção da perda óssea em animais tratados com nanopartícula lipídica sólida contendo doxorrubicina;
- IV. Avaliar a prevenção da perda óssea em animais com câncer de mamas após o tratamento com nanopartícula lipídica sólida contendo doxorrubicina.

Metodologia

Delineamento experimental

O desenho experimental para testar as hipóteses do projeto conta com ensaios *in vitro* e *in vivo* para a avaliação da prevenção da perda óssea promovida pelo tratamento de câncer de mama com doxorrubicina nanoestruturada. Na **Figura 7**, está ilustrada a interação do câncer de mama com suas principais metástases, pulmonar e óssea, onde o tratamento convencional promove a perda óssea através do desbalanço entre remodelação e reabsorção óssea, já o tratamento com a NLSDox, os efeitos adversos da doxorrubicina seriam minimizados, reduzindo então a perda óssea causada pela quimioterapia.

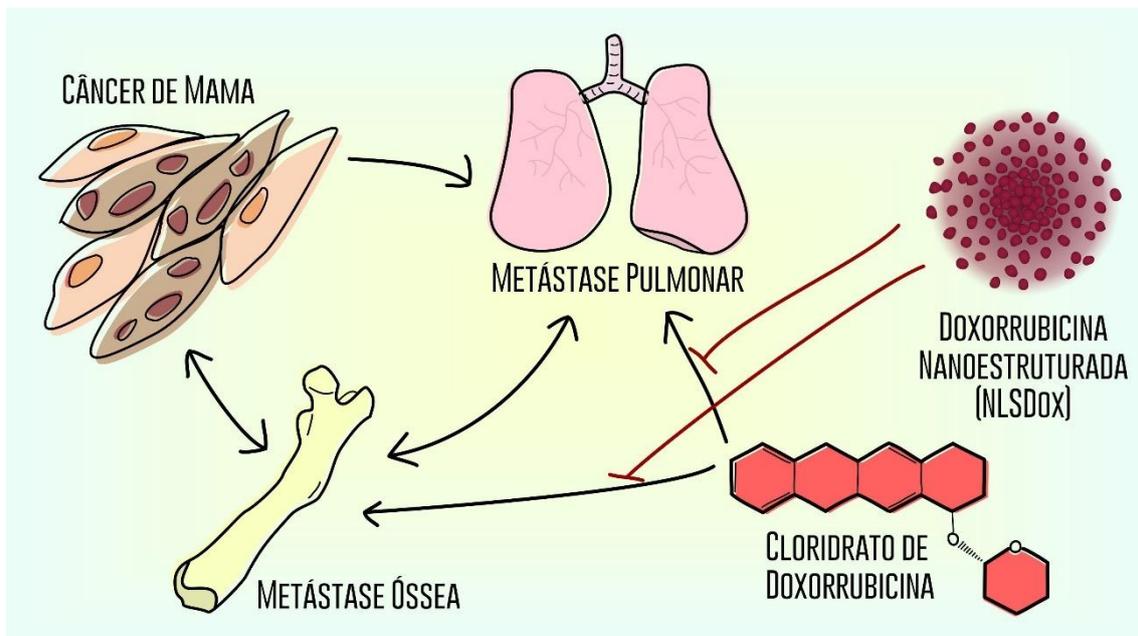


Figura 7 - Esquemática da hipótese do projeto, onde o câncer de mama promove as metástases pulmonar e óssea, que ao serem tratadas com doxorubicina apresentam perda óssea agravada, esse efeito adverso é prevenido com o tratamento com NLSDox.

Preparo da Doxorubicina Base Livre

Com o objetivo de tornar o fármaco solúvel na fase oleosa da nanopartícula lipídica sólida, foi realizada a transformação do Cloridrato de Doxorubicina⁵⁶ para a Doxorubicina na forma de base livre⁸⁴ (**Figura 8**).

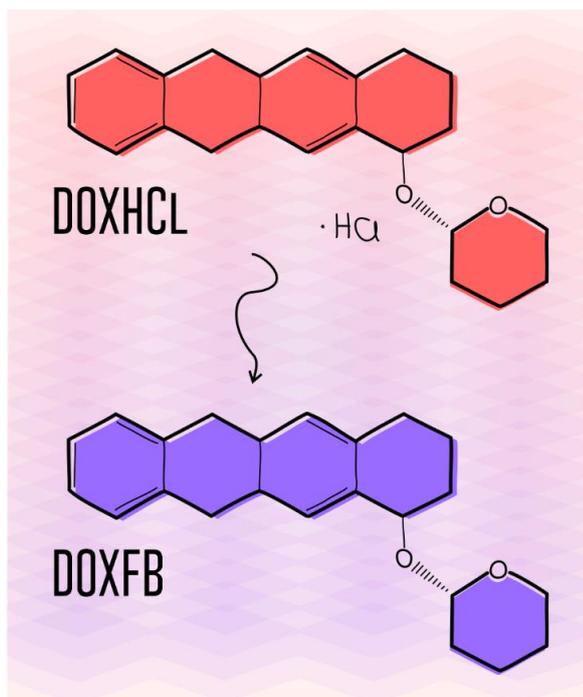


Figura 8 - Ilustração da transformação entre DoxHCl para DoxFB e sua alteração de cor.

A partir do protocolo adaptado de Tahir *et al* 2019 ⁸⁵, foi adicionado o hidróxido de sódio em concentração na forma estequiométrica equivalente à quantidade da porção cloridrato do fármaco diluído em etanol. O hidróxido de sódio retira o cloridrato presente na doxorubicina, a convertendo em uma base livre hidrofóbica. Com a transformação de cloridrato para base livre, o fármaco vai de vermelho à púrpura e sua incorporação na nanopartícula lipídica sólida é facilitada.

Após a conversão, a concentração utilizada da Doxorubicina Base Livre é corrigida pela proporção estequiométrica entre a quantidade de moléculas de Doxorubicina em relação aos sais presentes na solução.

Formulação da Nanopartícula Lipídica Sólida contendo Doxorubicina Base Livre

O método de formulação da NLS foi executado como o descrito por da Rocha *et al* 2020 ³¹, a nanoestrutura é formada a partir de agitação de alta energia e alta temperatura. A fase oleosa, descrita na **Tabela 2**, é composta pelos tensoativos, o lipídeo sólido e o fármaco. A mistura é mantida na temperatura de 80°C sob agitação magnética para solubilização de todos os componentes e provocar a transformação física do lipídeo sólido para o estado líquido, em seguida é adicionado a fase aquosa, composta pelo tampão, também a 80°C, a fim de evitar choque térmico, formando uma pré-emulsão agitada magneticamente até a obtenção de uma solução uniforme.

A pré-emulsão é submetida à agitação de alta energia com o UltraTurrax T25 (IKA) por 10 min à 10.000 rpm sobre uma chapa aquecida, a temperatura é monitorada com auxílio de um termômetro e mantida entre 80°C e 85°C durante todo o processo, garantindo a temperatura de fusão do lipídeo sólido e a formação de nanoestruturas.

Após a agitação de alta energia, a formulação é resfriada naturalmente, evitando mudanças bruscas de temperatura, durante o resfriamento ocorre a solidificação e a cristalização do lipídeo, levando à formação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo doxorubicina.

Para obtenção de uma formulação livre de fármaco, o processo é repetido sem a adição da Doxorubicina Base Livre, dando origem à NLSBranca. A NLSBranca é utilizada como controle em alguns experimentos, a fim de avaliar a influência do veículo nanoestruturado independente do fármaco.

Tabela 2 - Relação da Composição e concentração das formulações NLSDox e NLSBranca.

	Componente	NLSDox	NLSBranca
Fase Oleosa	Compritol ATO 880	500 mg	500 mg
	Pluronic 127	450 mg	450 mg
	Span 80	50 mg	50 mg
	Doxorrubicina Base Livre	8 mg	-
Fase Aquosa	PBS pH 7,2	20 mL	20 mL

Caracterização NLSDox

Espalhamento Dinâmico da Luz

Para obtenção dos valores de diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV) foi utilizado o aparelho ZetaSizer SZ90 (Malvern). Foram realizadas leituras em triplicatas com os parâmetros de diluição 1:20 v/v de amostra em água destilada, à 25°C com 30s de estabilização, leituras com espalhamento de 90° para o diâmetro hidrodinâmico e PDI. Para a avaliação do potencial zeta, o pH da diluição foi aferido com pHmetro de bancada.

As leituras foram realizadas nos períodos de 0, 1, 7, 15 e 30 dias após a formulação com diferentes armazenamentos em temperaturas de 4, 25 e 37°C a fim de avaliar a influência do tempo e temperatura na estabilidade da NLSDox e sua equivalência com a amostra descrita por da Rocha *et al* 2020³¹.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para avaliar a morfologia e mensuração da frequência de distribuição do tamanho das partículas, a NLSDox foi borrifada em uma tela de cobre coberta com filme de formvar, após secagem ao ambiente a tela contendo a amostra desidratada é exposta em atmosfera de ósmio por 3 min para contrastação do

material lipídico. A micrografia foi obtida com o MET (JEM 1011 JEOL, Japão) com aumento de 10 mil vezes e 80kV de energia.

As partículas observadas nas micrografias foram mensuradas com auxílio do software ImageJ utilizando a barra de escala para a determinação da relação de pixels por nanômetros. A frequência de distribuição do tamanho observado é utilizada para corroborar com os dados obtidos nas análises de espalhamento dinâmico de Luz.

Quantificação da Doxorrubicina

Espectroscopia de Fluorescência

A quantificação do fármaco foi realizada utilizando uma leitora de placas por espectrofluorimetria no aparelho SpectraMax M5 (Molecular Devices, EUA), onde a leitura foi realizada com excitação em 480nm e emissão em 550nm com o fotomultiplicador (PMT) no modo *medium*.

Análise do perfil de emissão e absorção

Diluições em meios hidrofóbicos e hidrofílicos e diferentes solventes foram realizadas a fim de avaliar alterações no espectro de emissão e absorção da doxorrubicina quando está na forma de base livre, de cloridrato ou encapsulada na NLSDox. Os meios utilizados foram água destilada, óleo de rícino, etanol PA, NaOH 0,01M, HCl 0,01M, e meios tamponados de PBS nos pHs de 3.8, 7.2 e 8.0. Para essa análise, foram realizadas leituras com excitação fixa em 480nm e espectro de emissão de 500 a 700nm ou emissão fixa de 550nm com excitações entre 400 e 500nm.

Curva Padrão

A curva padrão de concentração pela intensidade obtida foi realizada com a diluição do cloridrato de doxorrubicina (DoxHCl) na solução extratora de diálise, composta de Metanol e PBS 1:1 (v/v). Para a doxorrubicina de base livre (DoxFB) o meio de diluição foi PBS + Tween 80 1%. Diluições entre 0,05 µg/mL a 5 µg/mL foram analisadas por espectrofluorimetria (SpectraMax M5) com absorção em 480nm e emissão em 550nm. A equação de reta foi obtida, respeitando o R² mínimo de 0,98, e utilizada como referência para o ensaio de liberação por diálise.

Eficiência de Encapsulação (%EE)

A fim de obter a taxa de encapsulação da doxorubicina na nanopartícula, foi realizado um ensaio onde 1mL de nanopartícula foi centrifugado a 14000 rpm por 30 min, após centrifugação, o sobrenadante foi diluído em Metanol e Tetrahydrofurano 1:1 (v/v) e submetido ao banho de ultrassom por 3 min, em seguida a amostra foi diluída em etanol PA 1:1000 (v/v) e novamente submetida à centrifugação para a análise do sobrenadante em espectrofluorimetria.

Esse ensaio visa separar a porção do fármaco que se encontra fora das nanoestruturas e quantificar o recuperado do seu interior, relacionando ao máximo teórico, sendo a quantidade de doxorubicina adicionada à nanoestrutura durante a formulação. A avaliação da %EE foi dada pelo resultado da seguinte equação:

$$\%EE = \frac{[Doxorrubicina\ na\ nanopartícula]}{[Máximo\ teórico\ de\ Doxorubicina]} \cdot 100$$

Ensaio de Liberação da doxorubicina

Para o ensaio de liberação da doxorubicina encapsulada, 1mL da amostra foi condicionado em membrana de diálise, depositada em meio de extração contendo PBS com 1% de Tween 80 e mantida em agitação magnética por 24 h. Ao longo do tempo foi coletado 1mL do meio externo ao saco de diálise e armazenado para quantificação por espectrofluorimetria. A mesma quantidade de meio externo coletado foi substituída por meio fresco, sem fármaco a fim de manter a concentração e evitar a estabilidade entre face externa e interna do saco de diálise. O mesmo protocolo foi realizado para avaliar a liberação do fármaco livre, no caso do cloridrato de doxorubicina, o meio de extração foi PBS e Metanol 1:1 (v/v) por estar na forma hidrofílica.

Avaliação da prevenção da perda óssea *in vivo*

Delineamento experimental

Para avaliar se a perda óssea ocorre por ação da quimioterapia ou do câncer de mama, foi realizado um delineamento experimental onde animais com ou sem tumor foram tratados com SLNDox e seus tecidos ósseos foram avaliados por microscopia eletrônica e tomografia (**Figura 9**).

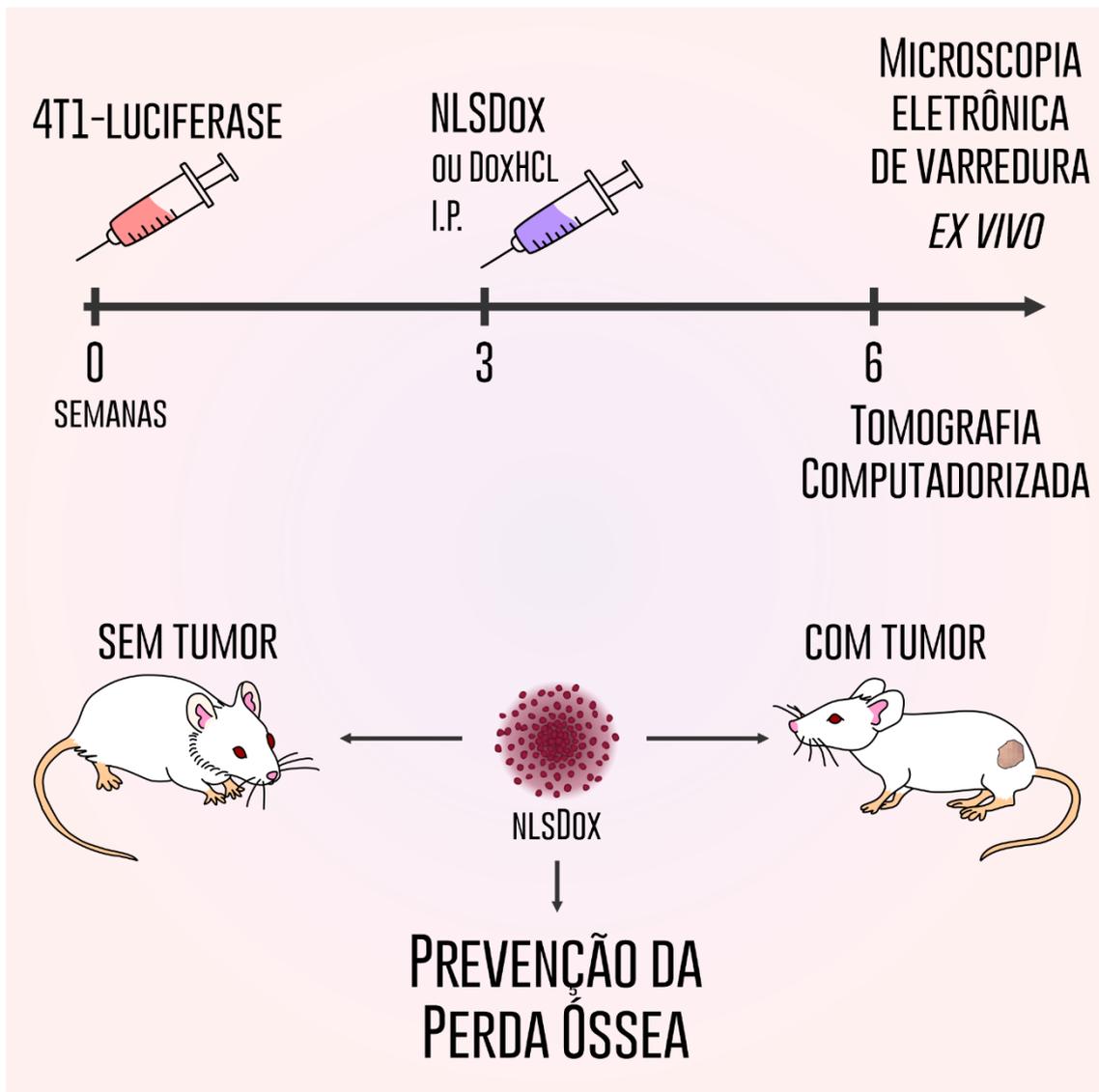


Figura 9 – Delineamento experimental da avaliação da prevenção da perda óssea em animais com ou sem tumor após tratamento com SLNDox.

Comitê de Ética no Uso Animal

O delineamento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, com documento de número 2019/30 e SEI 23106.036144/2019-30 com validade até 20/12/2023. O documento está no **Anexo 1**.

Obtenção dos animais

Camundongos fêmea Balb/C foram comprados do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Goiás.

Manutenção de animais

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Foram mantidos em caixas forradas com maravalha, com água e ração *ad libitum* em um ambiente com temperatura controlada à 25°C e períodos claro/escuro com 12h de intervalo.

Enxerto tumoral

A fim de estabelecer um tumor heterotópico de câncer de mama em camundongos, foram utilizadas células 4T1-Luciferase, células de adenocarcinoma murino 4T1 transformadas com expressão de luciferase para fins de diagnóstico^{35; 75; 86}.

O modelo escolhido é amplamente utilizado para avaliação de biodistribuição, eficácia de fármacos e estudo da biologia básica tumoral, publicações de grupos de pesquisa da Universidade de Brasília constam com a utilização desta técnica^{31; 33; 34; 87}.

As células 4T1-luciferase foram cultivadas em meio DMEM em estufa a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%, as células foram contadas utilizando uma câmara de contagem e separadas em alíquotas com PBS. O enxerto das células cancerosas é realizado no flanco esquerdo do animal previamente anestesiado com a inoculação de 4x10⁵ células.

Após o enxerto, o modelo tumoral é estabelecido com 14 dias, após 21 dias o tumor é palpável e se encontra com proporção ideal para o tratamento anterior ao estabelecimento das metástases, estas foram detectáveis a partir da quarta semana após o enxerto.

Avaliação de aspectos clínicos

A fim de controlar e prevenir fontes de estresse e garantir o bem estar animal, os camundongos foram avaliados diariamente com a higienização das caixas de armazenamento, reabastecimentos com ração e água potável, também é avaliado o comportamento e a aparência do animal.

Peso corporal

Um parâmetro quantitativo utilizado para a avaliação do bem estar animal e resposta aos experimentos realizados é a mensuração do peso, onde é avaliada a variação de peso dos animais durante a experimentação *in vivo*.

Anestesia

Durante diferentes etapas da experimentação é necessária a utilização de anestesia, a qual é utilizada a combinação de xilazina e cetamina para a administração intraperitoneal e, no caso da anestesia inalatória, é utilizado a difusão de isoflurano em câmara específica para anestesia volátil. A dosagem dos anestésicos é proporcional ao peso dos animais mensurado no dia da administração.

Eutanásia

Para a eutanásia ao fim da experimentação é utilizada a superdosagem da anestesia injetável por via intraperitoneal, contendo a concentração quatro vezes maior do que a utilizada na experimentação.

Ponto final humanitário

O ponto final humanitário é um parâmetro importante na experimentação animal, a fim de garantir a ética e os direitos dos animais utilizados na experimentação, para os camundongos com tumor, o limite de volume tumoral foi definido em 200mm³ e para os animais com e sem tumor, a redução de peso de 20% em relação à média do peso dos animais saudáveis com a mesma idade foi determinada como o limite para a realização do ponto final humanitário.

Destino e descarte do material biológico

O material biológico obtido ao final da experimentação, incluindo carcaças dos animais foi armazenado em freezer para a seguir destinação da incineração no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Avaliação da progressão tumoral

A fim de avaliar a progressão tumoral para controle experimental do modelo animal, foram realizadas quantificações do volume tumoral e da emissão de luminescência por parte das células transfectadas com o *gene reporter* da proteína luciferase.

Volume tumoral

O volume tumoral foi mensurado com a utilização de paquímetro, onde são medidas as dimensões de altura e largura do tumor palpável no flanco esquerdo do animal enxertado. A altura foi determinada no eixo longitudinal e a largura no eixo transversal. Os valores de altura e largura são aplicados na fórmula abaixo para obtenção do volume tumoral em milímetros cúbicos

$$\text{Volume tumoral (cm}^3\text{)} = \text{maior medida}^2 \times \text{menor medida}$$

Quantificação da emissão de luminescência

A fim de avaliar a progressão tumoral, foi quantificada a emissão de bioluminescência pelas células cancerosas utilizando a atividade enzimática da luciferase. As células enxertadas nos camundongos foram transformadas com o gene da luciferase, tornando assim o tumor capaz de emitir bioluminescência quando exposto a luciferina administrada no animal, a luciferase converte a luciferina em oxiluciferina e emite fótons quantificáveis com o aparelho IVIS Lumina XR Series III (Perkin Elmer, EUA).

A quantificação da bioluminescência foi realizada com os animais anestesiados em um sistema inalatório, onde são posicionados no interior do aparelho e 10 leituras de 1 minuto de exposição foram mensuradas a fim de quantificar diferentes momentos da atividade enzimática. Os parâmetros técnicos da aquisição das imagens estão listados na **Tabela 3**.

.Após obtenção das imagens, é realizada a quantificação dos fótons emitidos com a utilização de regiões de interesse (ROI) na imagem, em seguida é selecionado o ponto onde há maior emissão de radiância média. A avaliação foi realizada semanalmente e um perfil de progressão tumoral foi traçado para a região do tumor primário (flanco esquerdo) e metástase pulmonar no tórax.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para a avaliação da bioluminescência emitida pelas células cancerosas após administração de luciferina nos camundongos.

Anestesia	Isoflurano
Luciferina	100µL
Binning	8
F/Stop	2
Tempo de exposição	1 min
Quantidade de leituras	15
Filtro de emissão	Aberto
Filtro de excitação	Fechado
Campo de visão	C
Altura da bandeja	1,5cm

Avaliação dos Parâmetros Hematológicos

Com o fim do experimento, os animais foram eutanasiados, a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca com seringa tratada com EDTA para evitar coagulação do material, em seguida o sangue foi transferido para tubo com EDTA para ser analisado em hematímetro automatizado para uso veterinário Poch-100iV Diff (Sysmex, Japão). A análise foi realizada logo após a coleta do sangue de acordo com o uso padrão do aparelho com parâmetros específicos para camundongos.

Avaliação da Biodistribuição da NLSDox *in vivo*

A fim de avaliar a biodistribuição da doxorubicina nanoestruturada, esquematizada na **Figura 10**, foi estabelecido o modelo tumoral de adenocarcinoma mamário murino em camundongos Balb/C divididos em quatro grupos descritos na **Tabela 4**.

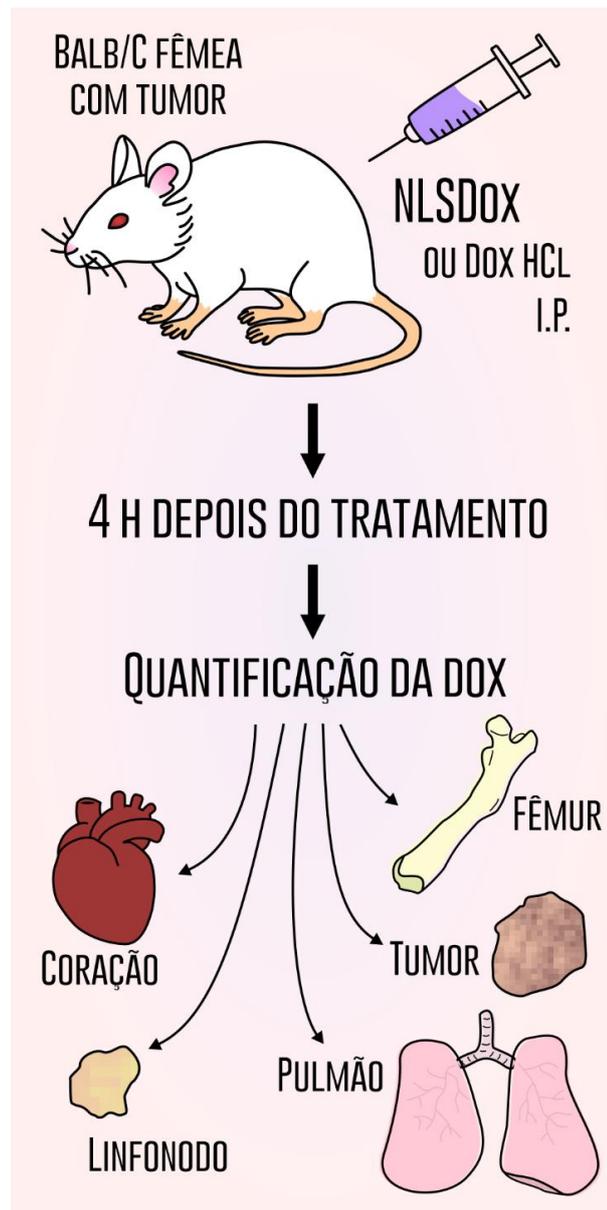


Figura 10 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental realizado para a avaliação da biodistribuição de doxorrubicina em animais com tumor tratados com NLSDox.

Tabela 4 - Distribuição do número de animais por grupo experimental para a avaliação da biodistribuição de doxorrubicina.

Grupo	Número de animais
Cloridrato de Doxorrubicina	5
NLSDox	5
PBS (controle sem tratamento)	5
Sadio	5
Total	20

Tratamento

Com três semanas após o enxerto, a fim de obter uma dosagem quantificável de fármaco nos tecidos a serem coletados, foi administrado 5mg/kg por via intraperitoneal nos animais dos grupos Cloridrato de Doxorubicina e NLSDox. A diluição das amostras foi realizada em PBS a fim de evitar a administração de água destilada nos animais, com concentrações equivalentes de fármaco, no caso os animais tratados somente com o PBS, foi administrado 100µL em cada.

Eutanásia e coleta dos órgãos

Para a coleta de órgãos foi realizada a eutanásia dos animais após 4 horas do tratamento, os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico, seguido da punção cardíaca para a coleta do sangue, com remoção cirúrgica foram coletados o coração, baço, rins, fígado, pulmão, osso, linfonodos e o tumor, caso houvesse.

Os tecidos coletados foram pesados, acondicionados em tubos, identificados e submetidos a congelamento rápido em nitrogênio líquido, em seguida foram armazenados em ultrafreezer na temperatura de -80°C.

Preparo das amostras

Com auxílio de bisturi e tesoura, os tecidos foram cortados após o descongelamento e homogeneizados com um triturador de tecidos TissueLyser LT (Qiagen, Alemanha) em meio de extração contendo 90% de isopropanol e 10% HCl 75mM, em seguida as amostras foram incubadas em geladeira por 24h, no caso dos ossos, o período de incubação foi de 48h.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10min na temperatura de 4°C, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro de seringa de 0,20 µm. A amostra então foi depositada em placa de 96 poços com paredes pretas e fundo transparente para a quantificação da fluorescência em espectrofluorimetria utilizando o Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Quantificação

A quantificação da doxorrubicina extraída dos tecidos foi realizada por mensuração da fluorescência por espectrofluorimetria, os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão foram 480nm e 550nm respectivamente.

Curva padrão

Para determinação da concentração de doxorrubicina correspondente à emissão de fluorescência quantificada, foi realizado ensaio de curva padrão, onde amostras com concentrações conhecidas foram quantificadas em meio de isopropanol ácido. Os valores obtidos foram plotados e a curva calculada com valor de R^2 superior a 0,98.

A fim de evitar influência de autofluorescência da amostra, comum em tecidos pigmentados, foi realizada a curva padrão com concentrações conhecidas de doxorrubicina diluídas em meios obtidos com a coleta dos tecidos dos animais sem tratamento, sendo então realizada uma curva padrão específica para cada tecido a ser analisado.

Avaliação da Prevenção de Perda Óssea em Modelos Animais

Na **Figura 11**, está representada a síntese do delineamento experimental da avaliação da prevenção de perda óssea em modelo murino, onde camundongos Balb/C fêmea com tumor foram tratados com NLSDox e avaliados ao longo do tempo, para a análise da progressão tumoral por luminescência e a densidade óssea por tomografia computadorizada.

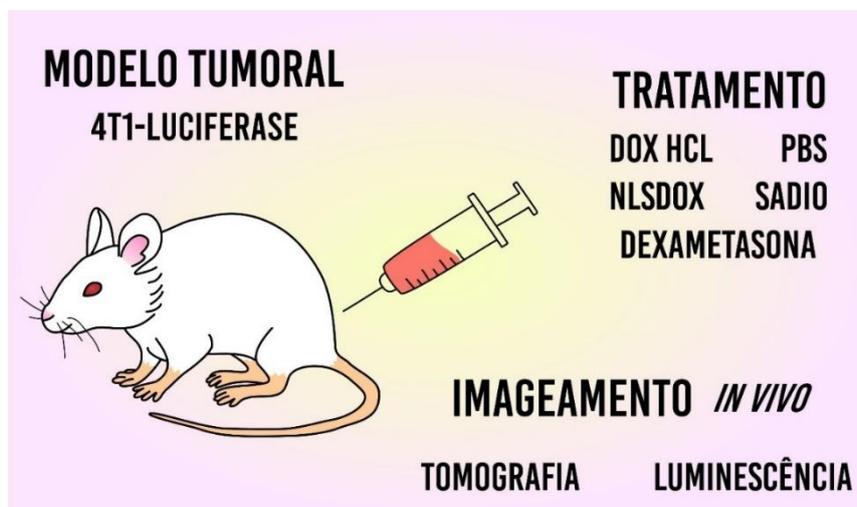


Figura 11 - Representação gráfica do planejamento experimental *in vivo* da avaliação da perda óssea.

A distribuição dos grupos experimentais e seu respectivo número de animais está representada na **Tabela 5**, onde os animais foram divididos entre grupos com tumor e grupos sem tumor entre os diferentes tratamentos. Cloridrato de Doxorrubicina é utilizado como controle do fármaco comercial utilizado na clínica, NLSDox é o tratamento proposto pelo atual trabalho, Dexametasona se refere ao grupo com tratamento prévio de dexametasona a fim de induzir um modelo controle positivo para perda óssea medicamentosa e os animais administrados com PBS são um grupo controle com tumor e sem fármaco ativo.

Tabela 5 - Listagem de grupos experimentais e número de animais para a avaliação da prevenção da perda óssea.

	Grupo	Número de animais
Com tumor	Cloridrato de Doxorrubicina	5
	NLSDox	5
	Dexametasona	5
	PBS	5
Sem tumor	Cloridrato de Doxorrubicina	5
	NLSDox	5
	Dexametasona	5
	Sadio	5
	Total	40

Tratamento

Com três semanas após o enxerto, o tratamento foi administrado diariamente por 4 dias a fim de obter a dose final de 20mg/kg de cloridrato de doxorrubicina ou NLSDox via intraperitoneal. No caso de tratamento sem doxorrubicina, foi administrado com PBS como controle de animal com tumor sem tratamento.

Para os grupos com tratamento de Dexametasona, foram administradas doses de 5mg/kg durante quatro semanas, iniciado previamente a fim de que a última dose fosse administrada na terceira semana após o enxerto das células cancerosas.

Tomografia Computadorizada

Em anestesia, o animal foi posicionado no tomógrafo Albira Si (Bruker, EUA) e as imagens foram adquiridas em diferentes projeções cobrindo os 360°, em seguida as projeções foram reconstruídas utilizando o software Albira Reconstructor para a obtenção de uma projeção 3D contemplando todo o corpo do camundongo.

A projeção 3D foi quantificada com uso do software Pmod e a distribuição de voxels por HU foi plotada para 3 e 6 semanas após o enxerto tumoral, indicando os momentos com um tumor primário e com presença de metástases para o pulmão e tecido ósseo.

Aquisição

Para a aquisição as projeções por tomografia computadorizada, os animais anestesiados foram posicionados em uma cama acrílica específica para a análise de camundongos, os parâmetros técnicos da aquisição estão descritos na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Parâmetros técnicos utilizados para aquisição de imagens tridimensionais por tomografia computadorizada em camundongos sem administração de contraste.

Aquisição	Tomografia Computadorizada
Modo	Bed – Step & Shoot
Bed lenght	126,88mm
Qualidade	Good - 400 projeções
Voxel	200µm
Intensidade	400µA – High dose
Voltagem	35kV – low voltage
Tempo	~20min

A resolução da imagem adquirida é dependente da quantidade de projeções selecionada, quanto maior o número de projeções, maior o tempo de aquisição, o número de 400 projeções foi selecionado por ter um tempo final de cerca de 20 min, que corresponde ao tempo de anestesia com a administração de xilazina e cetamina. Além disso, maiores resolução requerem maior capacidade de processamento por computadores, agregando um acréscimo no

tempo de análise das imagens adquiridas, inviabilizando o experimento. Com 400 projeções, o tamanho do *voxel* é de 200 μ m.

Reconstrução

Com a aquisição das 400 projeções em 360°, as imagens são reconstruídas a fim de projetar, com o uso de algoritmos, uma imagem 3D do corpo inteiro do animal. A reconstrução foi realizada com o algoritmo Filtered BackProjection (FBP) no modo médio com auxílio do software Albira Reconstructor da Bruker. A etapa de reconstrução é fundamental por resolver parâmetros relativos ao momento da aquisição, como alterações na produção do raio x específicas da condição do abastecimento de energia para o aparelho no momento da análise, convertendo os valores obtidos no receptor em uma escala de HU padronizada que pode ser interpretada por diferentes softwares e aparelhos.

Quantificação

A quantificação é realizada em diversas etapas com a utilização de softwares especializados. Inicialmente a imagem é carregada no software Pmod e é aplicado um filtro gaussiano 3D para remoção de ruídos e distorções na imagem, com FWHM de 0,2 mm em X, 0,2 mm em Y e 0,2 mm em Z.

A presença de ruídos na imagem é reduzida com a utilização de baixa voltagem no momento da aquisição, uma vez que não há necessidade de voltagens altas para avaliar a atenuação do raio x em amostras biológicas, devido aos baixos valores de HU.

Mensuração da região pulmonar

O tecido pulmonar possui densidade de HU equivalente aos outros tecidos moles e sua identificação e delimitação é aplicada pela presença de ar no interior do órgão e com a estrutura óssea da caixa torácica, o que pode ser observado na **Figura 12**.

Para delimitar o pulmão e criar um volume de interesse (VOI) e separar a região do resto da imagem, é utilizada a Cold Contour, um tipo de Auto Iso-Contour, uma ferramenta que contorna estruturas por similaridade com um ponto de referência determinado pelo operador, no caso do pulmão, é selecionado um ponto com menor atenuação, com ar pulmonar e a partir dele, o algoritmo

delimita o corte com exclusão de regiões com valores de HU acima e agrega regiões com HU baixos. Na **Figura 12** é possível observar um contorno em azul para a região do pulmão, excluindo as ramificações de alta densidade onde se encontram os brônquios.

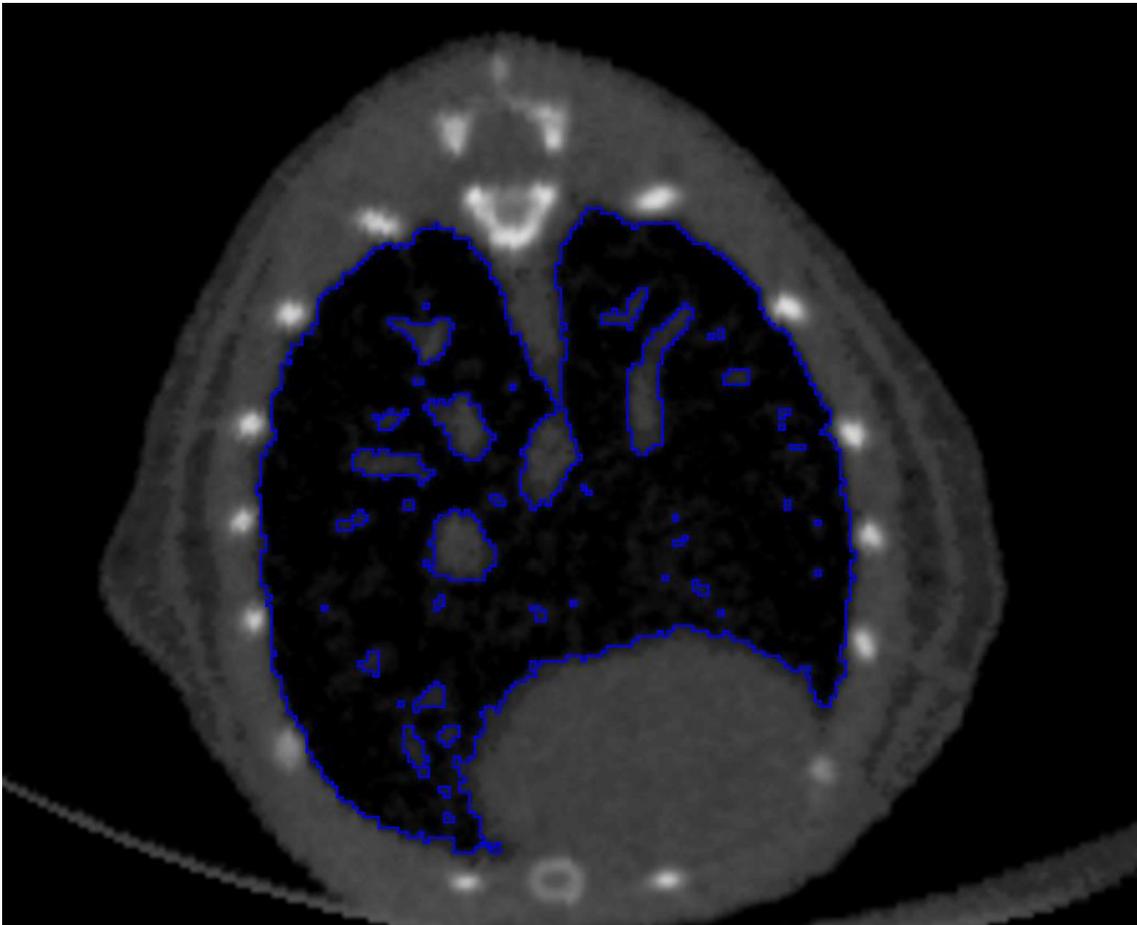


Figura 12 - Corte transversal na região da caixa torácica, tendo em destaque a delimitação do volume de interesse do pulmão na projeção 3D obtida por tomografia computadorizada.

Mensuração do tecido ósseo

Para o tecido ósseo, o algoritmo selecionado é o de Hot Contour, com funcionamento semelhante ao de Cold Countour, com a diferença que o contorno delimitado ao redor do esqueleto é determinado pelos voxels com HU de alto valor, com maior atenuação do raio x devido a presença do cálcio no tecido.

Na **Figura 13** estão representados diferentes contornos em um corte longitudinal que correspondem a região de alta densidade, cada contorno delimita uma região de interesse (ROI), o conjunto e ROIs de um corte é

chamado de Contorno (CTR) e a união de todos os contornos das projeções de uma imagem formam o volume de interesse (VOI).

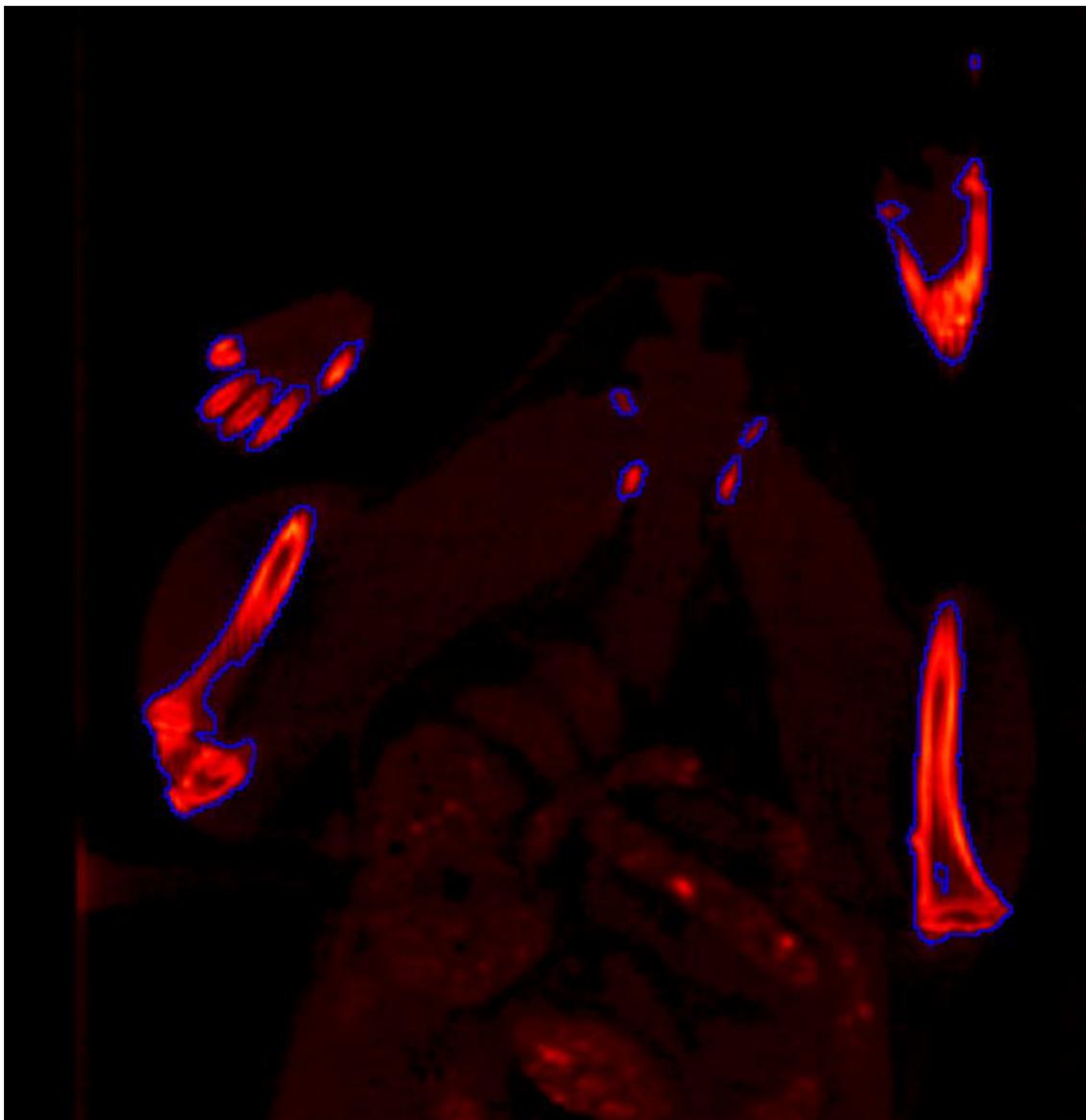


Figura 13 – Corte longitudinal da imagem por tomografia computadorizada do camundongo com contornos em azul delimitando regiões do esqueleto do animal.

As diferentes escalas de cor aplicadas nas **Figuras 12** e **13** são escolhidas com o objetivo de melhorar a visualização por parte de quem está operando o computador, a escolha da cor não interfere na quantificação, e essa pode ser modificada para fins estéticos.

Com os limites delimitados e os VOIs criados para o pulmão e ossos, a obtenção de curvas de número de *voxels* por intensidade de HU proporcionam visualização do perfil de cada VOI, onde no pulmão pode ser observado o

deslocamento positivo no eixo X, indicando maior densidade em regiões que antes continham ar, podendo ser atribuídas ao muco, fibrose pulmonar, inflamações e tumores. Para o osso, o deslocamento negativo no eixo X corresponde a redução de regiões com alta concentração de cálcio, indicando a presença de tecido mole, reabsorção óssea ou tumores.

Os VOIs podem ser segmentados com o objetivo de excluir os *voxels* fora do limiar de intensidade específico para cada tecido, onde no pulmão é de -1000 a -100, valor mínimo correspondente ao ar e o máximo inferior ao HU da água (= 0). O limiar de intensidade do osso é de valores mínimos acima da densidade de tecidos moles (+350) e o máximo com valores chegando a 5000 positivos. Com a segmentação, é possível obter valores de volume, menor e maior HU obtido na amostra

Microscopia Eletrônica de Varredura

Os ossos coletados após a eutanásia tiveram o tecido mole removido com auxílio de ferramentas cirúrgicas, como tesouras e pinças, em seguida foram fixados em karnovsky (formaldeído 2,5% e gluteraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2). As amostras foram lavadas e armazenadas em tampão cacodilato de sódio.

O preparo para a microscopia eletrônica de varredura foi realizado com as amostras lavada em tampão cacodilato de sódio, incubadas por 2 horas em tripsina-EDTA, novamente lavadas com tampão e fixadas com tetróxido de ósmio por 1 hora. Após, as amostras foram lavadas novamente e desidratadas em incubações de 30min em acetona com as concentrações sequenciais de 30, 50, 70, 90 e 100% (duas vezes). Com os ossos fixados e desidratados, a remoção da água residual foi realizada com uso de um aparelho de secagem ao ponto crítico CPD 030 (Balzers, Liechtenstein).

A montagem da amostra utilizou stubs de latão e cola de prata, para garantir a aderência do material ao suporte. As amostras foram metalizadas no metalizador EM SCD 500 (Leica, EUA) com objetivo de criar uma camada condutora de elétrons e então inseridas no microscópio eletrônico de varredura. A obtenção de imagens foi realizada com o microscópio O MEV (JSM-7001F JEOL, Japão) em magnificações de até 950 vezes com energia de 15kV.

Análise de dados e estatística

A análise de dados para todos os resultados apresentados foi processada com a utilização do software GraphPad Prism 8 (Graphpad, EUA) e para a criação, desenho e arranjo das imagens e pranchas, os softwares Corel PHOTO-PAINT 2019 e Corel DRAW 2019 (Corel, Canadá). Todas as imagens apresentadas são originais e criadas para a atual tese.

A estatística foi realizada com a exclusão de *outliers* com o teste de Grubbs, em seguida os dados foram testados para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. Os dados que passaram no teste de normalidade foram aplicados ANOVA com pós teste de Tukey ou teste t, já os dados que não passaram no teste de normalidade foram avaliados com o teste t não paramétrico Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

Após análise estatística, os gráficos com normalidade foram plotados em colunas e os avaliados com testes não paramétricos foram plotados em *box plot*, com exceção de análises com variação ao longo do tempo e em outras escalas, estas foram plotadas em gráficos de linha, independente do resultado do teste de normalidade.

Resultados e Discussão

Formulação de nanopartícula lipídica sólida contendo doxorubicina (NLSDox)

Após a formulação, foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão a fim de avaliar a morfologia da NLSDox, a qual foi esquematizada no item (A) da **Figura 14**, no item (B) da mesma figura está, em recorte com a barra em escala, a micrografia isolada de uma nanoestrutura. É possível observar que as nanopartículas foram formuladas e apresentam formato esférico (**Figuras 14 e 15**).

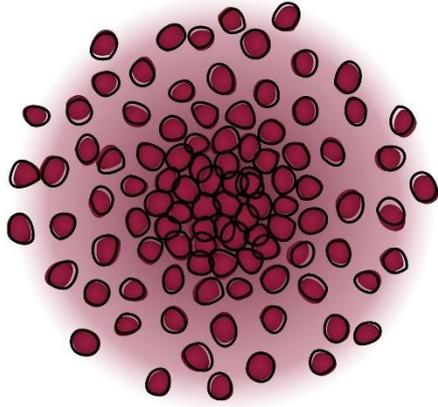
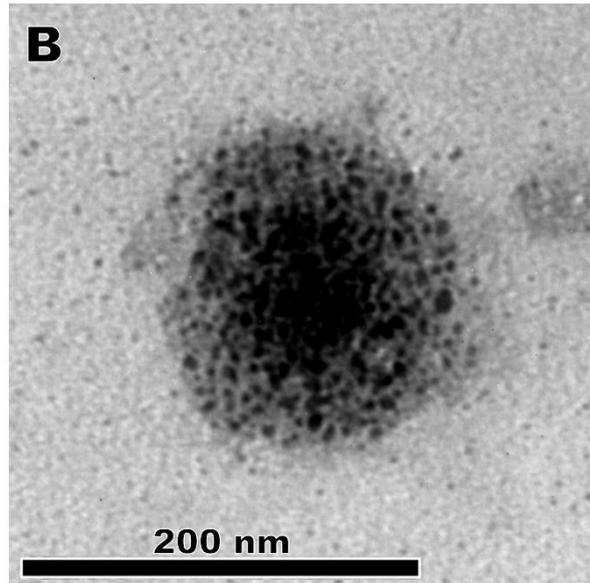
A**B**

Figura 14 - Morfologia da NLSDox. **A)** Desenho esquematizando a doxorubicina encapsulada no lipídeo cristalizado. **B)** Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão da NLSDox.

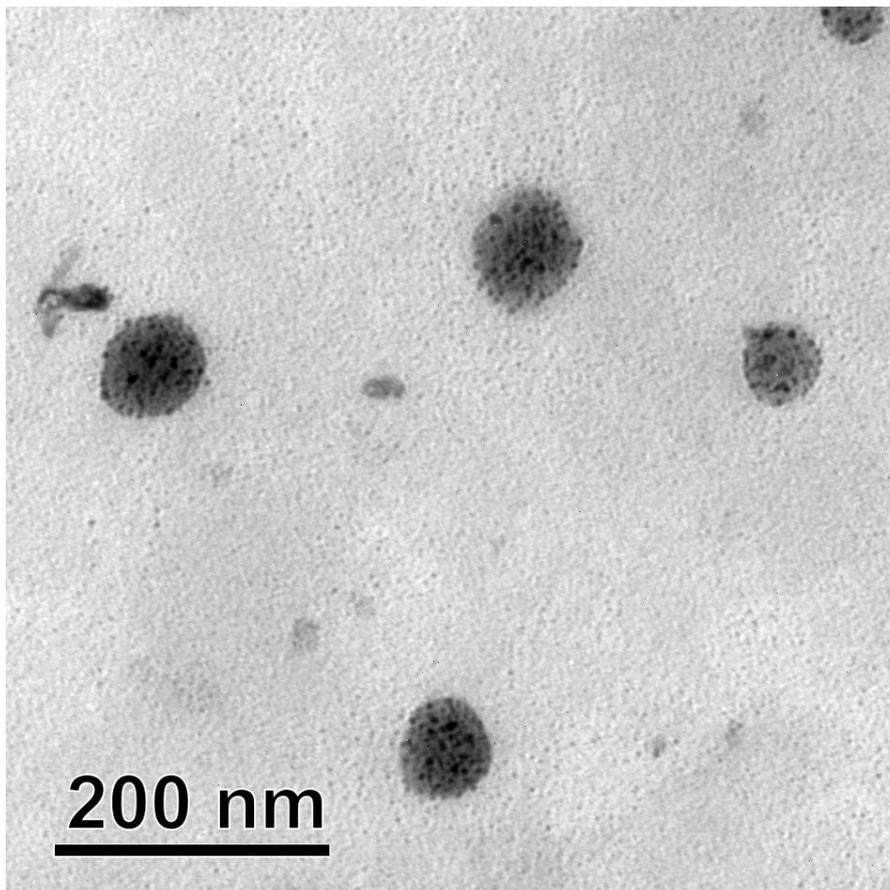


Figura 15 - Micrografia obtida com microscópio eletrônico de transmissão da NLSDox.

A NLSDox está distribuída uniformemente com partículas regulares, apresentando pontos de maior contraste no interior da estrutura cristalina

(Figura 15). A partir da micrografia observada na Figura 15 foi realizada a mensuração dos tamanhos das partículas, e então quantificada a frequência da distribuição dos diâmetros observados a fim da obtenção da análise da distribuição gaussiana na Figura 16. O tamanho médio obtido pela gaussiana é de 66,07 nm de diâmetro, a diferença em relação ao observado na Figura 17 é atribuída às diferenças no processamento da amostra e técnicas, onde a microscopia eletrônica requer a desidratação da amostra e o espalhamento dinâmico de luz ocorre em solução aquosa, contabilizando também a camada de solvatação da partícula no momento da mensuração do diâmetro.

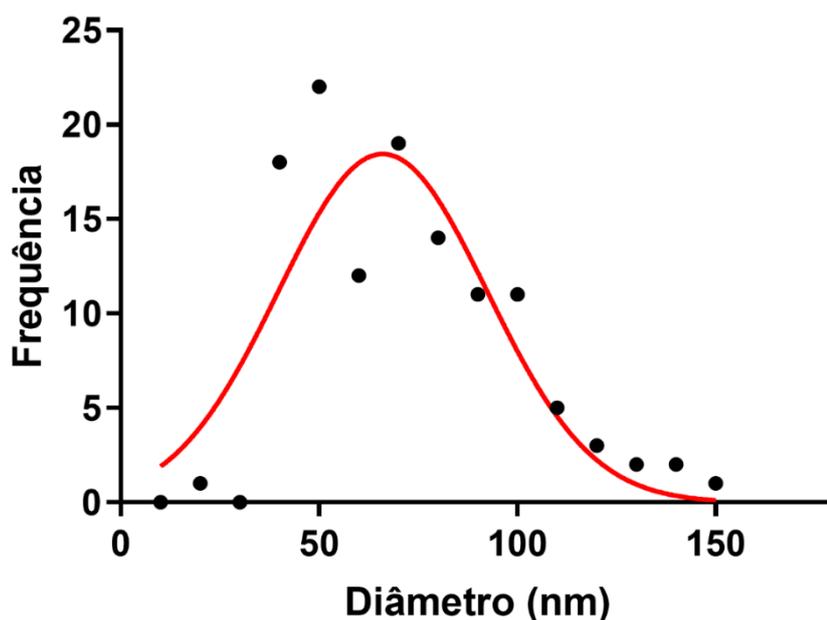


Figura 16 - Frequência de distribuição dos tamanhos das NLSDox mensuradas a partir da micrografia de MET, onde a linha vermelha representa a distribuição Gaussiana dos tamanhos.

Com o objetivo de reduzir o volume e impedir o crescimento do tumor primário e suas metástases, evadindo a excreção renal, nanoestruturas tem tamanho ideal na faixa de 50 a 200nm⁶⁶. As nanopartículas lipídicas sólidas contendo doxorubicina apresentaram tamanho médio de 146,18nm à 25°C, 146,47nm para 37°C e 147,10nm em 4°C, estando na faixa ideal sem sofrer

variações significativas do diâmetro hidrodinâmico ao longo do tempo, demonstrado em (A) da **Figura 17**.

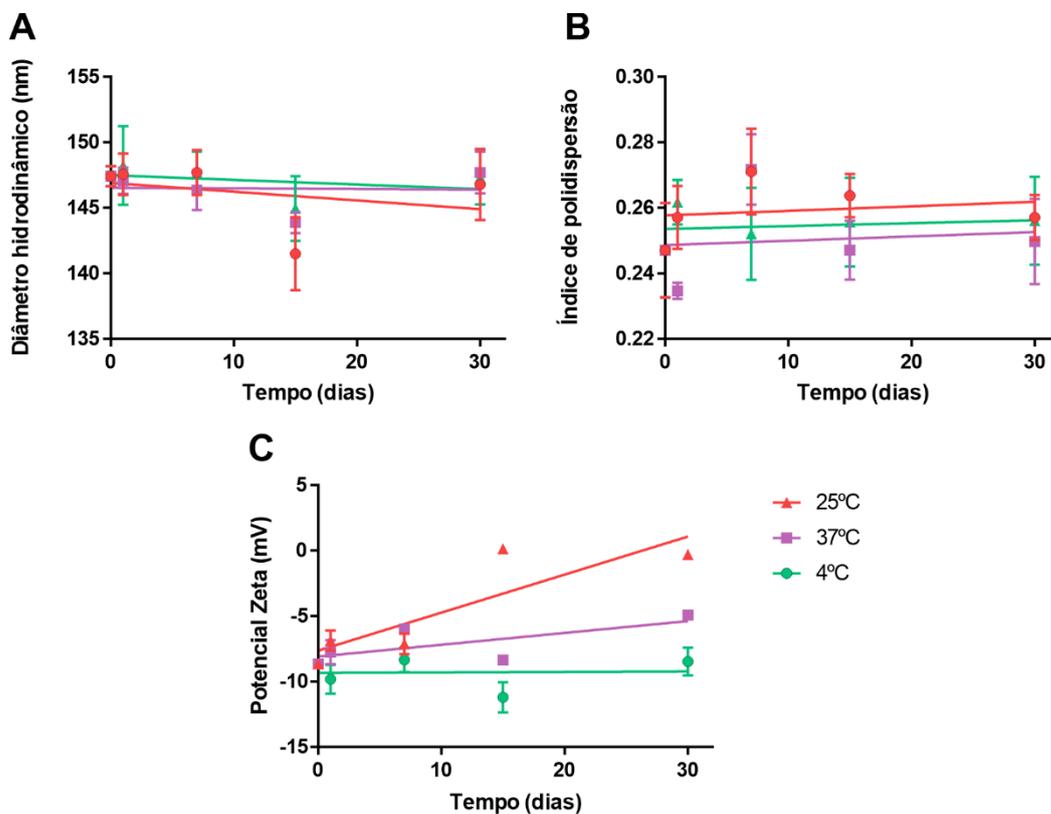


Figura 17 – Estabilidade da NLSDox ao longo do tempo em diferentes condições de armazenamento. **A)** Apresenta o diâmetro hidrodinâmico. Em **(B)**, o índice de polidispersão relativo ao diâmetro hidrodinâmico. **C)** Apresenta o potencial zeta em relação ao tempo.

O Índice de Polidispersão e o potencial zeta são parâmetros usualmente aplicados na avaliação da estabilidade de nanoestruturas, tendo como valores de referência de até 0,3 para o PDI e potenciais zeta variando entre -30 e 30 mV. É possível observar na **Figura 17 (B)** que o PDI é mantido abaixo de 0,3 sem alterações significativas ao longo de 30 dias, o mesmo é observado por da Rocha *et al* 2020³¹, indicando que a NLSDox é pouco polidispersa e, com exceção da amostra armazenada em 25°C, também apresenta constância no potencial zeta ao longo de 30 dias (**Figura 17 C**). Com as análises de DLS e potencial zeta, a NLSDox apresentou características semelhantes à formulação equivalente anteriormente obtida por da Rocha, 2020³¹ e se manteve estável durante um ano em diferentes condições de armazenamento.

Após a formulação da NLSDox, foram realizadas análises do perfil de fluorescência do fármaco a fim de avaliar o comportamento da doxorrubicina no

interior da nanopartícula em relação as suas fórmulas em cloridrato e base livre. A doxorubicina é uma molécula fluorescente de absorbância com pico em 480nm e emissões máximas por volta de 580nm⁸⁸, o mesmo foi observado em **(B)** das **Figuras 18 e 19**.

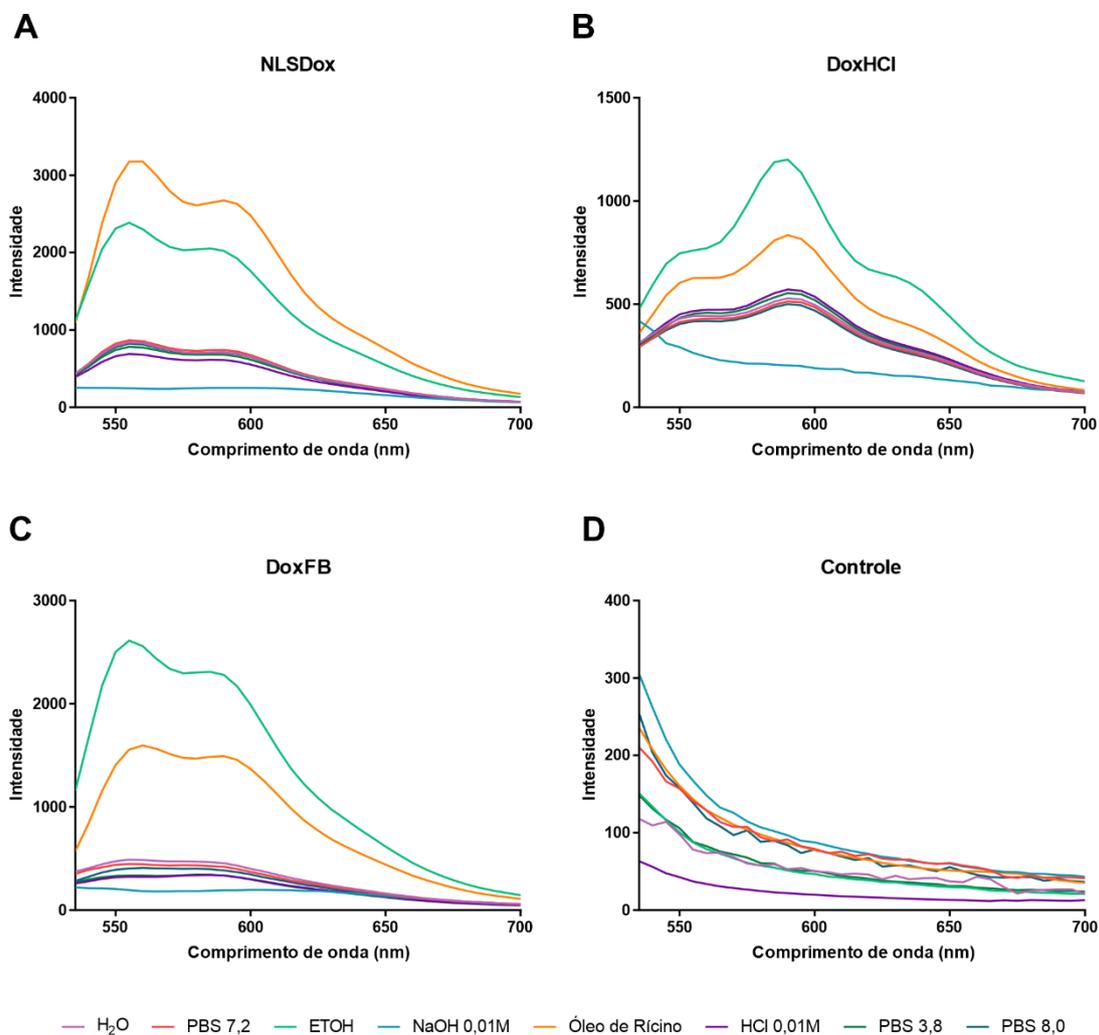


Figura 18 – Varredura do espectro de emissão de fluorescência em diferentes meios de dispersão, onde as amostras foram excitadas em 450nm. **A)** Representa o a intensidade emitida pela NLSDox. Em **(B)** está o espectro do cloridrato de doxorubicina. **C)** Apresenta o espectro para a doxorubicina em forma de base livre, já em **(D)** estão os espectros controle dos meios utilizados.

É possível observar que a emissão de fluorescência pela doxorubicina na forma de base livre apresenta cerca do dobro de intensidade do cloridrato de doxorubicina quando diluídas em etanol e óleo de rícino (**Figura 18 B e C e Figura 20 B**). As diferentes intensidades de fluorescência entre os solventes analisados podem ser explicadas pela formação de complexos de doxorubicina responsáveis por extinção da fluorescência pelo Inner-Filter Effect (IFE),

processos descritos por Yuan *et al* 1987⁸⁹ e Htun 2004^{89; 90}. O cloridrato de doxorubicina utilizado para a formulação apresenta uma porção de daunorrubicina em sua composição, o que indica a causa da presença de um segundo pico quando a doxorubicina está na forma de base livre, com deslocamento negativo no comprimento de onda de emissão (**Figuras 18 e 20**).

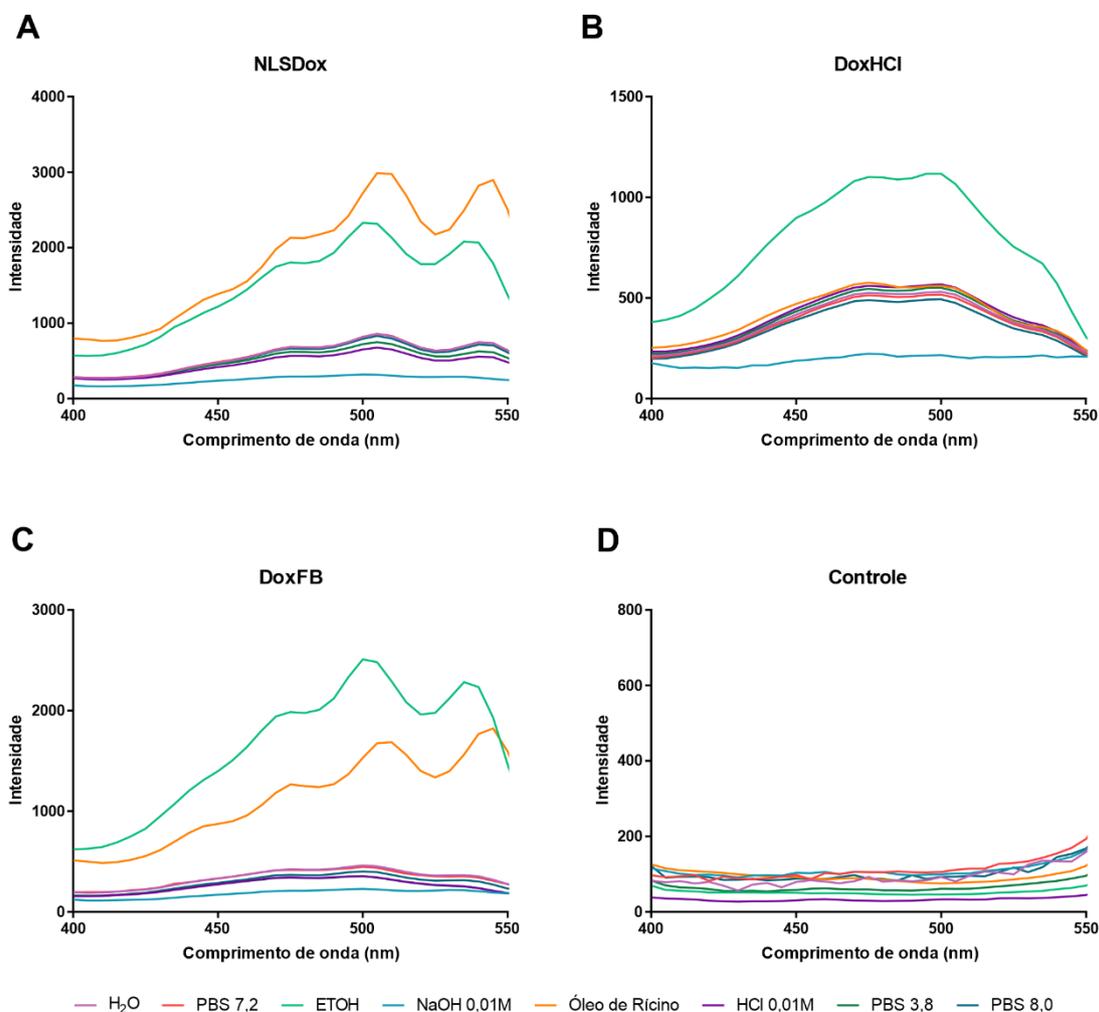


Figura 19 – Varredura do espectro de absorção de fluorescência em diferentes meios de dispersão, quando a emissão está fixa em 550nm. **A)** Indica os espectros de absorção para a NLSDox. Em **(B)** está o espectro do cloridrato de doxorubicina. **(C)** apresenta o espectro para a doxorubicina em forma de base livre. **D** representa o controle, contendo somente os solventes

Durante o processo de remoção da porção cloridrato da doxorubicina, as propriedades físico-químicas são alteradas em relação à coloração e solubilidade⁵⁶, dessa forma a doxorubicina passa a ser lipossolúvel e susceptível à associação com nanoestruturas. Nas **Figuras 18 e 19** é representado nas imagens **(C)** e **(D)** e na **Figura 20** que a absorção e fluorescência na NLSDox possui o mesmo perfil que a doxorubicina em base

livre, indicando que não houve reversão do processo para cloridrato durante a formulação da nanoestrutura. Nas **Figuras 18A e 19A** há a maior absorção e emissão em solvente lipídico para a NLSDox, devida a presença de tensoativos e estruturas com maior afinidade hidrofóbicas em relação às formas de doxorubicina básica ou cloridrato.

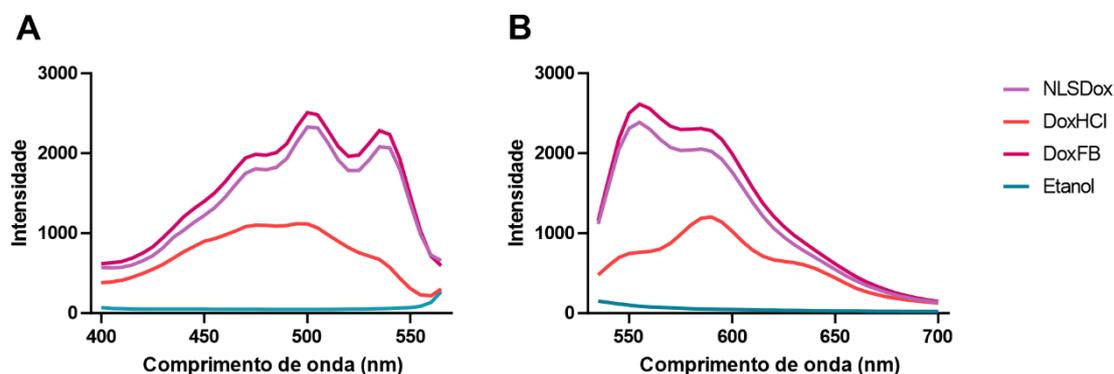


Figura 20 – Espectro de absorção (A) em relação ao emitido em 580 nm e espectro de emissão (B) com excitação em 480 nm para o cloridrato de doxorubicina, a doxorubicina base livre e NLSDox em etanol PA, tendo somente o etanol como controle.

Para quantificar a doxorubicina no meio após os ensaios de diálise, foi realizada o preparo da curva padrão para DoxHCl e também para DoxFB com concentrações entre 0,05 e 5µg/mL (**Figura 21**). O resultado obtido para DoxHCl foi de $R^2 = 0,9948$ e equação da reta sendo $Y = 22,44 \cdot X + 4,460$. Para DoxFB foi obtido o $R^2 = 0,9922$ e a equação $Y = 10,98 \cdot X + 3,113$. As curvas obtidas se encontram no padrão desejável de R^2 maior que 0,95 e foram utilizadas para a quantificação dos fármacos.

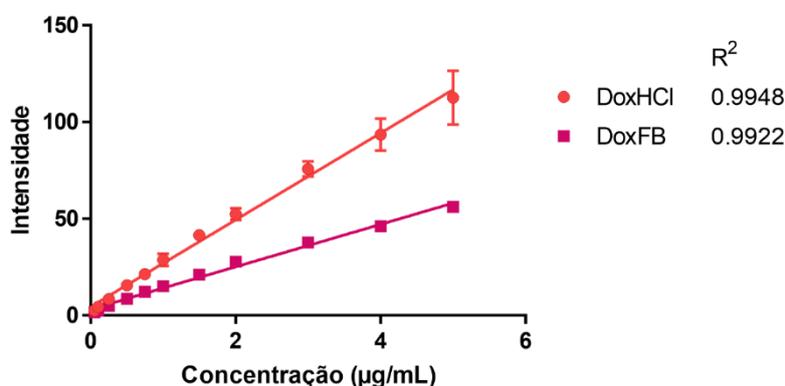


Figura 21 - Curva padrão em espectrofluorimetria para DoxHCl e DoxFB e seus respectivos R^2 .

Para avaliar o perfil de liberação do fármaco, foi quantificado o meio externo ao saco de diálise ao longo do tempo. Avaliando a concentração do fármaco recuperado na diálise ao longo do tempo (**Figura 22**

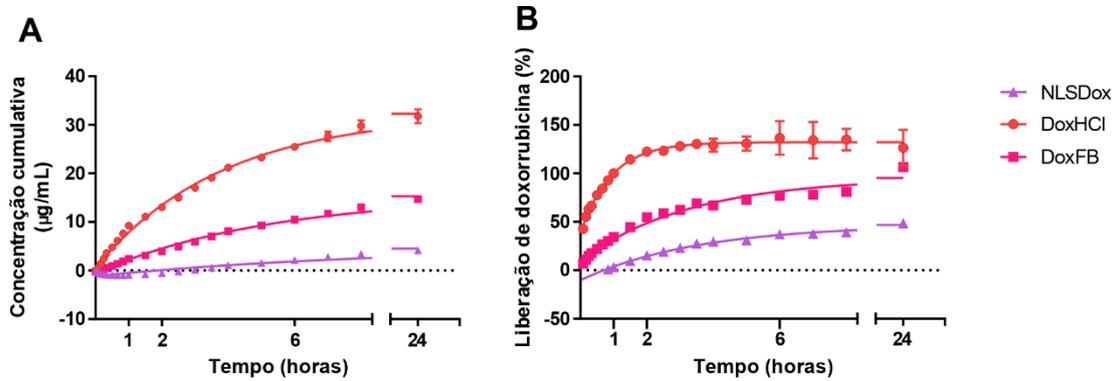


Figura 22A), obtivemos a liberação de 0,77 µg/mL de doxorubicina da NLSDox, representando 48,37% da quantidade adicionada ao saco no início do experimento (**Figura 22**

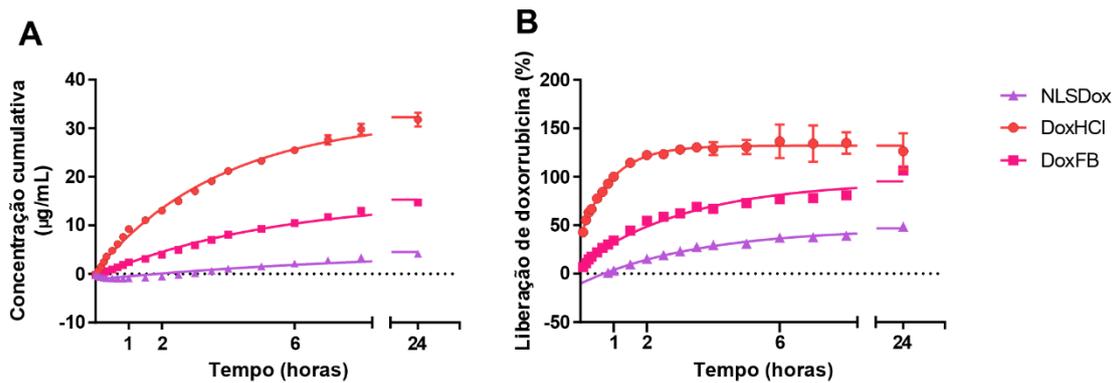


Figura 22A). A liberação controlada do fármaco é importante para a manutenção da concentração na faixa terapêutica, reduzindo a magnitude dos efeitos adversos da quimioterapia e aumentando a concentração no tumor.

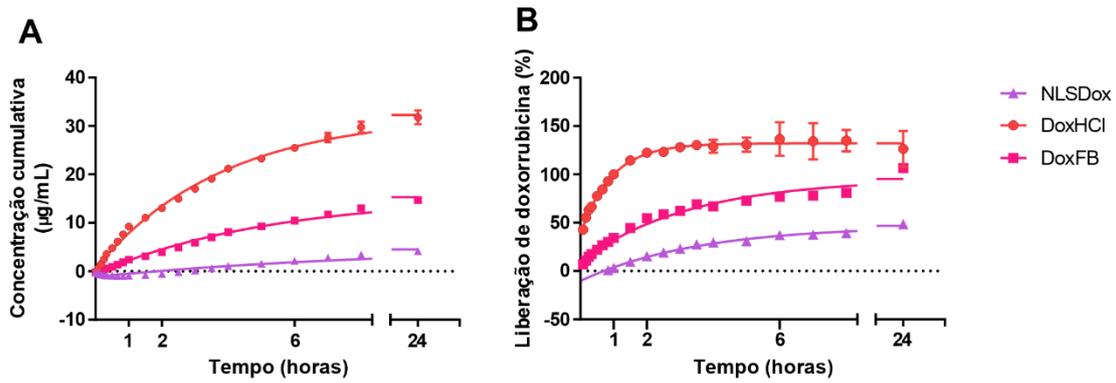


Figura 22 – Ensaio de liberação da doxorubicina. **A** apresenta a liberação cumulativa em concentração da doxorubicina em diferentes formas de apresentação. **B** indica a porcentagem de liberação do fármaco por diálise.

Observa-se que ocorreu o *burst effect*⁹¹ na **Figura 22**

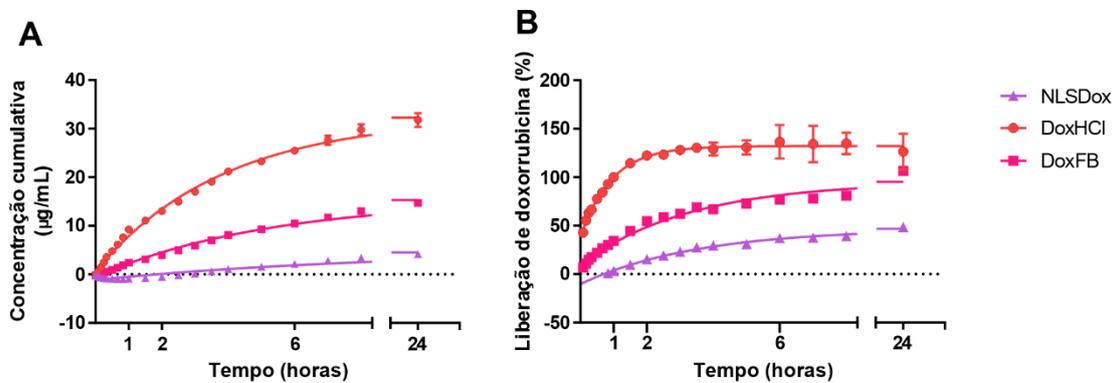


Figura 22B, onde o fármaco tem maior taxa de liberação nos tempos iniciais seguido por um platô, onde a liberação é estabilizada. A porcentagem de liberação (Figura 22

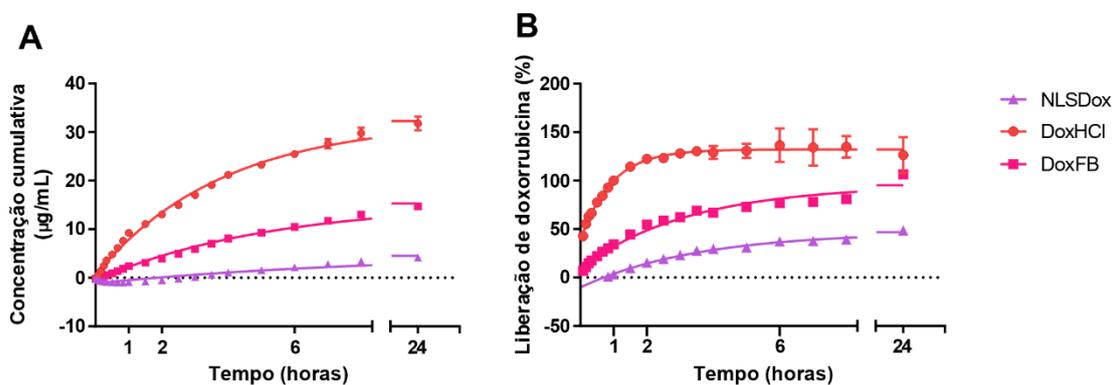


Figura 22B) não alcança 100% para a NLSDox, indicando que a nanoestrutura retém o fármaco em uma liberação controlada⁶⁷. Perfis de liberação de fármaco similares foram descritos em 2016 por Jourghanian *et al*⁹²

com uma nanopartícula lipídica sólida contendo curcumina e também em NLS contendo docetaxel por Rocha *et al* em 2020³¹.

Avaliação da biodistribuição da NLSDox em camundongos com tumor

O tratamento com quimioterápicos provoca diversos efeitos adversos, relacionados à toxicidade do tratamento, levando ao prognóstico ruim e redução da qualidade de vida do paciente. A biodistribuição otimizada da doxorubicina proporciona uma quimioterapia com menor danos ao tecido cardíaco e outros órgãos. A experimentação da avaliação da biodistribuição da doxorubicina foi realizada em animais com tumor, tratados com NLSDox e DoxHCl por 4 horas antes da eutanásia e coleta dos órgãos. Os animais foram acompanhados clinicamente a fim de estabelecer um modelo experimental adequado com um tumor primário viável. Na **Figura 23A** foram mensurados o peso corporal ao longo do tempo, sem apresentar variações significativas, também foram mensurados os pesos dos órgãos após a coleta (**Figura 23B-H**), onde diferenças foram apresentadas com esplenomegalia nos animais com tumor, independente do tratamento (**Figura 23B**), o aumento no peso do baço é consequência do processo de progressão tumoral, indicando que o modelo experimental estava de acordo com o esperado. Nenhuma alteração clínica era esperada entre os grupos de tratamento por terem sido administrados apenas quatro horas antes da eutanásia.

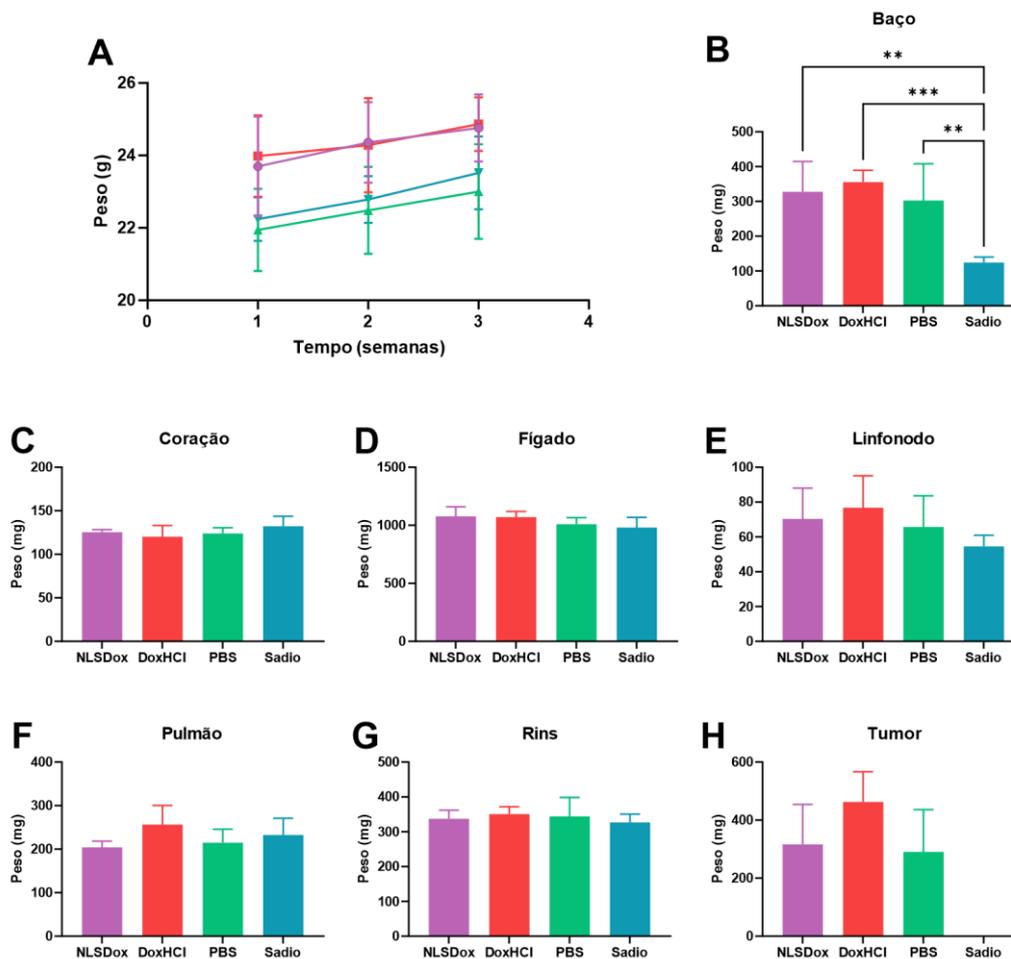


Figura 23 - Variação do peso corporal (A) e peso dos órgãos coletados dos animais para a avaliação da biodistribuição de doxorubicina: baço (B), coração (C), fígado (D), linfonodo axilar (E), pulmão (F), rins (G) e tumor (H), quando presente. Valores de *p* observados em B são equivalentes a 0,0017 para NLSDox, 0,0005, em DoxHCl e 0,0053 para PBS quando comparados com os animais sadios.

Para avaliação da eficácia do modelo tumoral em camundongos, foi realizada a quantificação da bioluminescência emitida pelas células cancerosas após a administração de luciferina. A **Figura 24** apresenta a progressão tumoral observada para o tumor primário (**Figura 24A**) e a região da metástase pulmonar (**Figura 24B**), é possível observar um crescimento normal para o modelo (**Figura 24C**), sem apresentação de metástases, apesar da variabilidade observada em seu perfil (**D**), os valores de radiância emitida na região da metástase (**Figura 24B e D**) estão muito abaixo dos observados em tumores primários em estágio inicial (**Figura 24A e C**).

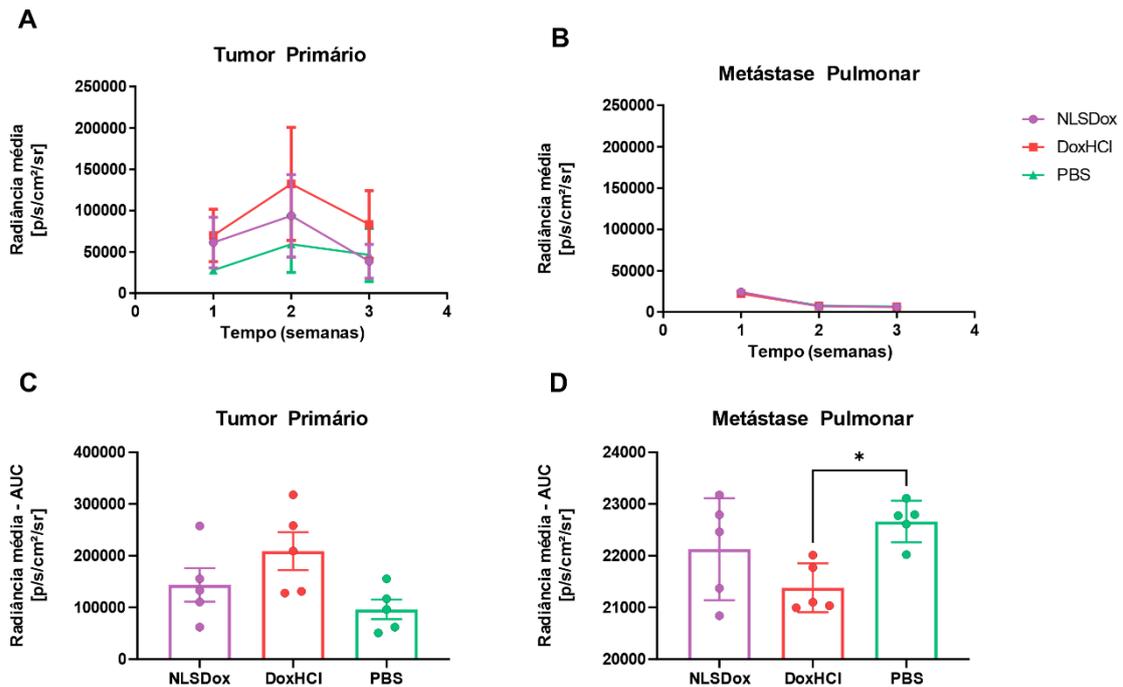


Figura 24 - Perfil da progressão tumoral nos camundongos antes do tratamento para avaliação da biodistribuição. A área sob a curva da bioluminescência na região do tumor primário (A) e na região da metástase pulmonar (B). A diferença estatística representada por * em B corresponde a $p=0,0271$. C apresenta a área sob a curva da radiância emitida ao longo de 3 semanas para o tumor primário. A área sob a curva da região da metástase pulmonar está em D, com $p=0,0271$.

Com um modelo tumoral estabelecido, os animais foram tratados e 4 horas depois foi realizada a eutanásia, então os órgãos dos animais foram coletados e processados como o descrito na metodologia, um *pool* foi criado com a amostra dos animais do grupo com tumor e sem tratamento (PBS), onde o meio extraído de isopropanol ácido e moléculas solúveis de cada órgão foi adicionado de fármaco e utilizado para a determinação de uma curva padrão específica a fim de sobrepor a interferência da autofluorescência dos tecidos. A autofluorescência em comprimentos de onda equivalentes à emissão de doxorrubicina é frequente em tecidos pigmentados como por exemplo o fígado, baço e também o sangue.

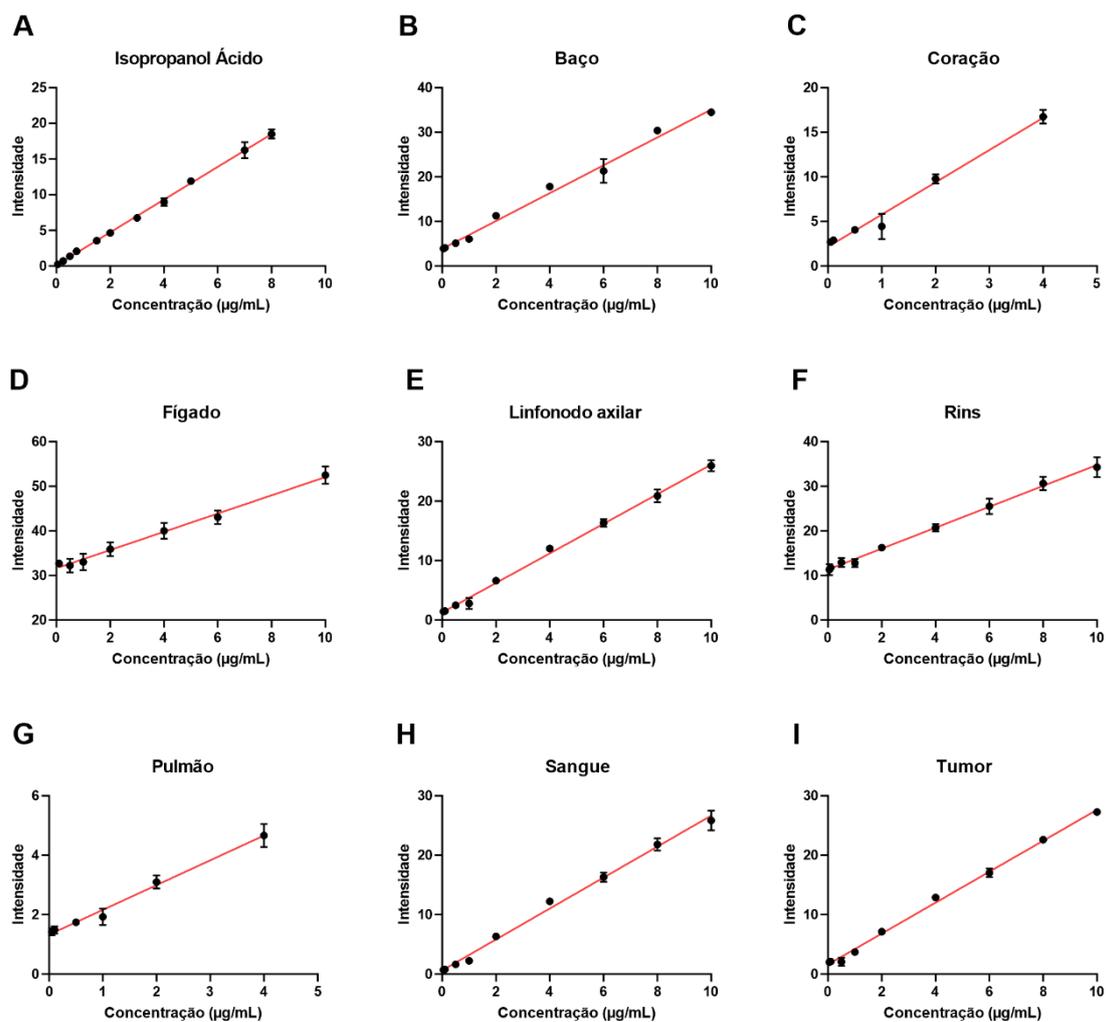


Figura 25 - Curvas de quantificação da doxorubicina em diferentes meios de tecidos coletados na avaliação da biodistribuição do fármaco.

As curvas obtidas apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,95 (**Figura 25**), apenas para a quantificação da doxorubicina presente no osso foi utilizada a curva com o isopropanol ácido sem moléculas do tecido (**Figura 25A**). Os valores de R^2 estão representados na **Tabela 7**.

Após o processamento das amostras, a quantificação da concentração recuperada de doxorubicina foi avaliada por espectrofluorimetria e os valores de intensidade de fluorescência foram aplicados nas respectivas curvas padrão (**Tabela 7 e Figura 25**).

Tabela 7 - Correlação linear para as curvas obtidas na quantificação de doxorubicina em diferentes meios, representadas pela equação e coeficiente de determinação (R^2).

	Equação	R^2
Isopropanol Ácido	$Y = 2,296 * X + 0,122$	0,9941
Baço	$Y = 3,124 * X + 3,846$	0,9875
Coração	$Y = 3,617 * X + 2,152$	0,9729
Fígado	$Y = 2,045 * X + 31,61$	0,9615
Linfonodos	$Y = 2,488 * X + 1,259$	0,9936
Pulmão	$Y = 0,833 * X + 1,327$	0,9665
Sangue	$Y = 2,603 * X + 0,616$	0,9909
Rins	$Y = 2,346 * X + 11,33$	0,9806
Tumor	$Y = 2,602 * X + 1,610$	0,9958

A concentração de porcentagem de doxorubicina administrada no animal está representada na **Figura 26** e foi observada diferença significativa no baço (**A**), coração (**B**) e pulmão (**F**), com maior retenção de doxorubicina para o grupo administrado com o fármaco em sua forma comercial em relação ao tratamento de doxorubicina nanoestruturada.

A menor retenção de doxorubicina no coração é uma característica desejável como vantagem da nanoestrutura em relação ao fármaco comercial por direcionar o tratamento ao tecido alvo e prevenir a cardiotoxicidade, responsável pela redução na qualidade de vida, impedindo também a continuidade do tratamento, uma vez que a doxorubicina provoca danos cardíacos irreversível. Shivakumar *et al* ⁶¹ descreveu, em 2012, que a doxorubicina causou hemorragias interfibrilares e danos às fibras do tecido cardíaco, a redução da concentração recuperada de doxorubicina após o tratamento com NLSDox indica uma menor toxicidade ao coração, órgão extensamente afetado pela quimioterapia. A NLSDox também apresenta redução na biodistribuição para órgãos sem tumor, como o baço, o que indica o menor efeito tóxico do tratamento quando em forma nanoestruturada em camundongos com tumor.

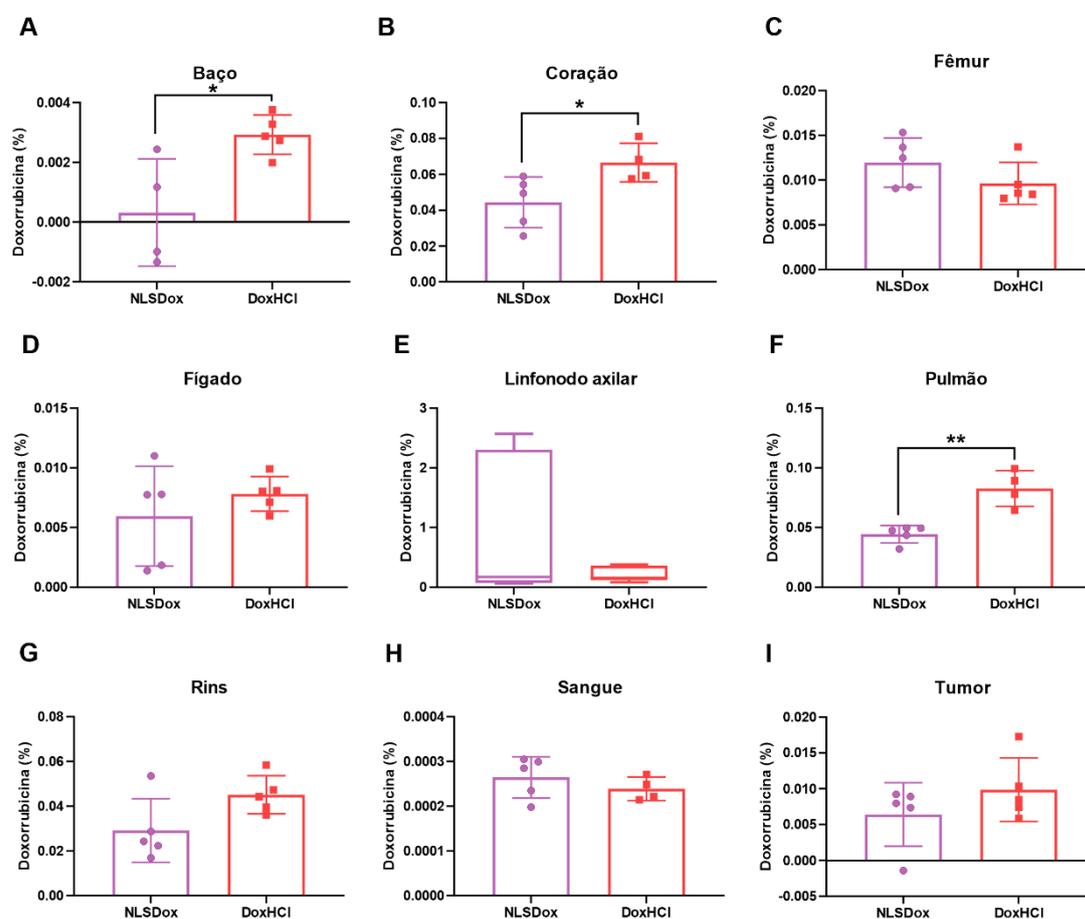


Figura 26 - Quantificação da doxorrubicina extraída dos órgãos coletados 4 horas após o tratamento da biodistribuição. **A)** Baço com * indicando $p=0,0187$, **B)** Coração com * indicando $p=0,0364$, **C)** Fêmur, **D)** Fígado **E)** Linfonodo, **F)** Pulmão com ** indicando $p=0,0015$, **G)** Rins, **H)** Sangue e **I)** Tumor.

Além da avaliação da presença de doxorrubicina nos órgãos, a toxicidade do fármaco pode ser avaliada com parâmetros clínicos como a análise hematológica (**Figuras 27 e 28**). Com o tempo reduzido de tratamento antes da coleta do sangue, pós eutanásia, as alterações hematológicas observadas nos animais da biodistribuição são atribuídas ao câncer enxertado.

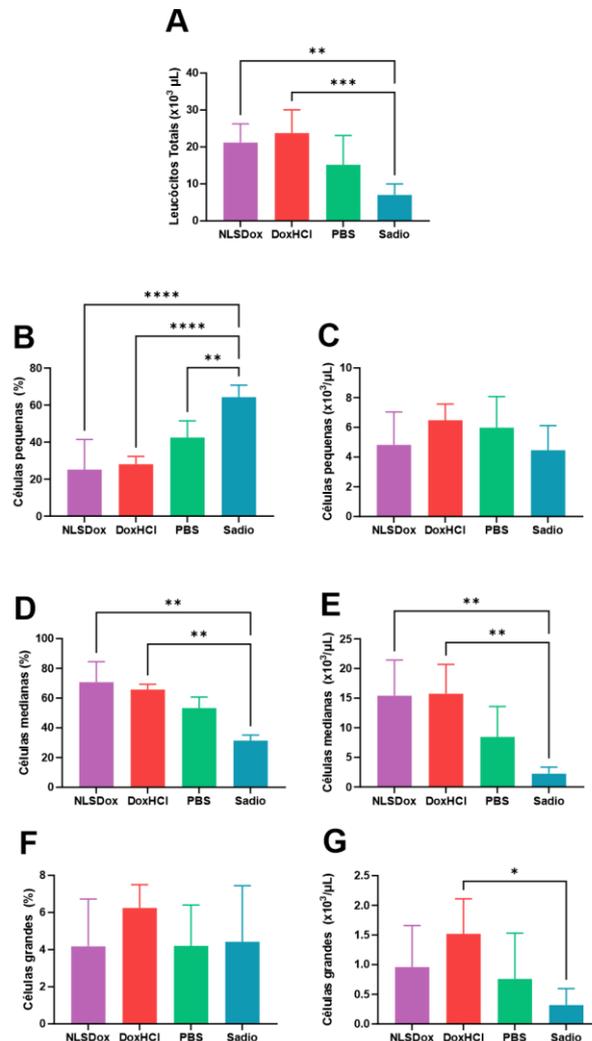


Figura 27 - Análise hematológica da parte branca do sangue dos camundongos após 4 horas de tratamento. **A)** Concentração de leucócitos totais com ** para $p=0,0041$ e *** para $p=0,001$, **B)** Porcentagem de células pequenas, onde os valores de p encontrados para NLSDox, DoxHCl e PBS em relação ao controle são de $<0,0001$, $<0,0001$, e $0,0034$ respectivamente. **C)** Concentração de células brancas de tamanho pequeno. **D)** Porcentagem de células medianas onde os valores de p obtidos foram de $0,0019$ para NLSDox e de $0,0069$ para DoxHCl. **E)** Concentração de células de tamanho médio com ** representando $p=0,0010$. **F)** Porcentagem de células grandes e **G)** com a concentração de células de tamanho grande, onde * equivale a $p=0,0407$.

A análise hematológica nos animais da biodistribuição (**Figura 27** e **Figura 28**) apresentou alterações equivalentes com a presença de tumor, com o aumento na concentração de leucócitos totais (**Figura 27A**) em relação aos animais sadios e com redução na proporção de células pequenas (**Figura 27B**), grupo que engloba os linfócitos, tendo aumentando a concentração de células

medianas (**Figura 27D e E**), incluindo leucócitos responsáveis por processos inflamatórios presentes na patologia do câncer de mama. Também foi observado um aumento na concentração de células grandes, sendo significativo apenas no grupo de DoxHCl (**Figura 27G**), essas variações hematológicas indicam que o enxerto tumoral promoveu um câncer de mama como o esperado.

Para os glóbulos vermelhos, representados na **Figura 28**, não houve alteração significativa em parâmetros como, concentração de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas, entretanto a redução no tamanho das hemácias (**Figura 28G**) foi significativa entre os animais dos grupos que foram administrados com doxorubicina em comparação aos sádios, considerando que a eritropoiese é um processo que necessita de tempos superiores a 48 horas ⁹³, a administração dos fármacos não seria atribuída como causa por ter sido realizada apenas 4 horas antes da coleta do sangue.

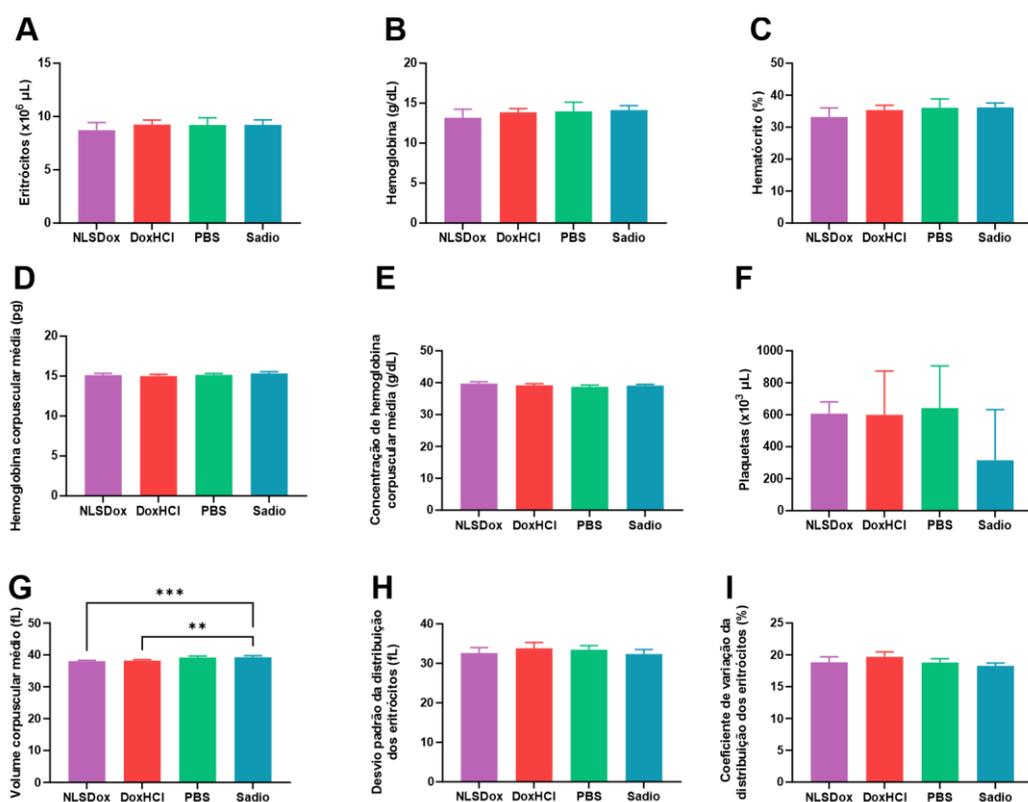


Figura 28 - Análise hematológica da parte vermelha do sangue dos camundongos após 4 horas de tratamento. **A)** Concentração de eritrócitos, **B)** Porcentagem de hematócritos, **C)** Concentração de hemoglobina, **D)** Concentração de hemoglobina corpuscular média, **E)** Concentração de hemoglobina corpuscular média, **F)** Concentração de plaquetas, **G)** Volume corpuscular médio com ** representando $p=0,0020$ e *** com $p=0,0006$, **H)** Desvio padrão da distribuição de eritrócitos e **I)** Coeficiente de variação da distribuição de eritrócitos.

Avaliação da prevenção da perda óssea provocada pela quimioterapia em animais sem tumor

A perda óssea é um processo de desbalanço no metabolismo ósseo que pode ser desencadeado por ação de fármacos quimioterápicos, a fim de avaliar a influência da doxorrubicina e o potencial preventivo da NLSDox, animais sem tumor foram tratados após 3 semanas de experimentação e ao fim da sexta semana, foram eutanasiados para coleta de órgãos e avaliação de parâmetros clínicos. Os animais foram imageados durante a experimentação para obtenção de dados relativos à densidade óssea, pulmonar e perfil inflamatório.

A **Figura 29A** apresenta a mensuração do peso corporal dos animais durante a experimentação, onde não há diferenças significativas entre os grupos ao longo do tempo. Para o peso dos órgãos (**Figura 29B-G**), foi observada a esplenomegalia (**Figura 29B**) e hepatomegalia (**Figura 29D**) nos animais tratados com NLSDox, as nanopartículas são adsorvidas e captadas pelo baço e fígado, influenciando na sua biodistribuição, quanto menor a sua captação, melhor a biodistribuição para os tecidos-alvo na quimioterapia ⁹⁴.

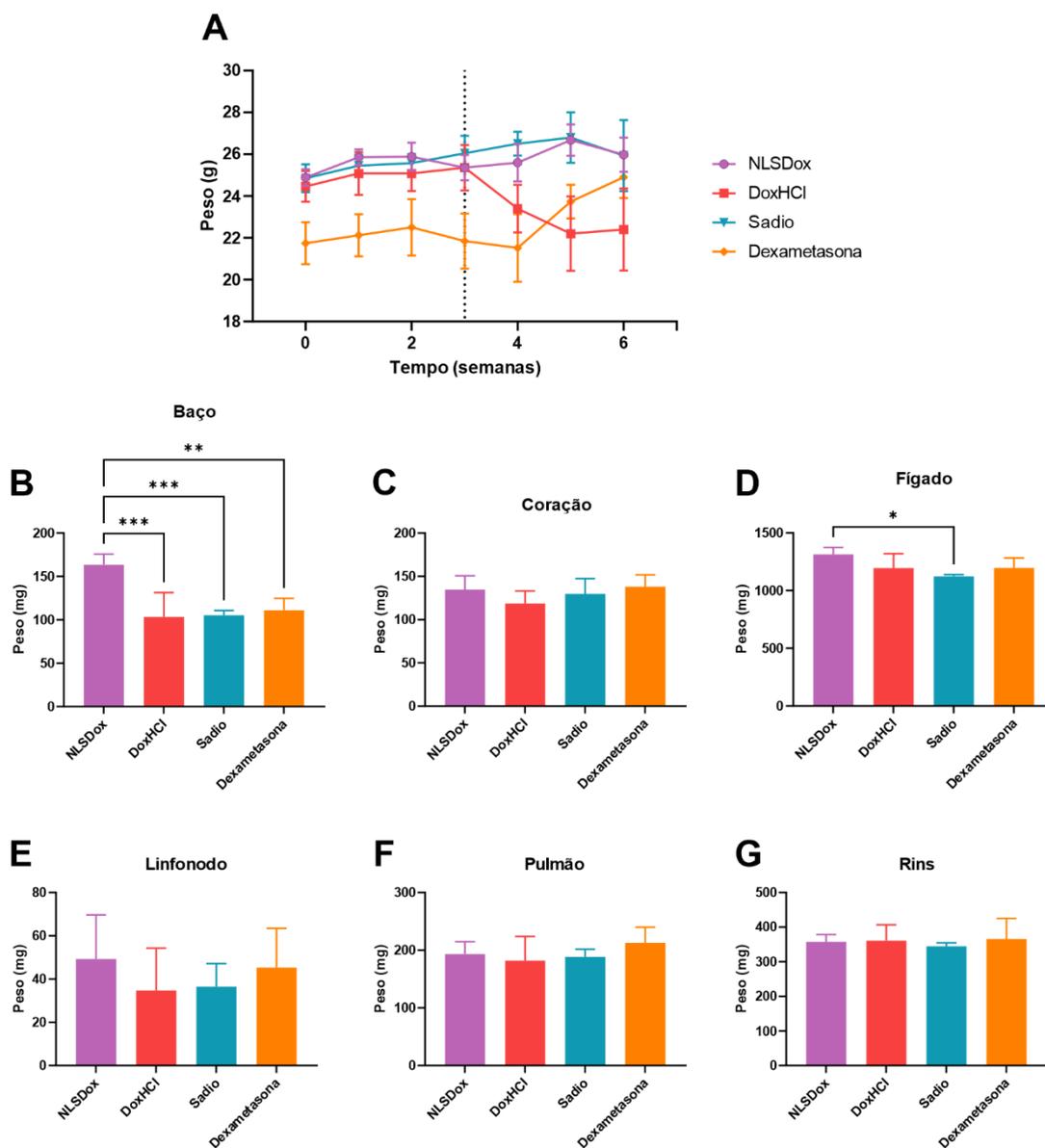


Figura 29 - Avaliação da variação do peso corporal (**A**) e do peso dos órgãos coletados dos animais sem tumor 6 semanas após o tratamento. **B**) Baço com valores de $p=0,0007$ para DoxHCl, $p=0,0009$ para os Sádios e $p=0,0022$ para Dexametasona quando comparados aos animais tratados com NLSDox. Os outros órgãos coletados foram coração (**C**), fígado (**D**, $p=0,0164$), linfonodo (**E**), pulmão (**F**) e rins (**G**).

Outra análise clínica realizada nos animais ao fim da experimentação foi a hematologia (**Figuras 30 e 31**). Analisando as células brancas do sangue, foi observada alterações na distribuição das células de diferentes tamanhos (**Figura 30C e E**), onde a NLSDox apresenta a recuperação de valores alterados nos animais tratados em relação a DoxHCl quando comparados aos valores referentes aos animais saudáveis sem tratamento. O tratamento com dexametasona foi utilizado para induzir a perda óssea nos animais e apresentar um controle positivo de menor densidade mineral nos ossos, esse desbalanço

no metabolismo promoveu alterações sistêmicas, além da perda óssea, a dexametasona é um corticosteroide com efeito imunossupressor em quase todas as células, o que está representado nos gráficos **C**, **E** e **G** da **Figura 30**.

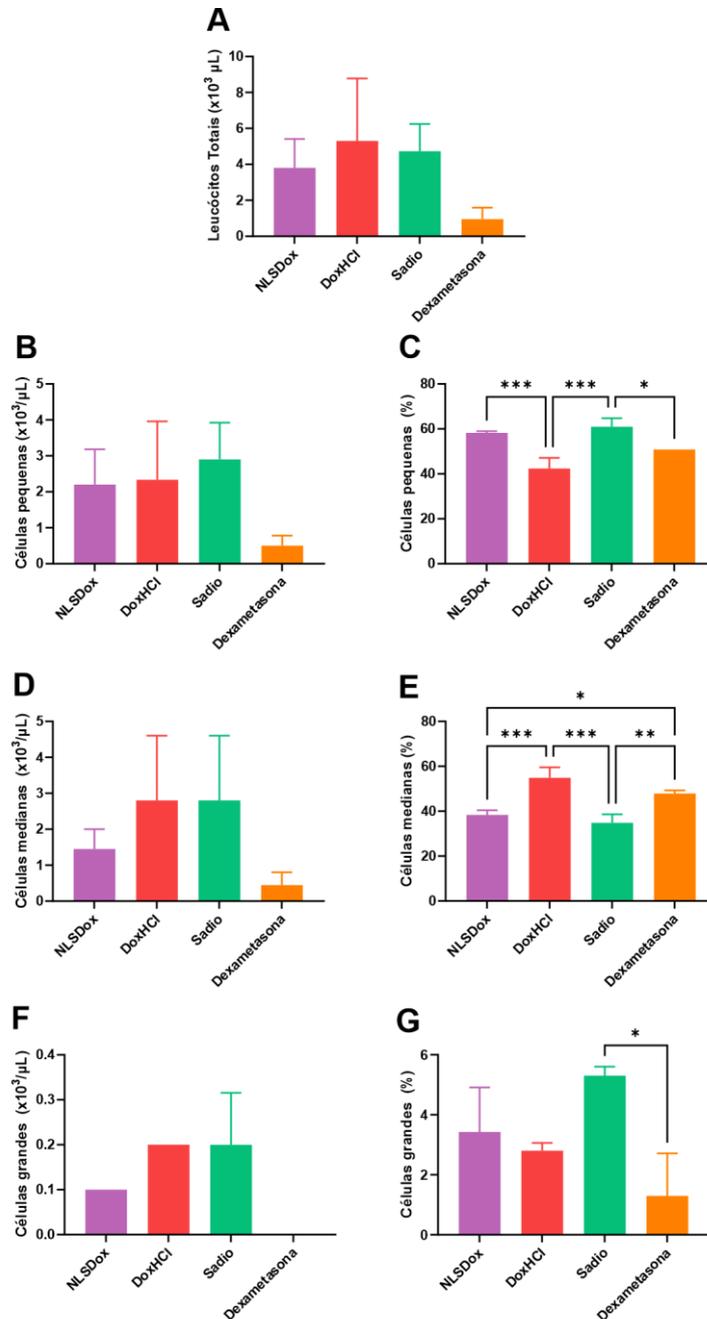


Figura 30 - Análise hematológica da parte branca do sangue de animais tratados sem tumor. **A)** leucócitos totais. **B)** concentração de células pequenas. **C)** porcentagem de células pequenas, com alterações significativas nos animais tratados com NLSDox ($p=0,0005$) em comparação com DoxHCl, também há redução nos animais tratados com DoxHCl ($p=0,0001$) e dexametasona ($p=0,0215$) em relação aos sadios. **D)** concentração de células de tamanho médio. **E)** porcentagem de células medianas onde NLSDox apresenta diferença com DoxHCl ($p=0,0006$) e dexametasona, esses mesmos grupos apresentaram diferenças em relação aos animais saudáveis ($p=0,0001$ e $0,0072$ respectivamente). **F)** concentração das células grandes. **G)** porcentagem de células de maior tamanho ($p=0,0138$).

Complementar ao analisado na faixa branca do sangue, os eritrócitos também foram quantificados (**Figura 31**), os animais tratados com doxorubicina apresentaram um quadro de redução de hematócritos (**Figura 31C**), a anemia é relacionada com a perda óssea ⁹⁵, onde o desequilíbrio no metabolismo ósseo atinge a medula, alterando a proliferação de células precursoras, influenciando também no tamanho que essas células apresentam na maturação, além disso a eritropoetina estimula precursores de osteoclastos ^{95; 96; 97}(**Figura 31G-I**). O tratamento com NLSDox recuperou valores de hematócrito, estabilizando a quantidade e distribuição de eritrócitos, o que pode indicar uma normalização na produção de células sanguíneas na medula óssea (**Figura 31C**).

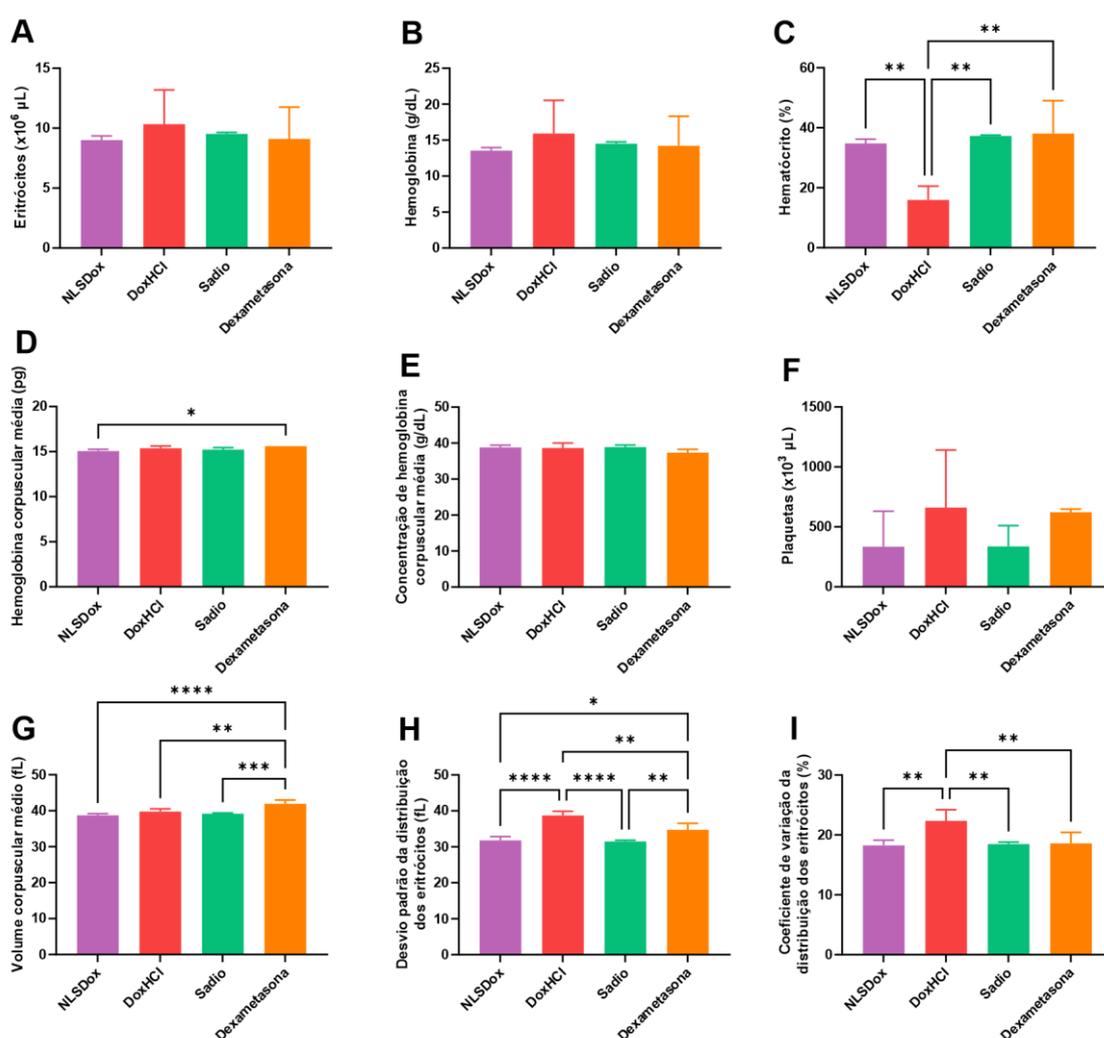


Figura 31 - Hematologia da porção vermelha do sangue de animais tratados sem tumor. **A)** concentração de eritrócitos. **B)** concentração de hemoglobina. **C)** porcentagem de hematócritos com diferenças significativas de NLSDox ($p=0,0038$), sadio ($p=0,0014$) e dexametasona ($p=0,0010$) em relação aos animais tratados com DoxHCl. **D)** hemoglobina corpuscular média ($p=0,0147$). **E)** concentração da hemoglobina corpuscular média. **F)** concentração de plaquetas. **G)** volume corpuscular médio, onde dexametasona apresentou

aumento em relação a NLSDox, DoxHCl e sadio ($p < 0,0001$, $0,0026$ e $0,0003$ respectivamente). **H)** desvio padrão da distribuição dos eritrócitos com dexametasona apresentando diferença significativa em relação a NLSDox ($p=0,0135$), DoxHCl ($p=0,0019$) e sádios ($p=0,0094$), os animais tratados com DoxHCl também apresentaram aumento em relação a NLSDox ($p < 0,0001$) e os sádios ($p < 0,0001$). **I)** coeficiente de variação da distribuição dos eritrócitos, onde DoxHCl apresentou aumento em relação a NLSDox, sádios e dexametasona (valores de $p=0,0032$, $0,0071$ e $0,0086$ respectivamente).

Por apresentar menores efeitos adversos na administração nanoestruturada, a quimioterapia com NLSDox implica na maior taxa de sobrevivência dos animais (**Figura 32**), onde o único grupo a não atingir 100% de sobrevivência dos animais sem tumor ao longo de 6 semanas foram os com tratamento de cloridrato de doxorubicina, levando a 50% de mortalidade na última semana de experimentação. Os animais receberam a mesma quantidade de fármaco, o que atribui a maior sobrevivência é a forma farmacêutica que foi utilizada, a nanopartícula lipídica sólida.

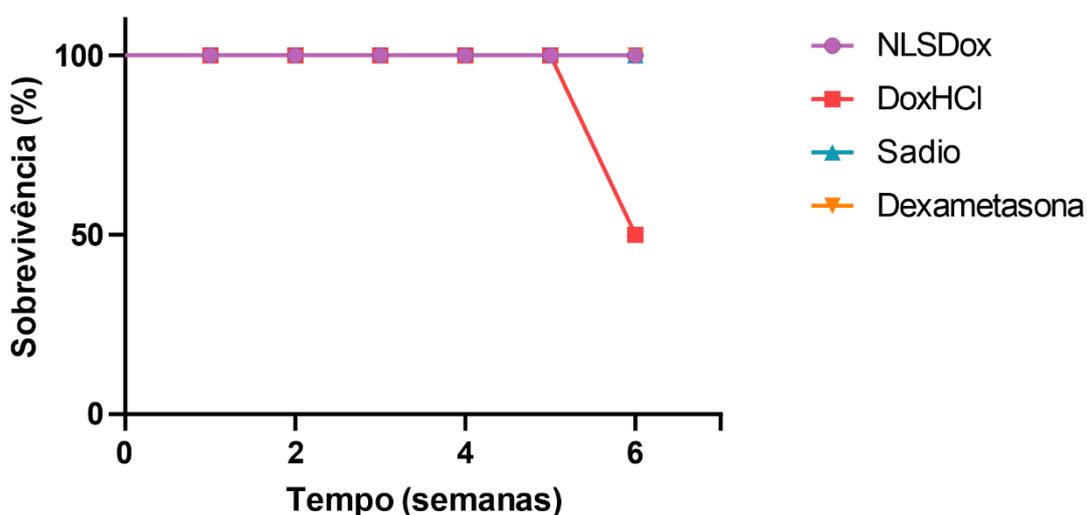


Figura 32 - Porcentagem de sobrevivência dos animais ao longo de seis semanas de experimentação.

Complementando a avaliação dos efeitos adversos da quimioterapia e sua atenuação pelo tratamento com NLSDox, foi realizada a avaliação do perfil de inflamação crônica nos animais na sexta semana de experimentação, três semanas após o tratamento (**Figura 33**). A variabilidade entre os animais tratados com NLSDox resultou na ausência de significância estatística na quantificação da inflamação na região do tumor primário, por outro lado os animais que receberam o cloridrato de doxorubicina tiveram menor radiância, indicando menor atividade de células imunológicas que secretam moléculas

reativas de oxigênio (**Figura 33B**). Tseng e Kung ⁷⁹ descreveram em 2012 como a utilização de lucigenina pode ser utilizada para a determinação da inflamação crônica devida a atividade de NADPH oxidase dos macrófagos.

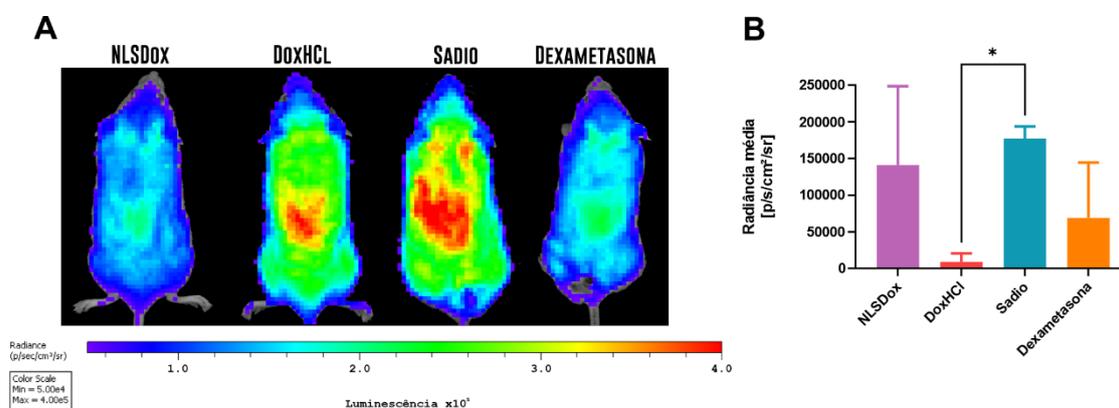


Figura 33 – Imageamento de quimioluminescência em inflamação crônica nos animais sem tumor. **A)** fotografias obtidas da distribuição dos fótons emitidos. **B)** a quantificação da radiação na região do tumor primário (flanco esquerdo) ($p=0,472$).

A avaliação da prevenção da perda óssea em animais sem tumor foi fundamentada em duas técnicas, a tomografia computadorizada e a microscopia eletrônica de varredura, para avaliar os parâmetros de animais saudáveis, foram quantificados o volume do tecido ósseo e do pulmão (**Figura 34A**), o maior valor de HU presente nos *voxels* do pulmão (**Figura 34B**) e o menor valor encontrado no tecido ósseo (**Figura 34C**).

A presença de *voxels* de alto valor HU na região pulmonar indica a presença de muco, fibroses ou tumores, considerando que a composição principal da porção interior do pulmão é de ar, com HU variando de -100 a -1000, Gehr *et al* ⁹⁸ apresentaram em 1978 a avaliação da ultraestrutura de pulmões humanos, onde 86,5% é caracterizada por espaços com ar. A distribuição de *voxels* na escala Hounsfield para enfisema entre pulmões saudáveis foi descrita por Hoffman *et al* ⁹⁹ em 2014, este estudo é baseado no princípio que o volume do pulmão pode ser quantificado pela escala de HU do ar puro, assim como a presença de doenças podem alterar a radiodensidade no tecido.

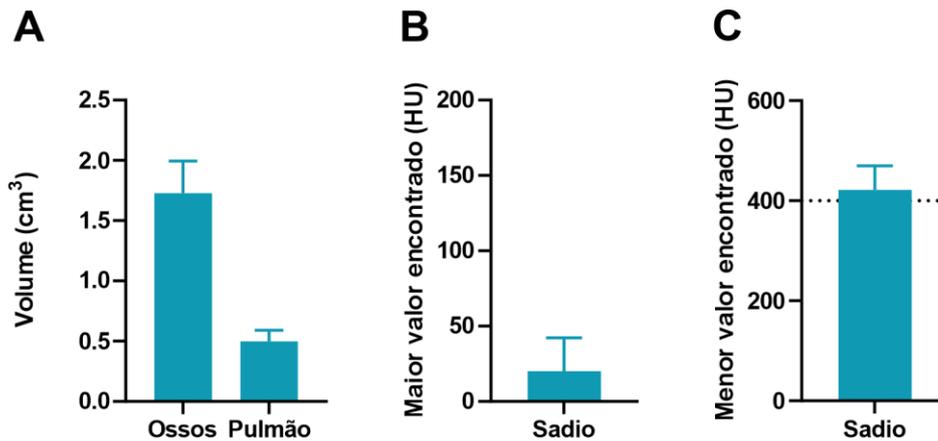


Figura 34 - Parâmetros obtidos em animais saudáveis em relação ao volume dos tecidos (A), maior valor de HU encontrado na região pulmonar (B) e menor valor de HU encontrado no tecido ósseo (C).

Com a aquisição das imagens por tomografia computadorizada, o volume do tecido ósseo foi quantificado após a segmentação de *voxels* presentes na faixa de 350 a 5000 HU (**Figura 35A**), para o pulmão, foram segmentados *voxels* com HU de -100 a -1000 (**Figura 35B**). Os volumes mensurados são dos *voxels* presentes dentro da faixa considerada ideal para o tecido, a alteração nesse volume indica a diferente composição no tecido e não a sua dimensão, uma vez que um osso descalcificado, por exemplo, apresentaria valores menores de 350 e seria desconsiderado no volume segmentado.

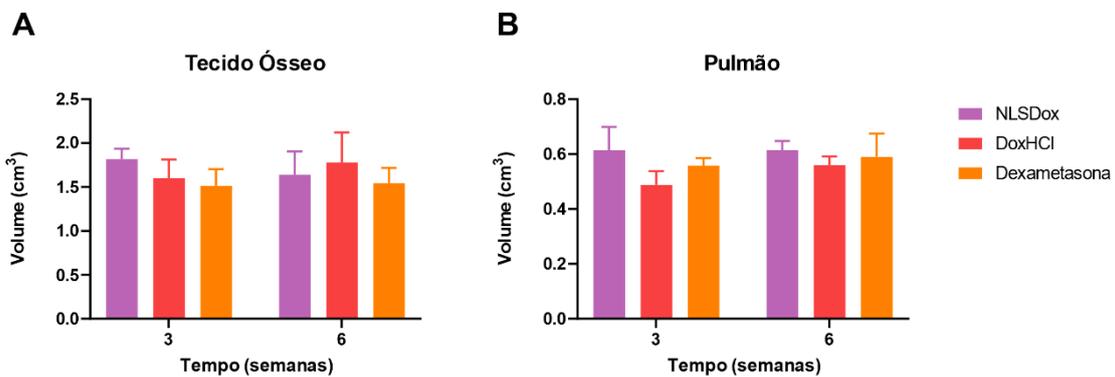


Figura 35 - Mensuração do volume obtido após a segmentação do tecido ósseo (A) e do pulmão (B) em tomografia computadorizada.

Além da segmentação para obtenção dos volumes de *voxels* dentro das faixas de interesse, também é fornecido a amplitude de HU no tecido avaliado. Na **Figura 36A**, os menores valores de HU encontrados no tecido ósseo dos animais foram quantificados, a fim e avaliar a presença de regiões de baixa radiodensidade, equivalente a desmineralização, no osso. Para o pulmão **Figura**

36B, foram avaliados os maiores valores de HU da amostra, onde valores positivos indicam a presença de água, muco, fibroses ou até metástases⁹⁹. Não foram quantificadas diferenças significativas entre os grupos, uma das limitações da tomografia computadorizada é a resolução, o tamanho do *voxel* padrão é 250 μ m, já os depósitos de cálcio estão em resoluções de *voxels* até 20 μ m. Os valores para o pulmão apresentaram valores positivos inclusive em animais saudios (**Figura 34B**), além da resolução, os animais são mantidos em maravalha, o que pode provocar alterações morfológicas nas vias aéreas pela respiração de fragmentos e pó.

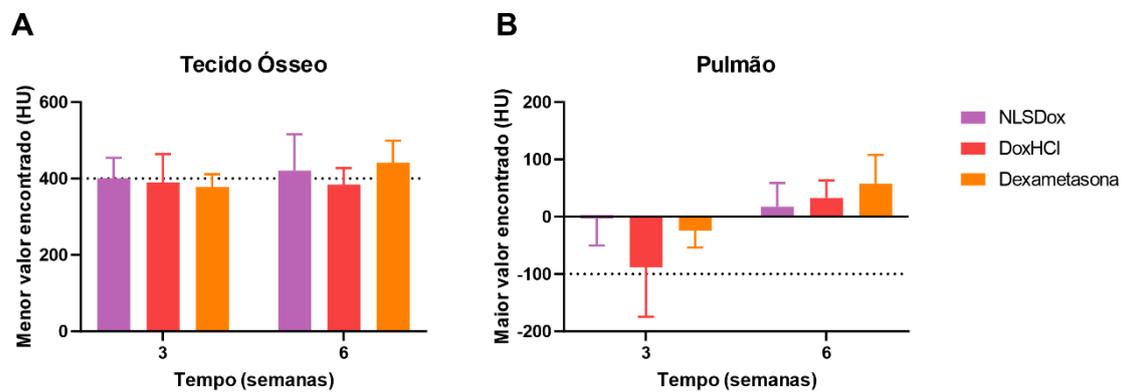


Figura 36 - Quantificação do HU nos voxels presentes de menor valor no tecido ósseo (**A**) e de maior valor no pulmão (**B**).

Complementando a quantificação da distribuição de HU nos voxels do pulmão, foram coletadas imagens de pranchas de raio x da tomografia computadorizada (**Figura 37**), onde não é possível observar a presença de nódulos no pulmão, porém é visível a atenuação aumentada na aparência amorfa no animal sadio (**Figura 37C**), ao contrário da fibrose pulmonar em humanos, que apresenta forma hexagonal semelhante a favos de mel¹⁰⁰, a fibrose em camundongos é irregular e de difícil caracterização morfológica¹⁰¹.

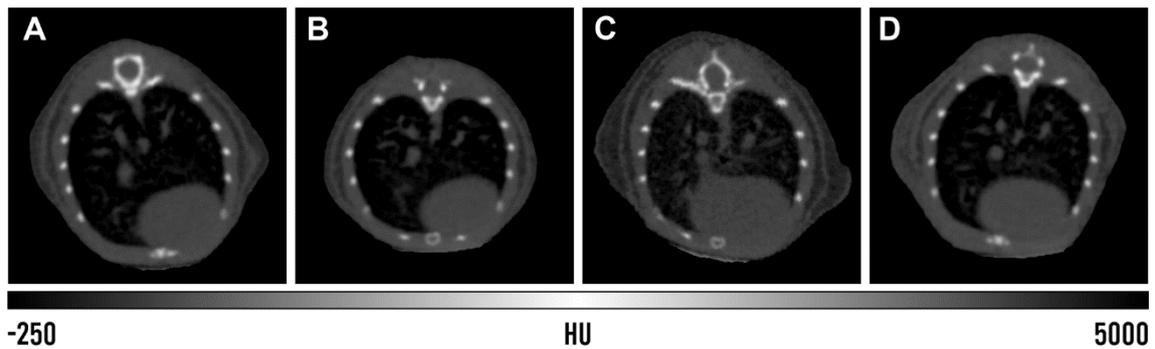


Figura 37 - Pranchas de raio x da região torácica obtidas por tomografia computadorizada. **A)** NLSDox. **B)** DoxHCl. **C)** Sadio. **D)** Dexametasona.

Com a tomografia computadorizada, também foi possível avaliar a variação da radiodensidade da matriz mineralizada no tecido ósseo, apresentada na **Figura 38**. A perda óssea pode provocar o enfraquecimento do esqueleto, por redução da mineralização ou distribuição da parte esponjosa da medula óssea, indicada pelas setas azuis, ou pelos danos provocados ao osso compacto, indicado pela seta branca. Outra forma de perda óssea observada foi a redução da mineralização na região da placa de crescimento (setas azuis), o que aponta a influência do tratamento com doxorubicina no crescimento ósseo. Os animais tratados com NLSDox são morfologicamente semelhantes aos saudáveis, indicando a prevenção da perda óssea provocada pela doxorubicina nos animais sem tumor.

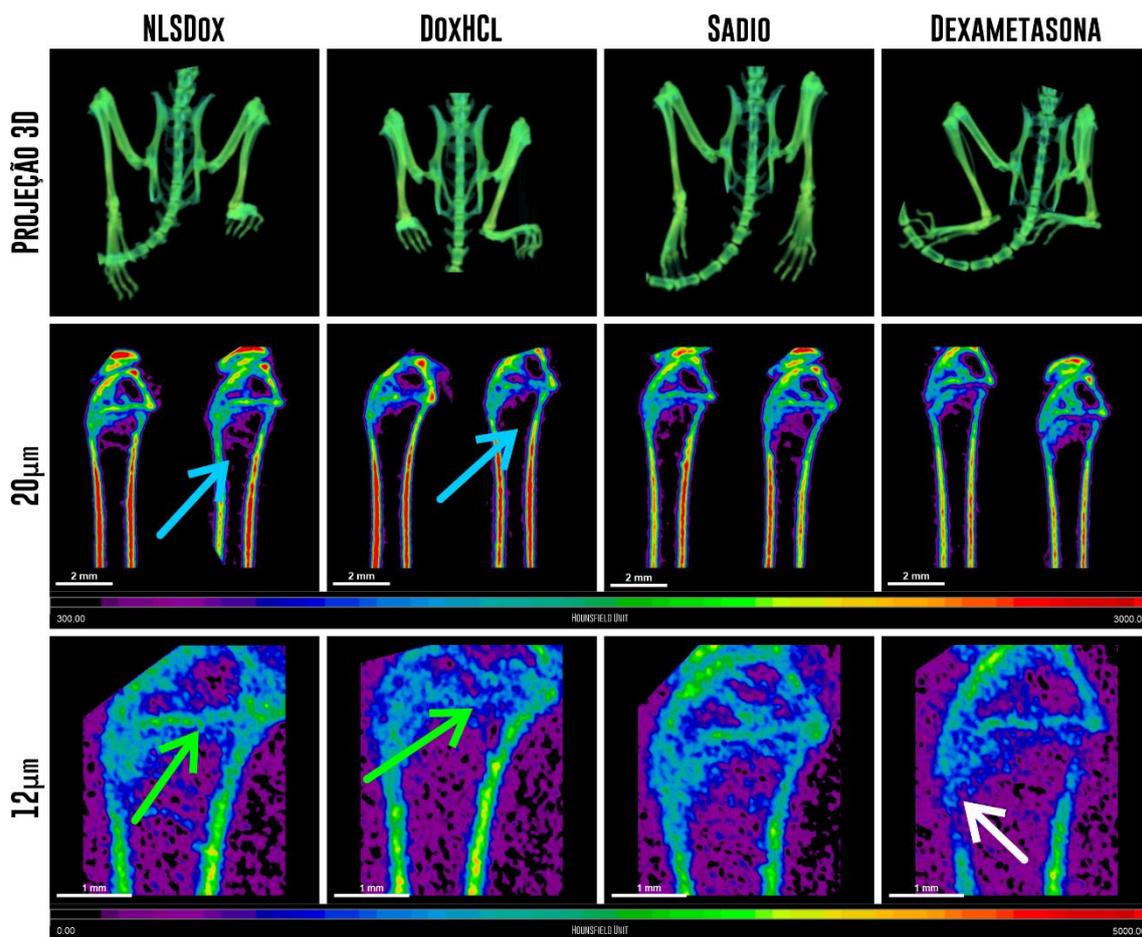


Figura 38 - Imageamento por tomografia computadorizada do tecido ósseo observado em diferentes resoluções e processamentos da imagem. Setas azuis indicam o osso esponjoso, setas verdes indicam a placa de crescimento e a seta branca aponta a perda óssea no osso compacto.

A tomografia computadorizada apresenta limitações nas observações por ter menor resolução, a fim de obter imagens com mais detalhes sobre a morfologia do tecido ósseo após o tratamento, os fêmures foram micrografados (**Figura 39**). Em cortes longitudinais e em menor magnificação é possível observar a diferente distribuição e menor quantidade do osso esponjoso na região da medula óssea (setas verdes) em animais tratados com DoxHCl e dexametasona. Apesar de conter a mesma quantidade de fármaco em relação ao grupo tratado com DoxHCl, o tratamento com NLSDox preveniu a perda óssea apresentada pela DoxHCl na região do osso esponjoso (setas verdes).

Em maiores magnificações não é possível observar alterações morfológicas na região da placa de crescimento (setas rosas) apesar da redução na radiodensidade observada nas setas verdes da **Figura 38**. As setas azuis indicam a presença de poços de reabsorção óssea provocados pela atividade de

osteoclastos, essas estruturas são observadas em ossos saudáveis, porém em maior quantidade nos ossos com osteoporose. Não foram avaliadas grandes regiões de reabsorção óssea na porção esponjosa do fêmur entre os grupos.

Com a avaliação dos aspectos clínicos, seguidos de imageamento e microscopia eletrônica, foi observada a perda óssea provocada pelo tratamento com doxorrubicina, esta foi prevenida com a utilização da NLSDox em animais sem tumor, além da redução da toxicidade sistêmica provocada pela quimioterapia.

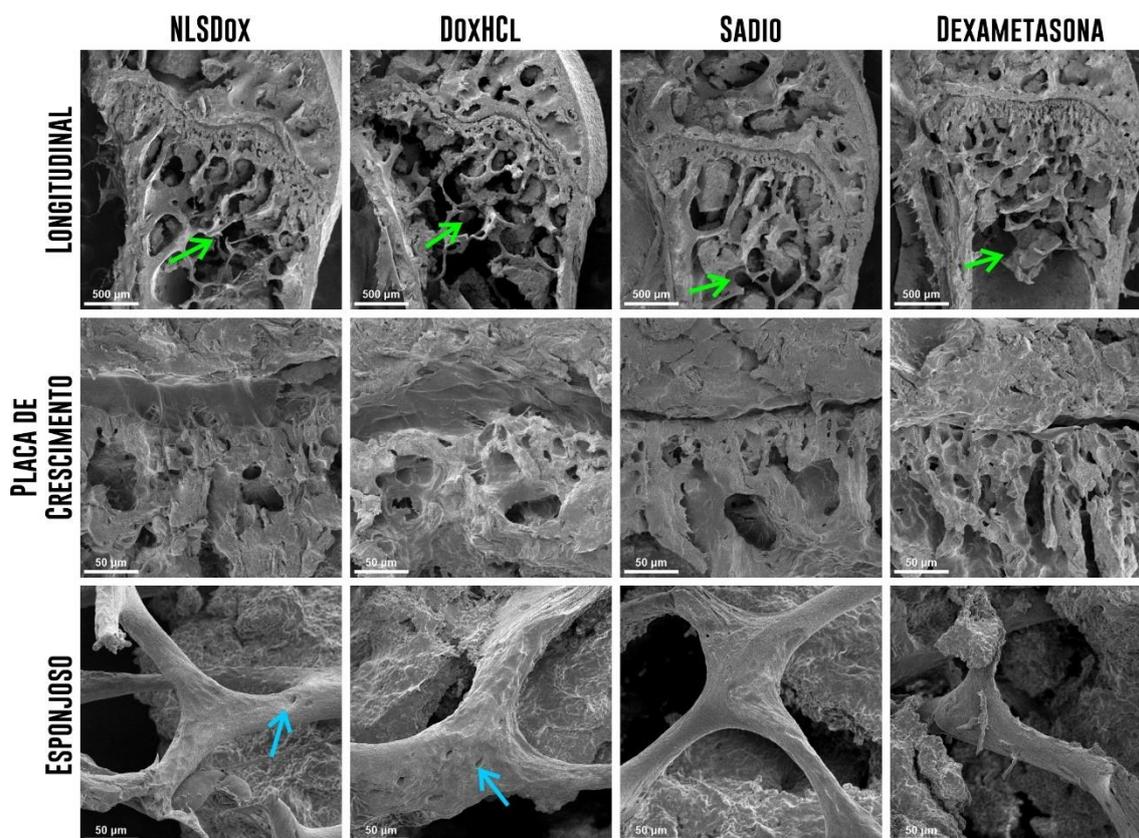


Figura 39 - Micrografias de fêmur dos animais tratados sem tumor em diferentes magnificações no corte longitudinal. As setas verdes indicam a organização do osso esponjoso na região da medula óssea e as setas azuis apontam pontos de reabsorção óssea.

Avaliação da prevenção da perda óssea em animais com tumor após a quimioterapia com SLNDox

Com a prevenção da perda óssea sendo observada nos animais sem tumor tratados com NLSDox, a avaliação em animais com tumor é importante devida a potencialização da reabsorção óssea provocada pelo câncer de mama independentemente do tratamento.

Assim como na experimentação da biodistribuição, parâmetros de controle do modelo tumoral e qualidade de vida dos animais foram monitorados, como o peso corporal, apresentado na **Figura 40A**, onde não houve perda de peso significativa ao longo do tempo, apenas uma redução para os grupos tratados com a doxorrubicina em sua forma comercial, essa perda de peso pode ser atribuída aos efeitos colaterais do tratamento, incluindo náuseas.

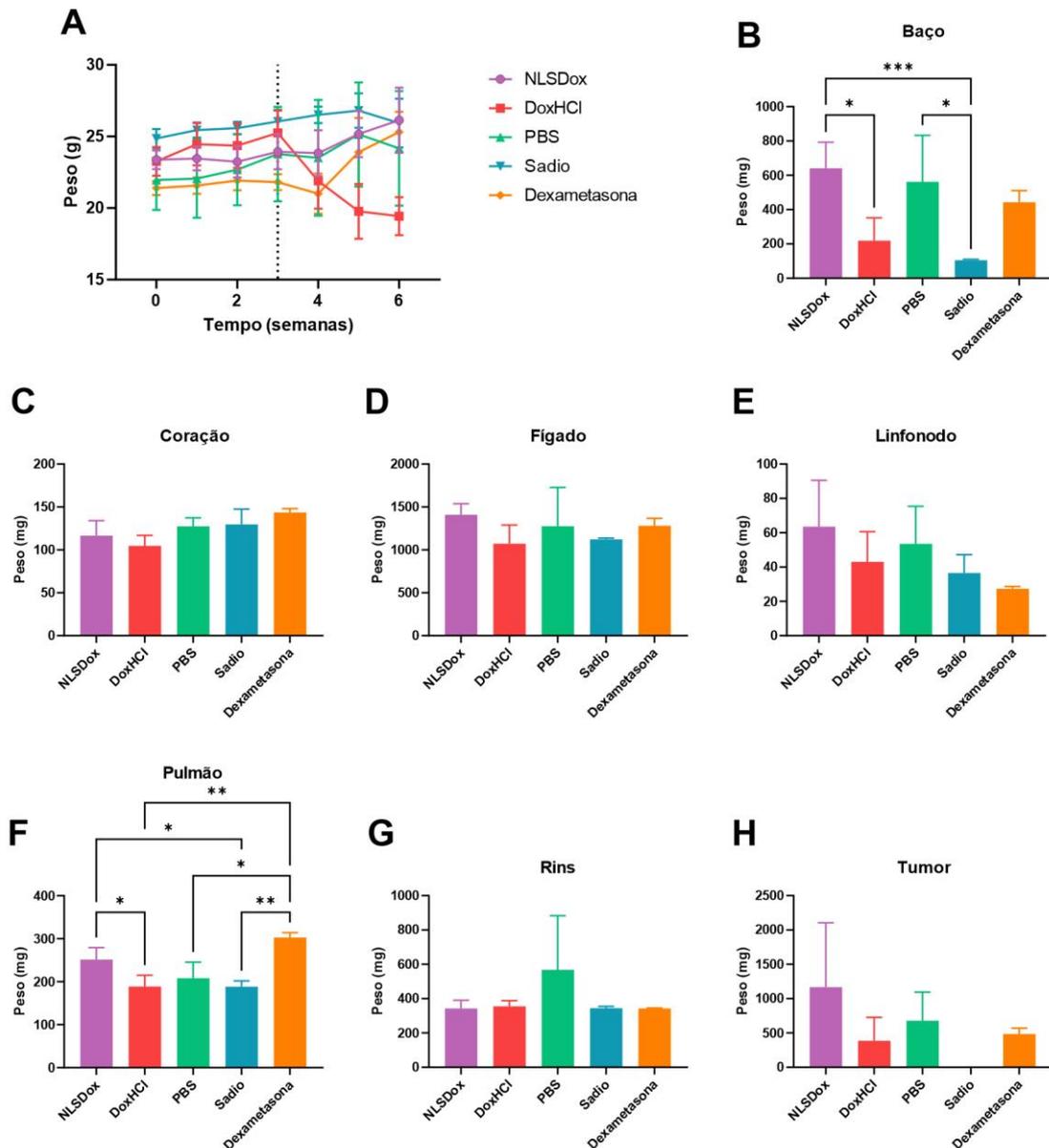


Figura 40 – Avaliação do peso ao longo do tempo (**A**) e do peso dos órgãos coletados após o tratamento. Em **B** o baço teve alterações no peso em animais com tumor tratados com NLSDox ($p=0,0009$) e sem tratamento, com PBS ($p=0,0125$) quando comparados com os sádios, já os animais tratados com DoxHCl apresentaram menor peso no baço em relação aos tratados com NLSDox ($p=0,0125$). Os pesos do coração (**C**), fígado (**D**), linfonodo axilar (**E**), rins (**G**) e tumor (**H**) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O peso do pulmão (**F**) apresentou diferenças significativas entre os grupos, onde dexametasona aumentou o peso em

relação a DoxHCl ($p=0,0025$), PBS ($p=0,0105$) e sádios ($p=0,0015$), NLSDox também apresentou um aumento em relação a DoxHCl ($p=0,0307$) e sádios ($p=0,0165$).

Ao início da sexta semana após o enxerto tumoral, os animais foram eutanasiados completando o fim da experimentação, seus órgãos foram coletados cirurgicamente para avaliações morfológicas. Na **Figura 40** estão as avaliações estatísticas do peso dos órgãos para os animais com tumor e o grupo sadio como controle. O tratamento com NLSDox apresentou aumento no peso do pulmão (**Figura 40F**) e no baço (**Figura 40B**), órgãos relacionados a patogênese do câncer de mama, o mesmo foi observado nos animais com tumor sem tratamento e com dexametasona, no caso do pulmão (**Figura 40F**). Os animais tratados com NLSDox apresentaram maior pesagem do baço em relação aos DoxHCl (**Figura 40B**), o que pode ser atribuído a adsorção de nanopartículas pelo órgão ⁹⁴.

Além de tecidos sólidos, foi coletado o sangue para análise hematológica representadas nas **Figuras 41** e **42**. Para os animais com tumor, alterações significativas foram observadas para os glóbulos brancos com aumento na concentração de leucócitos totais (**Figura 41A**), indicando leucocitose nos animais tratados com NLSDox. Também foram observadas alterações na distribuição das subpopulações de glóbulos brancos nos grupos com tumor em relação aos animais saudáveis (**Figura 41B-G**), alterações atribuídas ao processo da progressão tumoral.

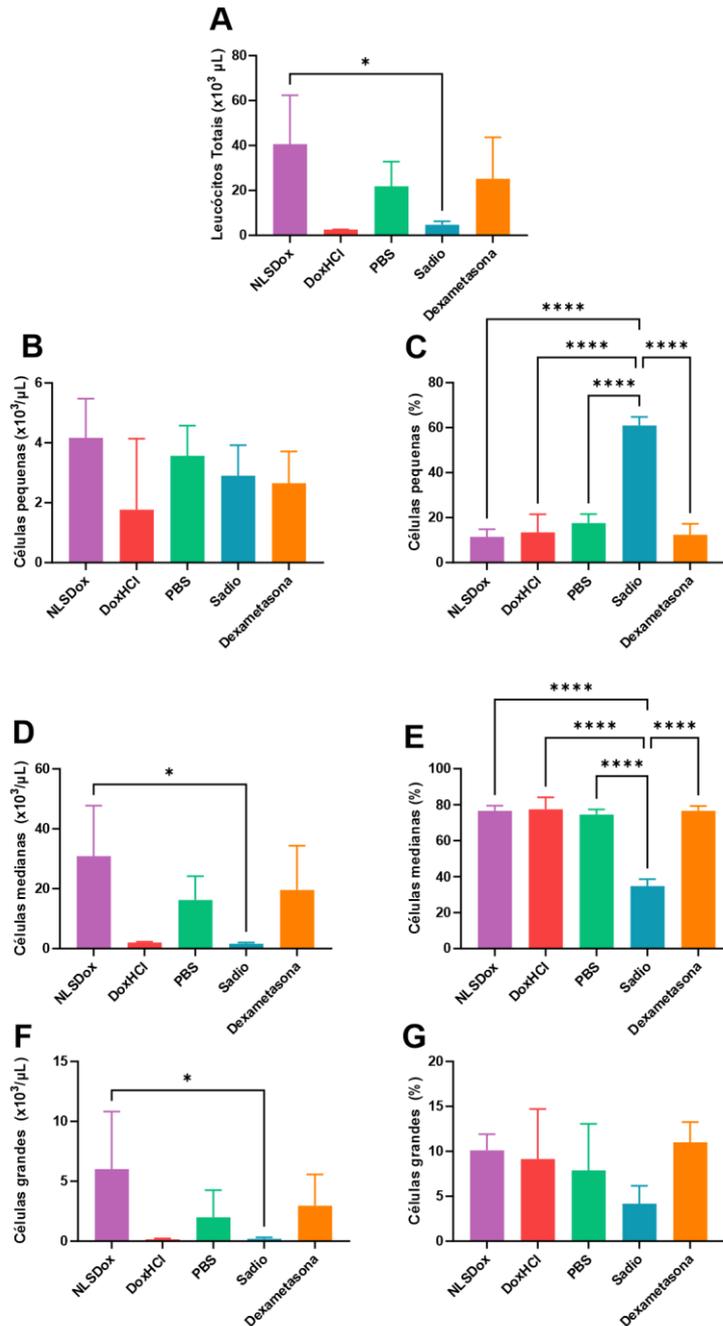


Figura 41 – Análise hematológica da fase branca do sangue dos animais com tumor 6 semanas após o tratamento. **A)** leucócitos totais ($p=0,0273$). **B)** concentração de células pequenas. **C)** porcentagem de células pequenas, onde **** apresenta $p<0,0001$. **D)** concentração de células medianas ($p=0,0193$). **E)** porcentagem de células de médio tamanho, com aumentos em relação ao controle nos grupos NLSDox, DoxHCl, PBS e dexametasona, onde os valores de **** equivalem ao $p<0,0001$. **F)** concentração de células grandes ($p=0,0445$). **G)** porcentagem de células de tamanho grande.

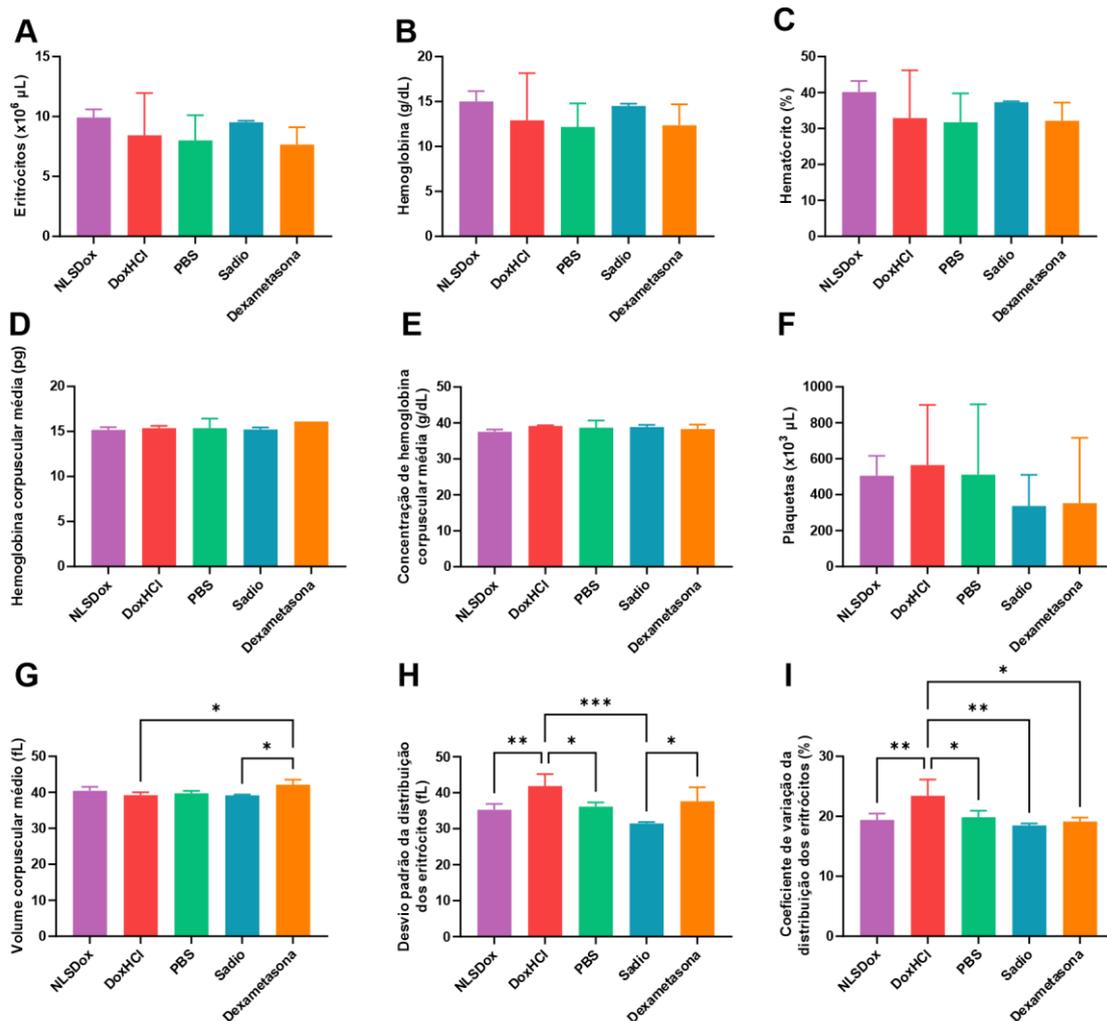


Figura 42 -Análise hematológica das células vermelhas presentes no sangue dos animais com tumor após seis semanas de tratamento. **A)** concentração de eritrócitos. **B)** concentração de hemoglobina. **C)** porcentagem de hematócritos. **D)** hemoglobina corpuscular média. **E)** concentração de hemoglobina corpuscular média. **F)** concentração de plaquetas. **G)** volume corpuscular médio com aumento do grupo dexametasona em relação ao DoxHCl ($p=0,0232$) e sádios ($p=0,0152$). **H)** desvio padrão da distribuição de eritrócitos com aumento do DoxHCl em relação a NLSDox ($p=0,0038$), PBS ($p=0,0289$) e sádios ($p=0,0001$), com alteração também nos animais tratados com dexametasona ($p=0,0263$) em relação aos sádios. **I)** coeficiente de variação da distribuição dos eritrócitos com aumento em DoxHCl em relação a NLSDox ($p=0,0071$), PBS ($p=0,0409$), dexametasona ($p=0,0266$) e animais sádios ($p=0,0024$).

A análise estatística para as alterações hematológicas dos glóbulos vermelhos de animais com tumor está representada na **Figura 42**, onde é observada aumento no tamanho médio das hemácias (**Figura 42G**) para o grupo tratados com dexametasona quando comparados com os tratados com DoxHCl e os animais controle sádios. Já o desvio padrão e o coeficiente de variação da distribuição de eritrócitos (**Figura 42H e I**) apresentaram diferenças significativas entre os grupos, indicando que os grupos com aumento nesse parâmetro apresentam hemácias de diferentes tamanhos. A presença de perda óssea é

responsável por alterar a morfologia e distribuição de eritrócitos ¹⁰², ressaltando o potencial preventivo de perda óssea da NLSDox que apresentou valores de glóbulos vermelhos normalizados em relação ao controle sadio.

Comparando as alterações hematológicas entre animais com e sem tumor tratados com DoxHCl, é apresentada na **Figura 43** a ausência de leucocitose provocada pelo tumor (**Figura 43A**), redução nas células pequenas em animais com tumor, grupo que inclui neutrófilos (**Figura 43B**) e aumento na porcentagem de células medianas, incluindo linfócitos, quando há presença de câncer (**Figura 43C**). A redução dos hematócritos é observada apenas nos animais sem tumor, porem as alterações na distribuição de eritrócitos estão presentes nos animais tratados e nos com tumor (**Figura 43E-H**).

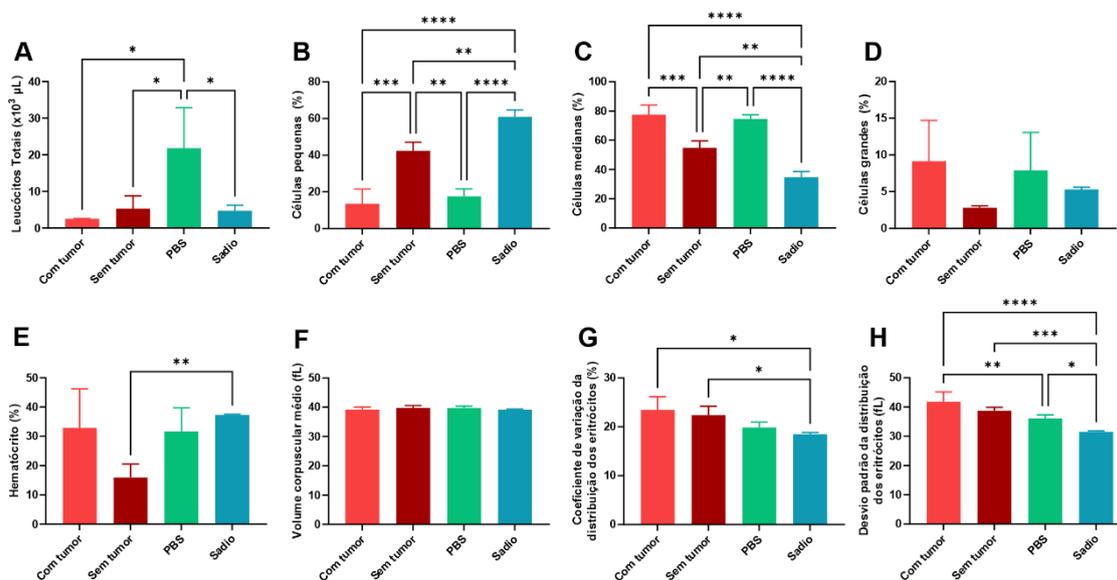


Figura 43 – Avaliação hematológica para os animais tratados com DoxHCl com e sem tumor. Os valores de p para **** são $<0,0001$. Em **A**, o aumento nos leucócitos totais nos animais sem tratamento em relação aos tratados com tumor ($p=0,0287$), sem tumor ($p=0,0353$) e sadios ($p=0,0213$). **B**) porcentagem de células pequenas, e os animais sem tumor apresentam diferenças entre os com tumor ($p=0,0004$), PBS ($p=0,0013$) e os sadios ($p=0,0057$). **C**) porcentagem de células medianas com alteração dos animais sem tumor em relação aos com tumor ($p=0,0010$), sem tratamento ($p=0,0025$) e sadios ($p=0,0014$). **D**) porcentagem de células grandes. **E**) porcentagem de hematócritos ($p=0,0099$). **F**) volume corpuscular médio. **G**) coeficiente da variação da distribuição de eritrócitos com aumentos nos animais tratados com tumor ($p=0,0133$) e sem tumor ($p=0,0347$) em relação ao controle. **H**) desvio padrão na distribuição dos eritrócitos com alterações em relação aos sadios nos grupos de animais sem tumor ($p<0,0001$) e PBS ($p=0,0217$), os animais tratados com tumor também apresentaram aumento em relação aos sem tratamento ($p=0,0093$).

O mesmo foi avaliado para os animais tratados com NLSDox, onde é possível observar a leucocitose em animais com tumor (**Figura 44A**), e perfis semelhantes ao de DoxHCl quando comparados a porcentagem de células

pequenas e medianas **Figura 44**, também foi observado o aumento de células grandes entre os animais tratados com e sem tumor, esse grupo engloba os macrófagos e células apresentadoras e antígenos (**Figura 44D**). As alterações nos glóbulos vermelhos, observadas na **Figura 44E-H** são observadas nos grupos com tumor, podendo ser atribuídas a progressão do câncer.

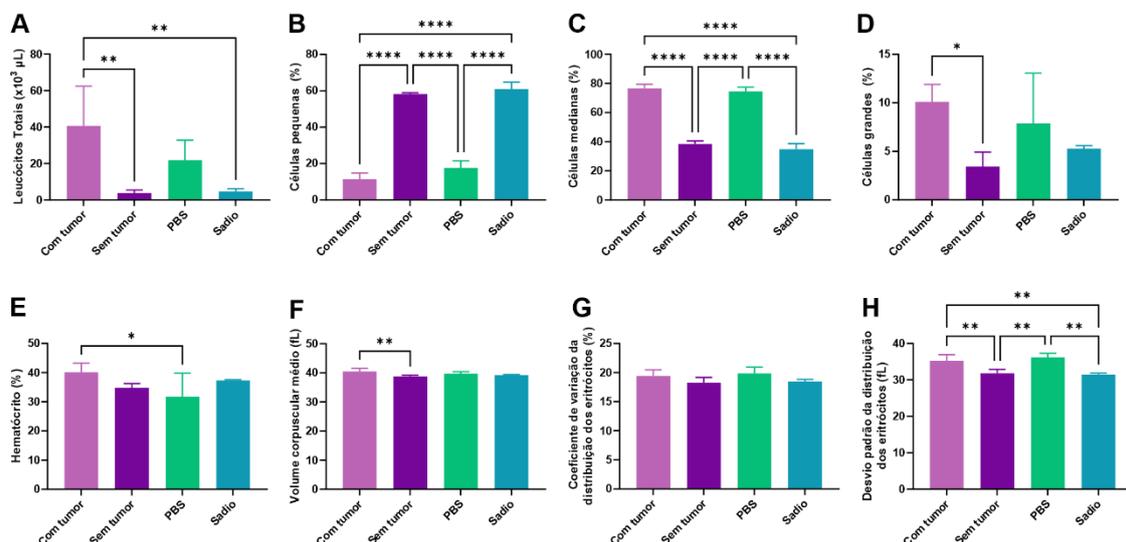


Figura 44 – Análise hematológica dos animais tratados com NLSDox. **A**) leucócitos totais com aumentos nos animais com tumor em relação aos sem tumor ($p=0,0070$) e sádios ($p=0,0085$). **B**) porcentagem de células pequenas ($p<0,0001$). **C**) porcentagem de células medianas ($p<0,0001$). **D**) porcentagem de células grandes ($p=0,0124$). **E**) porcentagem de hematócritos ($p=0,0455$). **F**) volume corpuscular médio ($p=0,0078$). **G**) coeficiente de variação da distribuição de eritrócitos. **H**) desvio padrão da distribuição dos eritrócitos com aumentos nos animais com tumor em relação ao sem tumor ($p=0,0019$) e sádios ($p=0,0015$), também observado nos animais sem tratamento em relação aos sem tumor ($p=0,0014$) e sádios ($p=0,0011$).

Como foi realizado na avaliação da biodistribuição da doxorubicina, a avaliação da progressão tumoral tinha como objetivo determinar a eficácia no enxerto do tumor primário, seu crescimento e quantificar focos metastáticos na região do tórax, indicando progressão da metástase pulmonar. A avaliação da progressão tumoral é importante pela interação entre tumor primário, metástase pulmonar e perda óssea. A emissão de fótons pela luciferase presente nas células cancerosas do enxerto foi quantificada e as imagens obtidas foram analisadas ao longo de 6 semanas após o enxerto (**Figura 45**).

A **Figura 45** possui um animal representativo para cada grupo e suas imagens ao longo do tempo, a escala de radiância média das fotos de toda a imagem está representada no lado direito e a ausência de focos coloridos digitalmente se dá pelo ajuste de escala, que é necessária a manipulação de

valores máximos e mínimos a serem exibidos a fim de evitar a saturação e o realce de auto luminescência, dessa forma a presença de um foco com altos valores de radiância, ofusca, digitalmente regiões com menores valores, para avaliar essa luminescência, os valores foram quantificados e apresentados na **Figura 46**.

Após a obtenção das imagens representadas na **Figura 45**, é criada uma região de interesse englobando o tumor primário e outra para região do tórax, a fim de quantificar a emissão específica em regiões de concentração de células cancerosas. A análise quantitativa de fótons emitidos pelos animais após administração de luciferina é representada na **Figura 46**, com o tumor primário em **A**, e a metástase pulmonar em **C**.

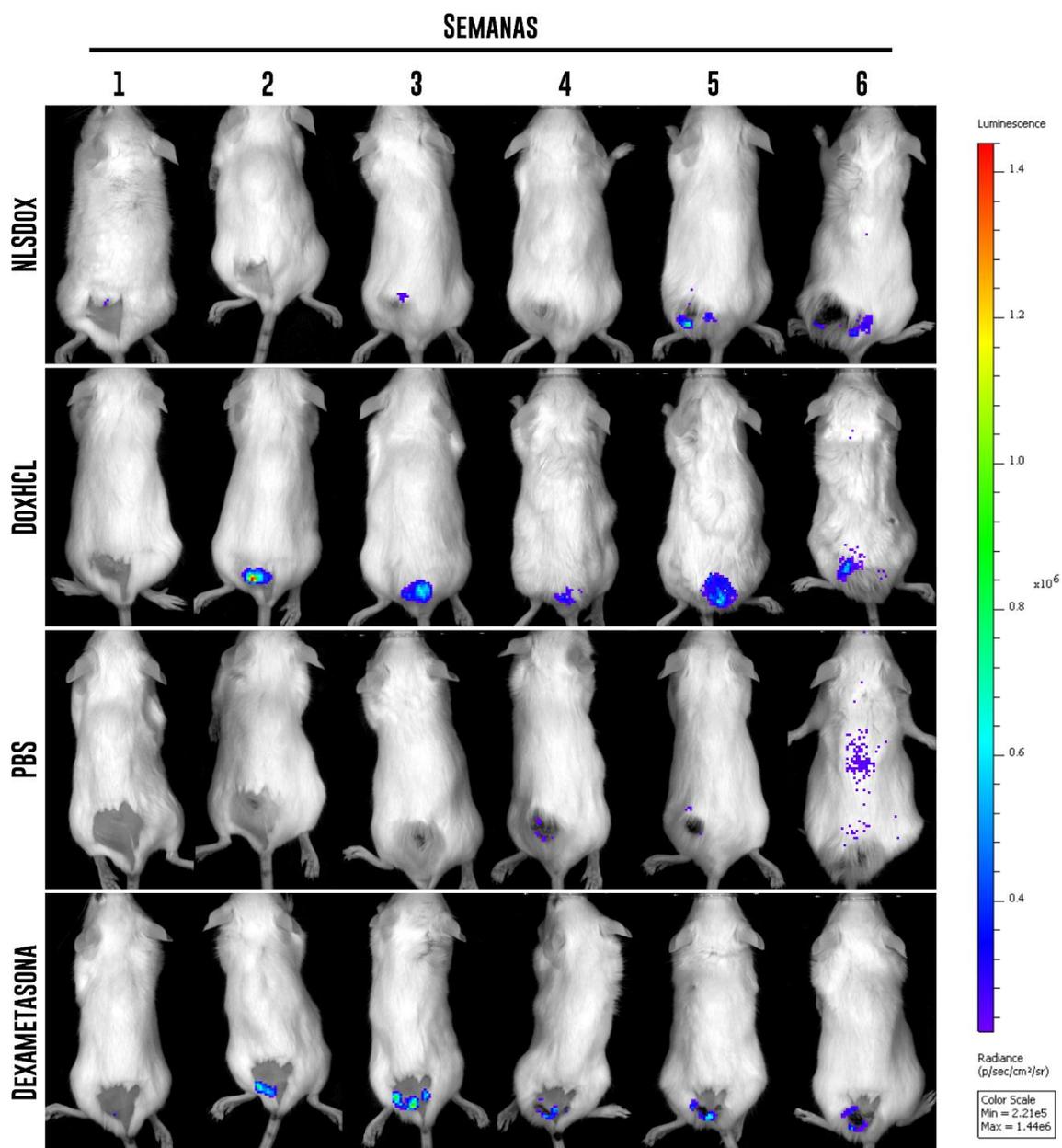


Figura 45 – Fotografias da emissão de bioluminescência pelas células cancerosas em animais ao longo da experimentação, a escala de cores indica a radiância dos fótons emitidos.

A progressão do tumor primário foi uniforme entre os grupos, sem diferença estatística, representada na **Figura 46A**, o perfil de progressão teve crescimento maior no grupo tratado com dexametasona ao longo do tempo em comparação com os outros tratamentos (**B**). Para a região pulmonar (**C**), houve surgimento de metástases em menor tempo nos animais do controle positivo, tratados com dexametasona. Ao avaliar a última semana, os animais tratados com NLSDOx apresentaram prevenção no surgimento de metástases

pulmonares, esse fenômeno é descrito por dos Santos Câmara *et al*, 2017³³ em animais tratados com doxorubicina associada a uma nanoemulsão, a prevenção das metástases também foi observada por Lu *et al*, 2022¹⁰³ após o tratamento com micelas contendo doxorubicina.

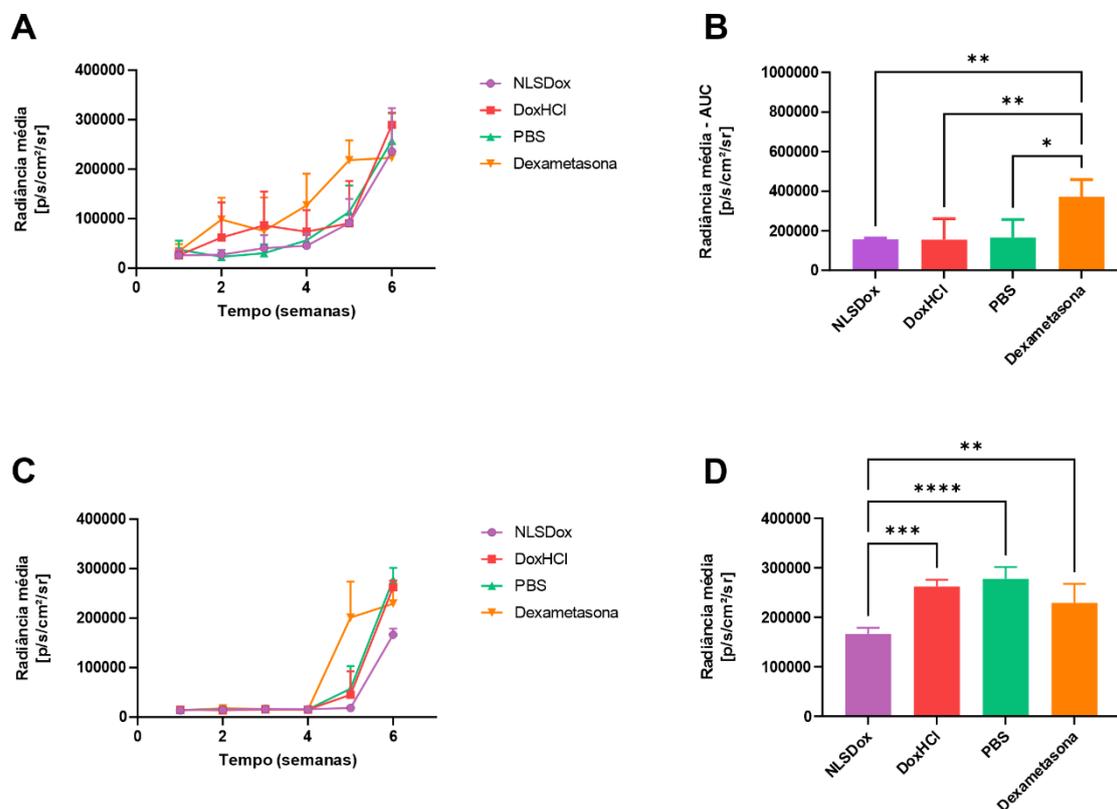


Figura 46 – Quantificação dos fótons emitidos pelas células cancerosas presentes na região do tumor primário (**A** e **B**) e da metástase pulmonar (**C** e **D**). O perfil da progressão do tumor primário ao longo do tempo é apresentado pela área sob a curva dos grupos, com aumento nos animais tratados com dexametasona em relação ao NLSDox ($p=0,0070$), DoxHCl ($p=0,0086$) e PBS ($p=0,0126$) (**B**). Em **D**, a sexta semana na região da metástase pulmonar apresentou redução nos animais tratados com NLSDox em relação aos tratados com DoxHCl ($p=0,0003$), sem tratamento ($p<0,0001$) e dexametasona ($p=0,0088$).

Outra metodologia utilizada para a avaliação da progressão tumoral é a mensuração do volume com auxílio de um paquímetro, onde duas medidas são quantificadas e então é calculado o volume tumoral, representado na **Figura 47A**. O perfil observado na avaliação com o paquímetro é semelhante ao obtido pela bioluminescência na **Figura 46A**, e não houve diferença estatística no volume tumoral entre os grupos ao longo do tempo (**Figura 47A**).

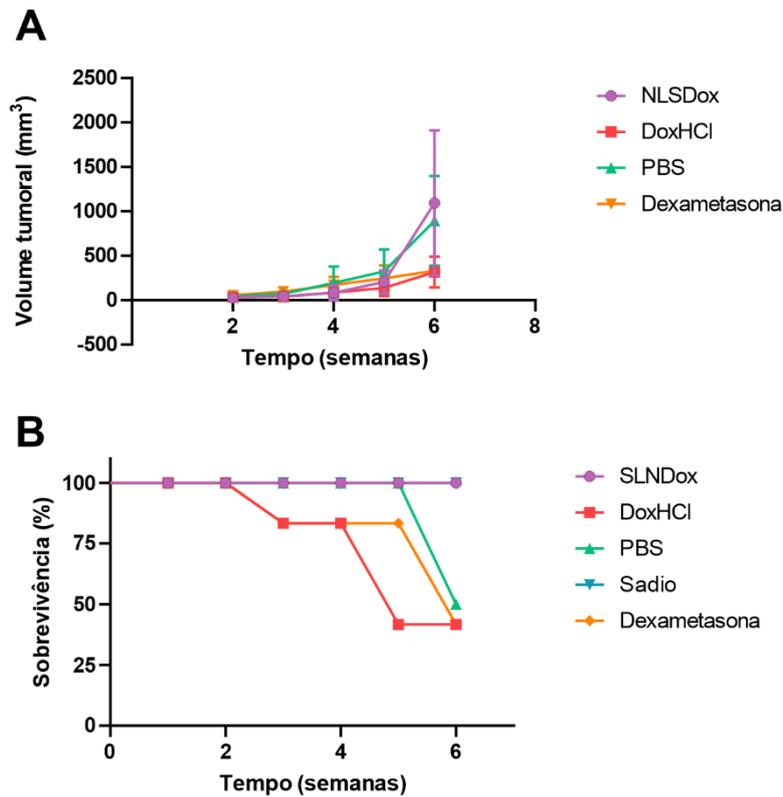


Figura 47 – Avaliação de parâmetros clínicos durante a experimentação. **A)** mensuração do volume tumoral por paquímetro. **B)** porcentagem de sobrevivência ao longo de seis semanas de experimentação.

Os animais tratados com a nanoestrutura apresentaram 100% de sobrevivência (**Figura 47B**), dessa forma, o tumor teve crescimento até o fim do experimento, na sexta semana. A concentração utilizada de doxorubicina no experimento está abaixo do necessário para a morte do tumor primário, sendo escolhida para a avaliação dos efeitos nos tecidos com manutenção da sobrevivência dos animais, com isso, os tumores apresentaram progressão positiva ao longo do experimento.

Além da eficiência terapêutica, uma característica ideal para o tratamento com fármacos antineoplásicos associados a nanoestruturas é o aumento da sobrevivência dos animais tratados, na **Figura 47B** está o gráfico de comparação das curvas de sobrevivência ao longo do tempo, para os animais com tumor, apenas o grupo tratado com NLSDox não apresentou mortes.

Os grupos tratados com DoxHCl apresentaram mortalidades independente da presença de tumor, indicando que o tratamento nanoestruturado possui um caráter protetor em relação a efeitos adversos letais,

considerando que todos os animais tratados receberam a mesma dose do fármaco em sua forma comercial ou em nanopartícula lipídica. Petersen *et al*¹⁰⁴ realizaram, em 2016, uma metanálise comparando a eficácia dos tratamentos convencionais contra a doxorrubicina associada a lipossomas em estudos pré-clínicos e clínicos, onde há a maior sobrevivência em estudos em camundongos com tratamentos nanoestruturados, Gabizon *et al*, 2002¹⁰⁵ observaram a maior sobrevivência em animais tratados com a doxorrubicina lipossomal Doxil.

O imageamento *in vivo* também foi utilizado com o marcador de inflamação crônica, lucigenina, que emite fótons na presença de espécies reativas de oxigênio liberadas pelas células do sistema imunitário (**Figura 48**). Fotografias obtidas durante a quantificação dos fótons apresentam ausência de cor digital pela grande diferença na radiância dos animais (**Figura 48A**), mas a quantificação exata desses valores está representada no item **B**, onde os animais tratados com NLSDox recuperaram parcialmente a imunossupressão causada pela quimioterapia, a imunossupressão também é observada em animais tratados com dexametasona que apresenta atividade anti-inflamatória imunossupressora.

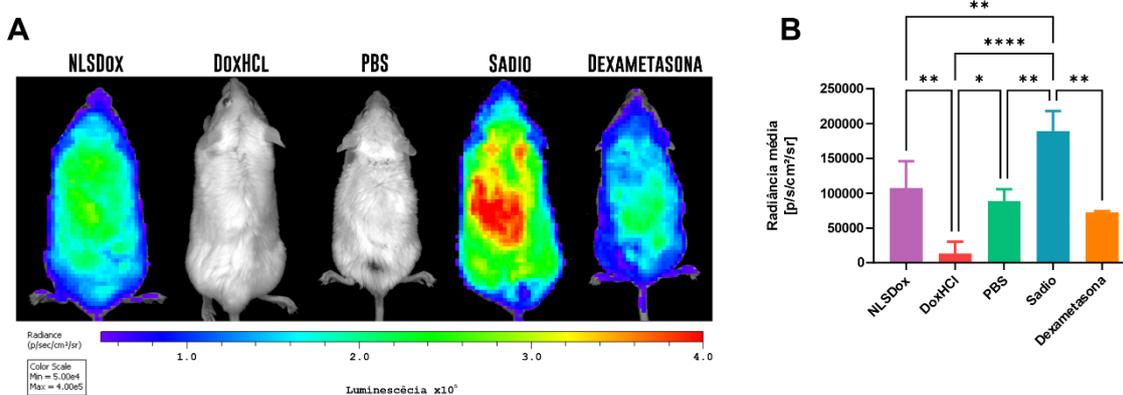


Figura 48 – Ensaio de inflamação crônica por quimioluminescência na sexta semana de experimentação. **A)** fotografias dos fótons emitidos pela lucigenina em regiões inflamadas nos animais. **B)** quantificação da emissão de fótons na região do tumor primário, os animais com NLSDox apresentaram valores maiores que os DoxHCl ($p=0,0049$), PBS apresentou maior inflamação em relação aos tratados com DoxHCl ($p=0,0440$) e os grupos NLSDox ($p=0,0072$), DoxHCl ($p<0,0001$), PBS ($p=0,0041$) e dexametasona ($p=0,0034$) apresentaram menor atividade de células do sistema imunitários em relação aos animais saudáveis.

Além da emissão de bioluminescência, a tomografia pode ser utilizada para avaliar a presença de metástases pulmonares através da atenuação do raio x pelas células do tumor sem a necessidade de administração de contraste no

animal. O volume do tecido ósseo foi quantificado a partir da segmentação das imagens na faixa de 350 a 5000 HU nos volumes de interesses criados delimitando o esqueleto do animal (**Figura 49A**). A variabilidade entre indivíduos foi observada sem alteração significativa entre os grupos. A quantificação do volume pulmonar (**Figura 49B**) apresentou grande variabilidade entre indivíduos de todos os grupos experimentais, sem diferenças significativas.

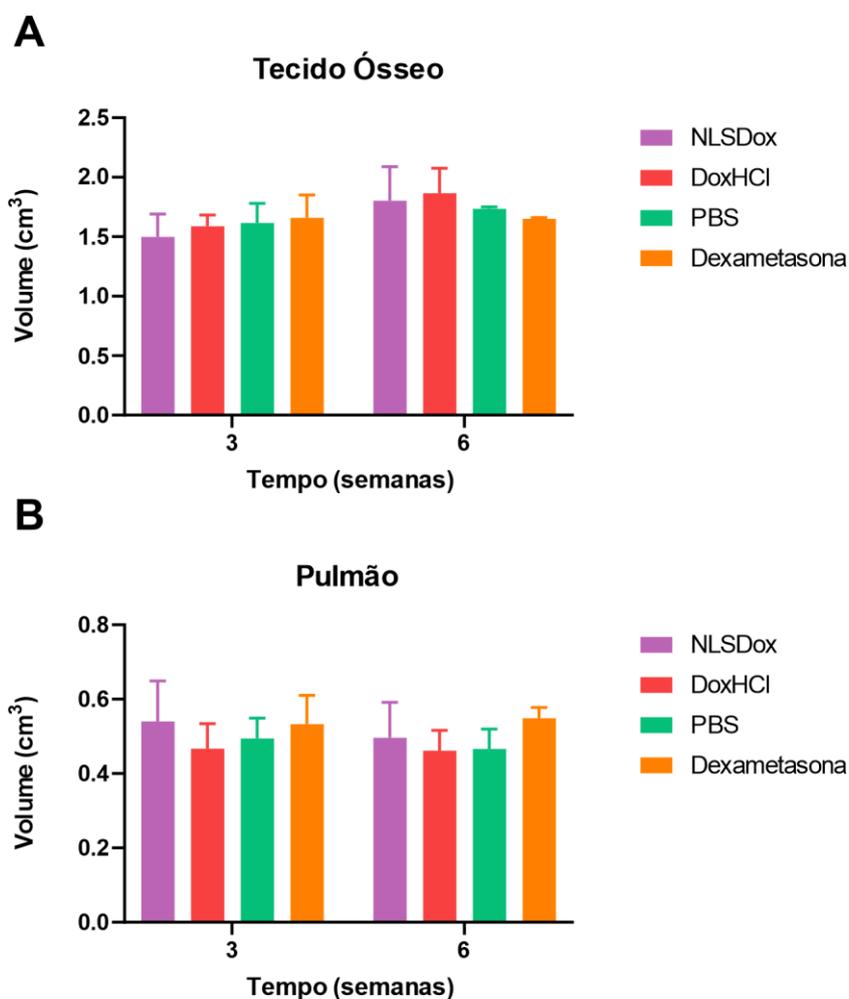


Figura 49 – Mensuração de volumes segmentados por tomografia computadorizada. **A)** tecido ósseo. **B)** pulmão.

A redução no valor mínimo de HU (**Figura 50A**) quantificado no tecido ósseo representa a ausência de calcificação causada pela perda óssea ou a presença de células cancerosas no tecido, provocando a redução da atenuação do raio x. Não foi observada redução significativa no valor mínimo de HU ao longo do tempo entre os grupos experimentais. O valor máximo de HU (**Figura 50B**) representa os *voxels* na amostra de pontos com maior radiodensidade, esses *voxels*, quando no tecido pulmonar, indicam a presença de muco ou

tecidos moles, ao contrário do ar. O menor valor de HU esperado é de -1000, equivalente a radiodensidade do ar.

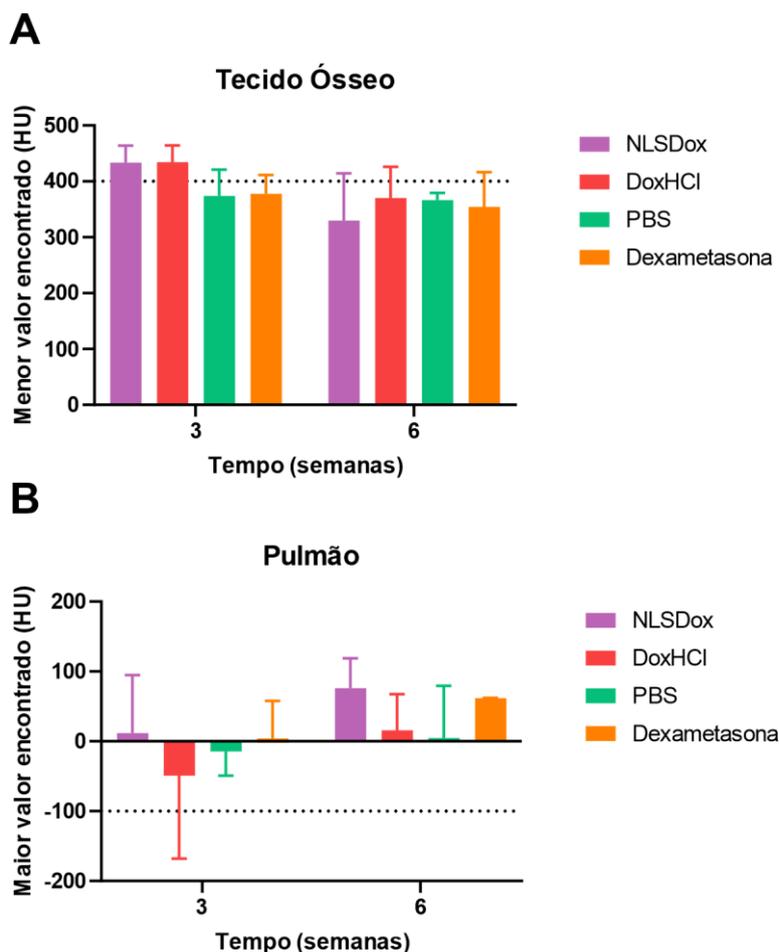


Figura 50 – Avaliação dos valores de HU presentes no voxels dos volumes de interesse avaliados na tomografia computadorizada. **A)** menores valores de HU no tecido ósseo. **B)** maiores valores de HU no pulmão.

A tomografia computadorizada proporciona a visualização de estruturas biológicas sem a necessidade da eutanásia e contraste para a região pulmonar. Na **Figura 51** estão representados os cortes transversais com ênfase na caixa torácica onde é visível o pulmão com suas ramificações interiores, assim como nos animais sem tumor, não foi observado a presenças de nódulos de metástase e aglomerados de alta radiodensidade. A fibrose pulmonar em camundongos é amorfa^{106; 107}, com aparência nebulosa na tomografia, o que é observado nos animais tratados com NLSDox (**Figura 51A**), dexametasona (**Figura 51E**) e nos animais com tumor e sem tratamento (**Figura 51C**).

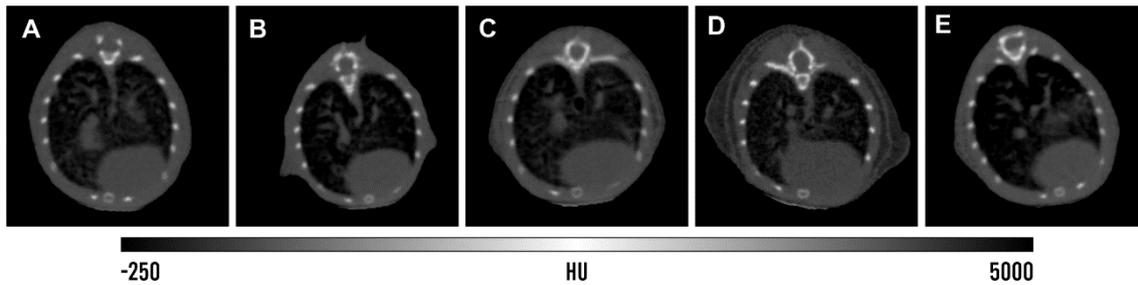


Figura 51 – Pranchas de raio x da região pulmonar obtidas por tomografia computadorizada na sexta semana de experimentação. **A)** NLSDox. **B)** DoxHCl. **C)** PBS. **D)** Sadios. **E)** Dexametasona.

A tomografia computadorizada pode ser utilizada para avaliar a morfologia de outros tecidos sem a necessidade de administração de contrastes, como por exemplo o tecido ósseo, rico em cálcio, átomo com alta radiodensidade. A **Figura 52** representa a região pélvica com visibilidade para os ossos longos traseiros em animais com tumor, por apresentar o tamanho do *voxel* de 250 μ m, a projeção 3D sem o pós-processamento não é o suficiente para observar alterações na mineralização óssea.

Na **Figura 52**, a projeção tridimensional obtida foi segmentada em uma faixa de HU de 350 a 5000, valores que englobam o tecido ósseo com suas porções esponjosa e compacta, é possível observar que em resoluções maiores que 20 μ m alterações na matriz mineral são visíveis. A redução do osso esponjoso, apontado pelas setas azuis, é maior nos animais tratados com DoxHCl quando comparados aos do controle positivo de perda óssea, dexametasona. A NLSDox foi capaz de prevenir a perda óssea no osso esponjoso na região da medula óssea em fêmures de camundongos com tumor.

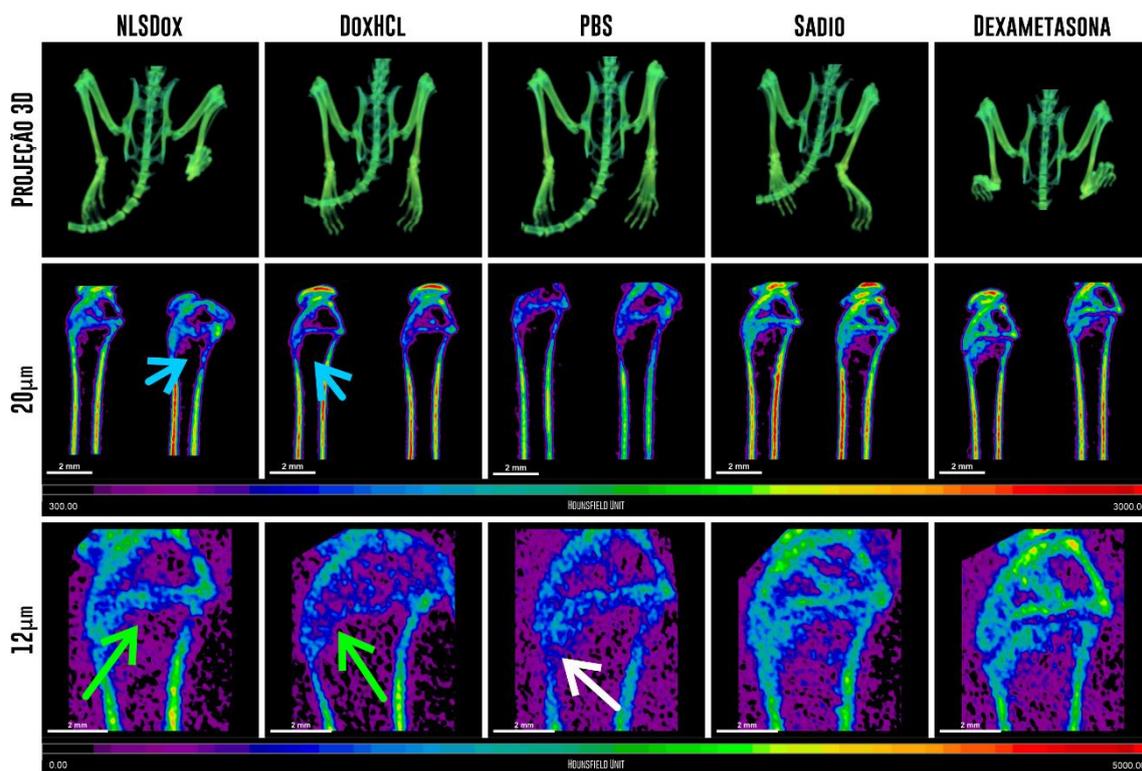


Figura 52 – Projeções de tomografia computadorizada do tecido ósseo em diferentes tamanhos de voxel, onde as setas azuis indicam o osso esponjoso, as setas verdes apontam a placa de crescimento e a seta branca indica a perda óssea na porção compacta do osso.

Além da perda óssea no osso esponjoso, danos a estrutura da parte compacta do osso foram apontadas na seta branca em animais com tumor sem tratamento (**Figura 52**). A placa de crescimento apresentou grandes alterações na espessura e na radiodensidade nos animais tratados com doxorubicina (**Figura 52** setas verdes), ao contrário do observado nos tratados com NLSDoX, que estão semelhantes aos animais saudáveis. A doxorubicina é responsável pela baixa estatura em pessoas tratadas com o fármaco em quadros de leucemia e outras doenças, o fármaco afeta o metabolismo ósseo, impedindo o crescimento dos ossos longos ^{108; 109}.

Complementando a análise morfológica por tomografia computadorizada, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura dos fêmures dos animais com tumor tratados com doxorubicina. Na **Figura 53** estão representadas as micrografias de ossos longos em corte longitudinal, com setas verdes indicando alterações na parte esponjosa do osso na região da medula, os animais tratados com DoxHCl apresentaram maior dano ao osso esponjoso quando há a presença de câncer, esses danos foram prevenidos com o tratamento associado a uma nanoestrutura. Também é possível observar a

redução na espessura do osso esponjoso (setas azuis), com os animais tratados com NLSDox tendo maior espessura quando comparados com os DoxHCl. As alterações na placa de crescimento corroboraram com o observado na tomografia computadorizada (**Figura 52** setas verdes), apresentando menor quantidade de regiões contendo lacunas que contém células produtoras de matriz mineralizada, importantes para o crescimento dos ossos longos (**Figura 53** setas rosas). Dessa forma, o tratamento com NLSDox promoveu uma prevenção da perda óssea mesmo na presença de câncer de mama triplo negativo em estágio tardio.

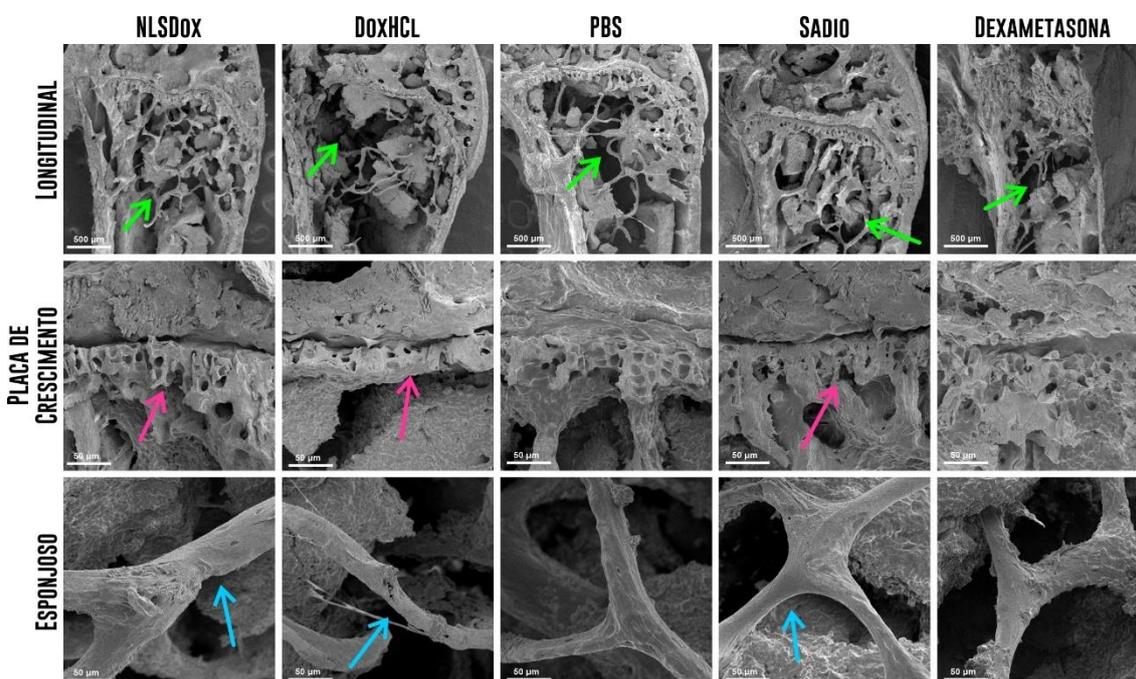


Figura 53 – Micrografias do corte transversal de fêmures dos animais após seis semanas de tratamento obtidas por microscopia eletrônica de varredura. As setas verdes indicam a organização do osso esponjoso, as setas rosas apontam a placa de crescimento e as setas azuis indicam o osso esponjoso com maior magnificação.

Conclusões e Perspectivas

Partindo da hipótese do potencial protetivo das nanopartículas lipídicas sólidas nos danos ao tecido ósseo causados pela quimioterapia, o objetivo principal dessa tese foi avaliar a prevenção da perda óssea em animais tratados com nanopartícula lipídica sólida contendo doxorubicina e conclui-se que:

- A NLSDox é uma formulação estável;
- Apresenta morfologia esférica;

- Diâmetro médio inferior a 150nm;
- A conversão de cloridrato de doxorubicina para a base livre não alterou a quantificação do fármaco por fluorimetria;
- A NLSDox promoveu uma liberação controlada de doxorubicina em ensaio de diálise;
- A biodistribuição da doxorubicina quando associada a nanopartícula lipídica sólida promoveu menor acumulação em órgãos relacionados aos efeitos adversos da quimioterapia;
- A prevenção da perda óssea foi observada em animais sem tumor tratados com NLSDox, onde:
 - As alterações hematológicas foram normalizadas;
 - O perfil de inflamação crônica foi estabilizado em relação aos animais saudáveis;
 - A sobrevivência foi mantida durante a experimentação;
 - A ultraestrutura do fêmur dos animais tratados com NLSDox é semelhante a observada nos saudáveis;
 - A atenuação do raio x pelo tecido ósseo é equivalente ao saudável em diferentes regiões do fêmur;
- Quando a perda óssea é avaliada em camundongos com tumor e tratados com NLSDox, concluiu que:
 - A perda óssea é potencializada quando há a presença de câncer de mama;
 - Em animais com tumor, a NLSDox também preveniu a perda óssea nos camundongos;
 - Alterações hematológicas foram atenuadas;
 - A perda óssea na região da placa de crescimento ocorre com o tratamento de DoxHCl e é prevenido com o uso da nanoestrutura;
 - O desgaste no osso esponjoso é prevenido, garantindo a morfologia semelhante à de fêmures saudáveis;

Dessa forma, conclui-se que a associação de doxorubicina a nanopartícula lipídica sólida acrescenta, às vantagens anteriormente discutidas na literatura, o potencial de prevenir efeitos adversos severos ao tecido ósseo,

controlando a perda óssea manifestada na calcificação da matriz mineral e também na morfologia estrutural do tecido. A perda óssea provocada pela quimioterapia tem danos intensificados quando há a presença de células de câncer de mama, e neste cenário a NLSDox também apresenta caráter protetivo do metabolismo e estrutura do tecido ósseo.

Para elucidar a relação do perfil inflamatório com a prevenção da perda óssea, é necessária a realização de ensaios de quantificação de citocinas e quimiocinas presentes no metabolismo do tecido ósseo, além de caracterização das células do sistema imunitário. Há também a importância de avaliar se a prevenção da perda óssea pela NLSDox é diagnosticável por análises clínicas em ensaios bioquímicos e comportamentais em camundongos com ou sem câncer de mama.

Além das alterações em sistemas biológicos, uma perspectiva a ser elucidada a partir das observações apresentada nessa tese é a interação da doxorubicina com a matriz mineral dos ossos e como a nanopartícula lipídica sólida previne a perda óssea no ponto de vista físico-químico.

Referências Bibliográficas

- ¹ RIGGIO, A. I.; VARLEY, K. E.; WELM, A. L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. **British journal of cancer**, v. 124, n. 1, p. 13-26, 2021. ISSN 1532-1827.
- ² XIONG, Z. et al. Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: a population-based study. **Cancer management and research**, v. 10, p. 287, 2018.
- ³ WEI, Y. et al. Triple-threat activity of PEDF in bone tumors: Tumor inhibition, tissue preservation and cardioprotection against doxorubicin. **Bone**, v. 124, p. 103-117, 2019. ISSN 8756-3282.
- ⁴ PHAM, T. T. et al. Targeted delivery of doxorubicin for the treatment of bone metastasis from breast cancer using alendronate-functionalized graphene oxide nanosheets. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 76, p. 310-317, 2019. ISSN 1226-086X.
- ⁵ PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **The Lancet**, v. 133, n. 3421, p. 571-573, 1889. ISSN 0140-6736.
- ⁶ FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453, 2003. ISSN 1474-1768.
- ⁷ PIETSCHMANN, P.; PIETSCHMANN. **Principles of Osteoimmunology**. Springer, 2011. ISBN 3709105196.
- ⁸ YAO, Z. et al. Therapy-induced senescence drives bone loss. **Cancer research**, v. 80, n. 5, p. 1171-1182, 2020. ISSN 0008-5472.
- ⁹ BJÖRNMALM, M. et al. Bridging Bio–Nano Science and Cancer Nanomedicine. **ACS nano**, v. 11, n. 10, p. 9594-9613, 2017. ISSN 1936-0851.
- ¹⁰ PFEILSCHIFTER, J. et al. Bisphosphonate drug holidays: Risk of fractures and mortality in a prospective cohort study. **Bone**, v. 138, p. 115431, 2020. ISSN 8756-3282.
- ¹¹ KYVERNITAKIS, I. et al. Prevention of breast cancer treatment-induced bone loss in premenopausal women treated with zoledronic acid: Final 5-year results from the randomized, double-blind, placebo-controlled ProBONE II trial. **Bone**, v. 114, p. 109-115, 2018. ISSN 8756-3282.
- ¹² COLEMAN, R. E.; RATHBONE, E.; BROWN, J. E. Management of cancer treatment-induced bone loss. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 6, p. 365-374, 2013. ISSN 1759-4804.
- ¹³ DAVID, E. et al. 12b80–hydroxybisphosphonate linked doxorubicin: bone targeted strategy for treatment of osteosarcoma. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1665-1676, 2019. ISSN 1043-1802.

- ¹⁴ HORNE, A. M.; MIHOV, B.; REID, I. R. Bone loss after romosozumab/denosumab: effects of bisphosphonates. **Calcified tissue international**, v. 103, n. 1, p. 55-61, 2018. ISSN 1432-0827.
- ¹⁵ RAMIN, C. et al. Evaluation of osteopenia and osteoporosis in younger breast cancer survivors compared with cancer-free women: a prospective cohort study. **Breast Cancer Research**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2018. ISSN 1465-542X.
- ¹⁶ SAMARE-NAJAF, M.; ZAL, F.; SAFARI, S. Primary and secondary markers of doxorubicin-induced female infertility and the alleviative properties of quercetin and vitamin E in a rat model. **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 316-326, 2020. ISSN 0890-6238.
- ¹⁷ ANBER, Z. N. Effect of doxorubicin and cyclophosphamide regimen versus taxane on liver enzymes in Iraqi women with breast cancer. **Biomedical Research**, v. 29, n. 21, p. 3869-3873, 2018.
- ¹⁸ VARELA-LÓPEZ, A. et al. An update on the mechanisms related to cell death and toxicity of doxorubicin and the protective role of nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110834, 2019. ISSN 0278-6915.
- ¹⁹ RIVANKAR, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 853, 2014. ISSN 0973-1482.
- ²⁰ LEE, H. et al. Cellular viability and osteogenic differentiation potential of human gingiva-derived stem cells in 2D culture following treatment with anionic, cationic, and neutral liposomes containing doxorubicin. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 6, p. 4457-4462, 2018. ISSN 1792-0981.
- ²¹ VAN DER ZANDEN, S. Y.; QIAO, X.; NEEFJES, J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. **The FEBS journal**, v. 288, n. 21, p. 6095-6111, 2021. ISSN 1742-464X.
- ²² TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013. ISSN 2042-7158.
- ²³ GRANADOS-PRINCIPAL, S. et al. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1425-1438, 2010. ISSN 0278-6915.
- ²⁴ D'ORONZO, S. et al. Cancer treatment-induced bone loss (CTIBL): pathogenesis and clinical implications. **Cancer treatment reviews**, v. 41, n. 9, p. 798-808, 2015. ISSN 0305-7372.
- ²⁵ LEE, H. et al. A study of the effects of doxorubicin-containing liposomes on osteogenesis of 3D stem cell spheroids derived from gingiva. **Materials**, v. 12, n. 17, p. 2693, 2019.
- ²⁶ DRAKE, M. T. Osteoporosis and cancer. **Current osteoporosis reports**, v. 11, n. 3, p. 163-170, 2013. ISSN 1544-1873.

- ²⁷ MUSSI, S. V. et al. New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 282-290, 2013. ISSN 0928-0987.
- ²⁸ TORCHILIN, V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 3, p. 131-135, 2011. ISSN 0169-409X.
- ²⁹ MAEDA, H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. **Advanced drug delivery reviews**, v. 91, p. 3-6, 2015. ISSN 0169-409X.
- ³⁰ WILHELM, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature reviews materials**, v. 1, n. 5, p. 16014, 2016. ISSN 2058-8437.
- ³¹ DA ROCHA, M. C. O. et al. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles prevent tumor growth and lung metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells. **Journal of nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-20, 2020. ISSN 1477-3155.
- ³² DE LIMA, L. I. et al. Combined paclitaxel-doxorubicin liposomal results in positive prognosis with infiltrating lymphocytes in lung metastasis. **Nanomedicine**, v. 15, n. 29, p. 2753-2770, 2020. ISSN 1743-5889.
- ³³ DOS SANTOS CÂMARA, A. L. et al. Acid-sensitive lipidated doxorubicin prodrug entrapped in nanoemulsion impairs lung tumor metastasis in a breast cancer model. **Nanomedicine**, v. 12, n. 15, p. 1751-1765, 2017. ISSN 1743-5889.
- ³⁴ CARDADOR, C. M. et al. **Evaluation of collagen levels in lung metastasis derived from a murine mammary adenocarcinoma model after treatment with nanoemulsions loaded with doxorubicin.** CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS: SPRINGER VAN GODEWIJCKSTRAAT 30, 3311 GZ DORDRECHT, NETHERLANDS, 2017. 510-510 p.
- ³⁵ TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2008. ISSN 1471-2407.
- ³⁶ GABRIELSON, K. et al. In vivo imaging with confirmation by histopathology for increased rigor and reproducibility in translational research: A review of examples, options, and resources. **ILAR journal**, v. 59, n. 1, p. 80-98, 2018. ISSN 1084-2020.
- ³⁷ ARNOLD, M. et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. **The Breast**, v. 66, p. 15-23, 2022. ISSN 0960-9776.
- ³⁸ PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **The lancet oncology**, v. 2, n. 9, p. 533-543, 2001. ISSN 1470-2045.
- ³⁹ SHAO, H.; VARAMINI, P. Breast Cancer Bone Metastasis: A Narrative Review of Emerging Targeted Drug Delivery Systems. **Cells**, v. 11, n. 3, p. 388, 2022. ISSN 2073-4409.
- ⁴⁰ (INCA), I. N. D. C. **Dados e Números sobre Câncer de Mama - Relatório Anual 2022.** INCA. www.inca.gov.br/mama 2022.

- ⁴¹ GIAQUINTO, A. N. et al. Breast cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 72, n. 6, p. 524-541, 2022. ISSN 0007-9235.
- ⁴² MAQBOOL, M.; BEKELE, F.; FEKADU, G. Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer: An Updated Review. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 14, p. 15, 2022.
- ⁴³ JIANG, Y. et al. Current understandings and clinical translation of nanomedicines for breast cancer therapy. **Advanced drug delivery reviews**, v. 180, p. 114034, 2022. ISSN 0169-409X.
- ⁴⁴ LAU, K. H.; TAN, A. M.; SHI, Y. New and Emerging Targeted Therapies for Advanced Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2288, 2022. ISSN 1422-0067.
- ⁴⁵ ROODMAN, G. D.; GUISE, T. A. Bone and Cancer. In: (Ed.). **Basic and Applied Bone Biology**: Elsevier, 2019. p.411-423.
- ⁴⁶ FRASER, W. D.; COLSTON, K. W.; STEVENSON, J. C. Bone and calcium metabolism. In: (Ed.). **The Immunoassay Handbook**: Elsevier, 2013. p.705-720.
- ⁴⁷ MOHAMMAD, K. S. et al. Mechanisms of Muscle Weakness Associated with Bone Metastases. **International Journal of Cancer and Oncology**, v. 4, n. 1, 2017. ISSN 2377-0902.
- ⁴⁸ RANA, T. et al. Doxorubicin-mediated bone loss in breast cancer bone metastases is driven by an interplay between oxidative stress and induction of TGF β . **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e78043, 2013. ISSN 1932-6203.
- ⁴⁹ SHAPIRO, C. L. Osteoporosis: a long-term and late-effect of breast cancer treatments. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3094, 2020.
- ⁵⁰ CHEN, Y.-C.; SOSNOSKI, D. M.; MASTRO, A. M. Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss. **Breast cancer research**, v. 12, n. 6, p. 1-11, 2010. ISSN 1465-542X.
- ⁵¹ PATIL, A.; SABLE, R.; KOTHARI, R. An update on transforming growth factor- β (TGF- β): Sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. **Journal of cellular physiology**, v. 226, n. 12, p. 3094-3103, 2011. ISSN 0021-9541.
- ⁵² SINGH, G.; RABBANI, S. A. **Bone metastasis**. Springer Science & Business Media, 2005. ISBN 158829403X.
- ⁵³ TRIALS, C. Doxorubicin search result. clinicaltrials.gov, 2024. Disponível em: < <https://clinicaltrials.gov/search?intr=Doxorubicin&viewType=Card> >. Acesso em: 07/02/2024.
- ⁵⁴ D'ANGELO, N. A. et al. Doxorubicin nanoformulations on therapy against cancer: An overview from the last 10 years. **Biomaterials Advances**, v. 133, p. 112623, 2022. ISSN 2772-9508.
- ⁵⁵ PUBCHEM, N. C. F. B. I. **Doxorubicin CID=31703**. PubChem Database Accessed at January 31, 2022.

- 56 _____ . **Doxorubicin Hydrochloride** CID=443939. PubChem Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin-Hydrochloride#section=Physical-Description> accessed on July 10, 2020.
- 57 DRUGBANK. **Doxorubicin, DB00997**.
- 58 VIGEVANI, A.; WILLIAMSON, M. J. Doxorubicin. In: (Ed.). **Analytical profiles of drug substances**: Elsevier, v.9, 1981. p.245-274. ISBN 0099-5428.
- 59 KALENDER, Y.; YEL, M.; KALENDER, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats: the effects of vitamin E and catechin. **Toxicology**, v. 209, n. 1, p. 39-45, 2005. ISSN 0300-483X.
- 60 PRATHUMSAP, N. et al. Effects of doxorubicin on the heart: From molecular mechanisms to intervention strategies. **European journal of pharmacology**, v. 866, p. 172818, 2020. ISSN 0014-2999.
- 61 SHIVAKUMAR, P. et al. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. **Toxicology international**, v. 19, n. 3, p. 241, 2012.
- 62 HU, C. et al. Osteocrin attenuates inflammation, oxidative stress, apoptosis, and cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Clinical and translational medicine**, v. 10, n. 3, p. e124, 2020. ISSN 2001-1326.
- 63 LIEN, C.-Y. et al. Chinese Herbal Medicine, Guilu Erxian Glue, as Alternative Medicine for Adverse Side Effects of Chemotherapy in Doxorubicin-Treated Cell and Mouse Models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021. ISSN 1741-427X.
- 64 BARENHOLZ, Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of controlled release**, v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012. ISSN 0168-3659.
- 65 CAGEL, M. et al. Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. **Drug discovery today**, v. 22, n. 2, p. 270-281, 2017. ISSN 1359-6446.
- 66 PANDEY, S. et al. A recent update: Solid lipid nanoparticles for effective drug delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 12, n. 1, p. 17, 2022.
- 67 MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000. ISSN 0939-6411.
- 68 BARHOUM, A. et al. Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. **Nanomaterials**, v. 12, n. 2, p. 177, 2022. ISSN 2079-4991.
- 69 SUBEDI, R. K.; KANG, K. W.; CHOI, H.-K. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 37, n. 3-4, p. 508-513, 2009. ISSN 0928-0987.

- ⁷⁰ JENNING, V.; LIPPACHER, A.; GOHLA, S. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. **Journal of microencapsulation**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2002. ISSN 0265-2048.
- ⁷¹ NARVEKAR, M. et al. Nanocarrier for poorly water-soluble anticancer drugs—barriers of translation and solutions. **Aaps Pharmscitech**, v. 15, n. 4, p. 822-833, 2014. ISSN 1530-9932.
- ⁷² MAXIMILIEN, J. et al. Nanoparticles in biomedical applications. In: (Ed.). **Measuring Biological Impacts of Nanomaterials**: Springer, 2015. p.177-210.
- ⁷³ MUSSI, S. V.; TORCHILIN, V. P. Recent trends in the use of lipidic nanoparticles as pharmaceutical carriers for cancer therapy and diagnostics. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 39, p. 5201-5209, 2013.
- ⁷⁴ REDDY, L. H.; MURTHY, R. Pharmacokinetics and biodistribution studies of doxorubicin loaded poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 148, n. 2, p. 161-166, 2004.
- ⁷⁵ PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current protocols in immunology**, v. 39, n. 1, p. 20.2. 1-20.2. 16, 2000. ISSN 1934-3671.
- ⁷⁶ ALSHETAIWI, H. S. et al. Luminol-based bioluminescence imaging of mouse mammary tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 223-228, 2013. ISSN 1011-1344.
- ⁷⁷ TSENG, J.-C.; KUNG, A. L. In vivo imaging method to distinguish acute and chronic inflammation. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 78, p. e50690, 2013. ISSN 1940-087X.
- ⁷⁸ DAVIS IV, R. W. et al. Luminol chemiluminescence reports photodynamic therapy-generated neutrophil activity in vivo and serves as a biomarker of therapeutic efficacy. **Photochemistry and photobiology**, v. 95, n. 1, p. 430-438, 2019. ISSN 0031-8655.
- ⁷⁹ TSENG, J.-C.; KUNG, A. L. In vivo imaging of inflammatory phagocytes. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 9, p. 1199-1209, 2012. ISSN 1074-5521.
- ⁸⁰ HEROLD, C.; BANKIER, A.; FLEISCHMANN, D. Lung metastases. **European radiology**, v. 6, n. 5, p. 596-606, 1996. ISSN 1432-1084.
- ⁸¹ CHRISTIE-LARGE, M. et al. Imaging strategy for detecting lung metastases at presentation in patients with soft tissue sarcomas. **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 13, p. 1841-1845, 2008. ISSN 0959-8049.
- ⁸² BOSE, R. J.; MATTREY, R. F. Accomplishments and challenges in stem cell imaging in vivo. **Drug discovery today**, v. 24, n. 2, p. 492-504, 2019. ISSN 1359-6446.
- ⁸³ SEN, A. et al. Correlation of in-vivo imaging with histopathology: A review. **European Journal of Radiology**, v. 144, p. 109964, 2021. ISSN 0720-048X.
- ⁸⁴ PUBCHEM, N. C. F. B. I. **Doxorubicin**. PubChem Database accessed on January 21, 2022.

- ⁸⁵ TAHIR, N. et al. Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin for breast cancer therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 4961, 2019.
- ⁸⁶ GUIDES, P. S.; BLOG, A. 4T1 (ATCC® CRL-2539™).
- ⁸⁷ RADICCHI, M. A. et al. Lipid nanoemulsion passive tumor accumulation dependence on tumor stage and anatomical location: a new mathematical model for in vivo imaging biodistribution studies. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 44, p. 7306-7316, 2018.
- ⁸⁸ MOTLAGH, N. S. H. et al. Fluorescence properties of several chemotherapy drugs: doxorubicin, paclitaxel and bleomycin. **Biomedical optics express**, v. 7, n. 6, p. 2400-2406, 2016. ISSN 2156-7085.
- ⁸⁹ YUAN, P.; WALT, D. R. Calculation for fluorescence modulation by absorbing species and its application to measurements using optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 19, p. 2391-2394, 1987. ISSN 0003-2700.
- ⁹⁰ HTUN, T. A negative deviation from Stern–Volmer equation in fluorescence quenching. **Journal of fluorescence**, v. 14, n. 2, p. 217-222, 2004. ISSN 1053-0509.
- ⁹¹ CAM, M. E. et al. Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: an in vitro and in vivo comparison study. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 17, n. 162, p. 20190712, 2020. ISSN 1742-5689.
- ⁹² JOURGHANIAN, P. et al. Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 6, n. 1, p. 17, 2016.
- ⁹³ HOFFBRAND, A. V. et al. **Postgraduate haematology**. John Wiley & Sons, 2016. ISBN 1118854322.
- ⁹⁴ DROZDOV, A. S.; NIKITIN, P. I.; ROZENBERG, J. M. Systematic review of cancer targeting by nanoparticles revealed a global association between accumulation in tumors and spleen. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 13011, 2021. ISSN 1422-0067.
- ⁹⁵ HIRAM-BAB, S. et al. Erythropoietin directly stimulates osteoclast precursors and induces bone loss. **The FASEB journal**, v. 29, n. 5, p. 1890-1900, 2015. ISSN 0892-6638.
- ⁹⁶ SHI, L. et al. The risk of developing osteoporosis in hemolytic anemia—what aggravates the bone loss? **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 15, p. 3364, 2021. ISSN 2077-0383.
- ⁹⁷ YANG, J. et al. Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia: Potential Risk Factors in Bone Loss. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 6891, 2023. ISSN 1422-0067.
- ⁹⁸ GEHR, P.; BACHOFEN, M.; WEIBEL, E. R. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. **Respiration physiology**, v. 32, n. 2, p. 121-140, 1978. ISSN 0034-5687.

- ⁹⁹ HOFFMAN, E. A. et al. Variation in the percent of emphysema-like lung in a healthy, nonsmoking multiethnic sample. The MESA lung study. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 6, p. 898-907, 2014. ISSN 2329-6933.
- ¹⁰⁰ ARAKAWA, H.; HONMA, K. Honeycomb lung: history and current concepts. **AJR-American Journal of Roentgenology**, v. 196, n. 4, p. 773, 2011. ISSN 0361-803X.
- ¹⁰¹ RUSCITTI, F. et al. Longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis by Micro-CT correlates with histological evaluation in mice. **Multidisciplinary respiratory medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2017. ISSN 2049-6958.
- ¹⁰² KIM, S.-Y. et al. Association between osteoporosis and low hemoglobin levels: a nested case-control study using a national health screening cohort. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 16, p. 8598, 2021. ISSN 1660-4601.
- ¹⁰³ LU, Z. et al. Micellar nanoparticles inhibit the postoperative inflammation, recurrence and pulmonary metastasis of 4T1 breast cancer by blocking NF- κ B pathway and promoting MDSCs depletion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 628, p. 122303, 2022. ISSN 0378-5173.
- ¹⁰⁴ PETERSEN, G. H. et al. Meta-analysis of clinical and preclinical studies comparing the anticancer efficacy of liposomal versus conventional non-liposomal doxorubicin. **Journal of controlled release**, v. 232, p. 255-264, 2016. ISSN 0168-3659.
- ¹⁰⁵ GABIZON, A. et al. Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models. **Journal of drug targeting**, v. 10, n. 7, p. 539-548, 2002. ISSN 1061-186X.
- ¹⁰⁶ POVEDANO, J. M. et al. Mice with pulmonary fibrosis driven by telomere dysfunction. **Cell reports**, v. 12, n. 2, p. 286-299, 2015. ISSN 2211-1247.
- ¹⁰⁷ TASHIRO, J. et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 118, 2017. ISSN 2296-858X.
- ¹⁰⁸ VAN LEEUWEN, B. et al. The effect of chemotherapy on the growing skeleton. **Cancer treatment reviews**, v. 26, n. 5, p. 363-376, 2000. ISSN 0305-7372.
- ¹⁰⁹ _____. Effect of single chemotherapeutic agents on the growing skeleton of the rat. **Annals of oncology**, v. 11, n. 9, p. 1121-1126, 2000. ISSN 0923-7534.

DECLARAÇÃO

Brasília, 21 de maio de 2021.

Declaramos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA RELACIONADA À DOXORRUBICINA EM MODELOS DE CÂNCER DE MAMA", SEI n.º 23106.036144/2019-30, sob responsabilidade da Professora Sônia Nair Bão, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 153ª reunião ordinária, realizada em 7/5/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Mus musculus* – Balb/c, sendo 72 fêmeas, com procedência do biotério Central da Universidade Federal de Goiás. A presente declaração é válida pelo período de: 15/7/2021 a 20/12/2023.



Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo
Coordenador da CEUA – UnB

